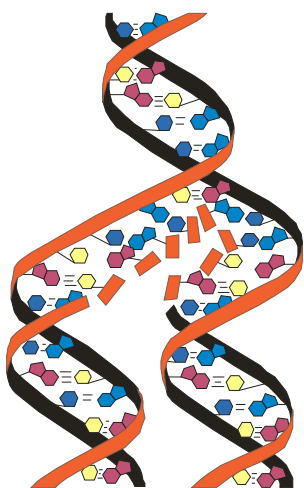


Всеукраїнська громадська наукова організація "Українська академія наук"
ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського"

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



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

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

1(50) ^{TOM 14}
2012

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

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

МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить щоквартально
Published 4 times per year

Заснований у грудні 1999 року
Founded in December 1999

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

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

Відповідно до постанови Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.2010 р. журнал "Медична хімія" внесений до переліку фахових видань, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата медичних і біологічних наук.

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

Рекомендовано до видання вченою радою ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського" (протокол № 9 від 28 лютого 2012 р.).

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

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

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

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

© Науковий журнал "Медична хімія", 2012
© Scientific Journal "Medical Chemistry", 2012

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Ядловський О. Є., Бухтіарова Т. А. (Київ) РОЛЬ
ВАНІЛОЇДНОГО КОМПОНЕНТА В АНТИНОЦИЦЕП-
ТИВНІЙ ДІЇ КЕТОРОЛАКУ 5
- Морозова Л. П., Штатко О. І., Луцьок М. Б., Таран І. В.,
Маланіч В. С., Туров В. В. (Київ) ВПЛИВ ВИСОКОДИС-
ПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ НА ГІДРАТАЦІЮ
ЛЮФІЛІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ ТОНКОЇ КИШКИ 10
- Іванова Н. М., Мавров Г. І., Деркач С. А., Коцар Е. В.
(Харків) АКТИВНІСТЬ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ
У ЛІПОСОМАЛЬНІЙ ФОРМІ СТОСОВНО
STAPHYLOCOCCUS AUREUS 17
- Савченкова Л. В., Фоменко С. І. (Луганськ) СКРИНІНГ
ПОТЕНЦІЙНИХ АНАЛГЕТИКІВ СЕРЕД ПОХІДНИХ
4-(ГІДРОКСІ)-2-ОКСО-1,2-ДИГІДРОХІНОЛІН-3-
КАРБОНОВИХ КИСЛОТ НА МОДЕЛІ
“ОЦТОВОКИСЛИХ КОРЧІВ” 21
- Кравченко О. О., Тимошенко М. О., Гайда Л. М.,
Сокур О. В., Остапченко Л. І. (Київ) АКТИВНІСТЬ
ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ-3-КІНАЗИ ЗА УМОВ
РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
КОЛІТАСОЦІЙОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ 25
- Резуненко Ю. К., Стеценко С. О., Прокопов В. О.
(Харків) ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ
НА ВМІСТ ФОСФОЛІПІДНИХ ФРАКЦІЙ МЕМБРАН
ЕРИТРОЦИТІВ І ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ 30
- Хара М. Р., Юрїїв К. Є., Кузів О. В. (Тернопіль)
МЕТАБОЛІЗМ АЦЕТИЛХОЛІНУ В ПОШКОДЖЕНОМУ
АДРЕНАЛІНОМ МІОКАРДІ САМЦІВ І САМОК ЩУРІВ
ЗА ЗАСТОСУВАННЯ МОДУЛЯТОРІВ АКТИВНОСТІ
СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ 34
- Горбачова С. В., Беленічев І. Ф. (Запоріжжя) ВПЛИВ
ТІОТРИАЗОЛІНУ ТА α -ЛІПОЕВОЇ КИСЛОТИ НА
ПОКАЗНИКИ ТІОЛДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ЗА
УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ 40
- Ніженковська І. В., Ніженковський О. І., Вельчинська О. В.,
Філіпова К. Ю. (Київ) ВПЛИВ ПОХІДНИХ КРАУН-ЕФІРІВ
НА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МІОКАРДІ 45
- Кобернік А. О., Кравченко І. А. (Одеса) ЛІКАРСЬКА
ФОРМА ПЕЛОЇДУ КУЯЛЬНИЦЬКОГО ЛИМАНУ
ТА ЇЇ ПРОТИЗАПАЛЬНА АКТИВНІСТЬ 50
- Гаїна Ж. М., Косуба Р. Б., Яремій І. М. (Чернівці)
КОРИГУВАЛЬНИЙ ВПЛИВ МІЛДРОНАТУ НА
ПОКАЗНИКИ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ
РІВНОВАГИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ НА ТЛІ
ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ДОКСОРУБІЦИНУ 56
- Челін Н. В., Марчишин С. М. (Тернопіль) АНАЛІЗ
РЕЧОВИН ЛІПОФІЛЬНОЇ ПРИРОДИ В ОРГАНАХ
ЛЮБИСТКУ ЛІКАРСЬКОГО (LEVISTICUM OFFICINALE
KOCH.) 60
- Петрух Л. І., Михалик О. І., Коваленко М. М., Павленко О. В.,
Панич О. П. (Львів) ДІЯ ДЕЯКИХ АНТИБІОТИКІВ НА
ОСНОВНІ КОМПОНЕНТИ МОЛОКА 64
- Гуда Н. В., Цимбалюк А. В. (Тернопіль) ВМІСТ
АМІНОКИСЛОТ ТА МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У
КРІОЛІОФІЛІЗОВАНИЙ КСЕНОШКІРІ ЯК ПОКАЗНИК
ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ 70

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Iadlovskiy O. Ye., Bukhtiarova T. A. (Kyiv) THE ROLE
OF VANILOID RECEPTOR IN ANTINOCICEPTIVE
ACTION OF KETOROLAC 5
- Morozova L. P., Shtatko O. I., Lutsyuk M. B., Taran I. V.,
Malanitch V. S., Turov V. V. (Kyiv) EFFECT OF HIGHLY
DISPERSED SILICA ON HYDRATION LIOPHILIZED
TISSUE OF SMALL INTESTINE 10
- Ivanova N. M., Mavrov H. I., Derkach S. A., Kotsar E. V.
(Kharkiv) ACTIVITY OF LIPOSOMAL ANTIMICROBIC
PREPARATIONS 17
- Savchenkova L. V., Fomenko S. I. (Luhansk) SCREENING
OF POTENTIAL ANALGETICS OF THE DERIVATIVES
4-(GIDROXI)-2-OXO-1,2-DIHYDROHYNOLIN-3-
CARBONS ACIDS ON THE MODEL OF ACETIC
“CONVALTIONS” 21
- Kravchenko O. O., Tymoshenko M. O., Haida L. M.,
Sokur O. V., Ostapchenko L. I. (Kyiv) THE PHOSPHA-
TIDYLINOSITOL 3-KINASE ACTIVITY UNDER
EXPERIMENTAL COLITIS-ASSOCIATED
CARCINOGENESIS DEVELOPMENT 25
- Rezunencko Yu. K., Stetsenko S. O., Prokopov V. O.
(Kharkiv) INFLUENCE OF POLYOLS STRUCTURALLY
BASED ON GLYCEROL ON CONTENT OF
PHOSPHOLIPID FRACTIONS IN ERYTHROCYTE
AND HEPATOCYTE MEMBRANES OF RATS 30
- Khara M. R., Yuriyiv K. Ye., Kuziv O. V. (Ternopil)
METABOLISM OF ACETYLCOLINE IN THE
MYOCARDIUM DAMAGED BY ADRENALINE OF
FEMALE AND MALE RATS USING THE ACTIVITY
MODULATORS OF NITRIC OXYDE SYSTEM 34
- Horbachova S. V., Bielenichev I. F. (Zaporizhzhya)
INFLUENCE OF THIOTRIAZOLINE AND α -LIPOIC ACID
ON MARKERS OF THIOL-DISULFIDE SYSTEM UNDER
CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA 40
- Nizhenkovska I. V., Nizhenkovskiy O. I., Velchynska O. V.,
Philipova K. Yu. (Kyiv) INFLUENCE OF CROWN-ETHER'S
DERIVATIVES ON THE BIOENERGETICAL
PROCESSES IN THE MYOCARD 45
- Kobernik A. O., Kravchenko I. A. (Odessa) MEDICINAL
FORM OF KUYALINIK ESTUARY PELOID
AND ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY 50
- Hayina Zh. M., Kosuba R. B., Yaremii I. M. (Chernivtsi)
CORRECTIVE EFFECT OF MILDRONATE ON INDICES
OF OXIDANTANTIOXIDANT BALANCE IN RATS
ORGAISMS AGAINST THE BACKGROUND OF THE
TOXIC DOXORUBICIN ACTION 56
- Chelin N. V., Marchyshyn S. M. (Ternopil) ANALYSIS
OF SUBSTANCES OF LIPOPHILIC NATURE IN
ORGANS OF LOVAGE (LEVISTICUM OFFICINALE
KOCH.) 60
- Petrukh L. I., Myhalyk O. I., Kovalenko M. M., Pavlenko O. V.,
Panych O. P. (Lviv) ACTION OF SOME ANTIBIOTICS ON
THE BASIC MILK COMPONENTS 64
- Huda N. V., Tsymbaliuk A. V. (Ternopil) CONTENT
OF AMINOACIDS AND MICROELEMENTS IN
CRIOLIOFILIZED XENOSKIN AS AN INDICATOR
OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY 70

Лотоцька О. В. (Тернопіль) ВПЛИВ ПИТНОЇ ВОДИ З РІЗНИМИ КОНЦЕНТРАЦІЯМИ МІДІ НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН

Lototska O. V. (Ternopil) INFLUENCING OF DRINKING-WATER WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF COPPER ON THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

73

Сулейман М. М., Ісаєв С. Г., Яременко В. Д., Микитенко О. Є., Кіз О. В., Шевельова Н. Ю. (Харків) СИНТЕЗ І ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ 9-АМІНО-5-НІТРОАКРИДИНІЮ 3-ОКСАМОІЛ-ЗАМІЩЕНИХ N-ФЕНІЛАНТРАНІЛАТІВ

Suleyman M. M., Isayev S. H., Yaremenko V. D., Mykytenko O. Ye., Kiz O. V., Shevelyova N. Yu. (Kharkiv) SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF 9-AMINO-5-NITROACRIDINE OF 3-OXAMOIL-SUBSTITUTED OF N-PHENYLANTRANILATE

77

Авдєєв О. В. (Тернопіль) АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ Й ЕКГ У ТВАРИН З ГІПО- ТА ГІПЕРЕРГІЧНИМ ЗАПАЛЬНИМ ПРОЦЕСОМ У ПАРОДОНТІ

Avdieiev O. V. (Ternopil) ANALYSIS OF BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD SERUM AND ECG IN ANIMALS WITH HYPO- AND HYPERERGIC INFLAMMATORY PROCESS IN PARODONTIUM

82

Колодницька Г. Б., Корда М. М. (Тернопіль) ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПЕГІЛЬОВАНОЇ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ПРИ ПАРОДОНТИТІ

Kolodnytska H. B., Korda M. M. (Ternopil) PATHOGENETIC SUBSTANTIATION OF LOCAL ADMINISTRATION OF PEGYLATED SUPEROXIDE DISMUTASE AT PARODONTITIS

87

Усенко В. Ф., Зупанець І. А., Тарасенко О. О., Шебеко С. К. (Харків) ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КВЕРЦЕТИНУ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМУ ЗАСТОСУВАННІ З МОДИФІКАТОРАМИ РОЗЧИННОСТІ

Usenko V. F., Zupanets I. A., Tarasenko O. O., Shebeko S. K. (Kharkiv) EXPERIMENTAL STUDY OF PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF QUERCETIN AT ORAL APPLICATION WITH MODIFIERS OF SOLUBILITY

91

Банний І. П., Банна Н. І., Криськів О. С., Савченко В. М. (Харків) СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ КАРБОКСИМЕТИЛАМІДІВ R-БЕНЗОЛСУЛЬФОГІДРАЗІДІВ ЩАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ

Bannyi I. P., Banna N. I., Kryskiv O. S., Savchenko V. M. (Kharkiv) SYNTHESIS, PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITY OF THE CARBOXYMETHYLAMIDES R-PHENYL-SULFOHYDRAZIDES OF OXALIC ACID

96

Єрьоменко Р. Ф. (Харків) ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ НА БІЛКОВИЙ ОБМІН У СИСТЕМІ КРОВІ ЗА УМОВ ДОКСОРУБІЦИНОВОЇ ГІПОПРОТЕЇНЕМІЇ

Yeriomenko R. F. (Kharkiv) RESEARCH OF EXTRACT MEDICAGO SATIVA SOWING GRASS INFLUENCE ON PROTEIN METABOLISM IN BLOOD SYSTEM UNDER EXPERIMENTAL DOXORUBICIN OF HIPOPROTEINEMIA

100

Марущак М. І. (Тернопіль) РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У РОЗВИТКУ І ПРОГРЕСУВАННІ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Marushchak M. I. (Ternopil) THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF AN ACUTE LUNG INJURY IN EXPERIMENT

104

Волкова Н. М. (Тернопіль) СТАН ПОЛ У МОЗКУ І ЗМІНИ РЕАКТИВНОСТІ АУТОНОМНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ КРОВООБІГУ В МОЛОДИХ ЩУРІВ ПРИ МЕТЕОЦИКЛОНІ

Volkova N. M. (Ternopil) STATE LIPID PEROXIDATION IN THE BRAIN AND AUTONOMIC CIRCULATORY CONTROL REACTIVITY CHANGES IN YOUNG RATS AT CYCLONIC WEATHER

109

Яковлева Л. В., Сахарова Т. С. (Харків) ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ АНТИМУТАГЕННОЇ ДІЇ ЕЛГАЦИНУ

Yakovlieva L. V., Sakharova T. S. (Kharkiv) EXPERIMENTAL RESEARCH OF POTENTIAL ANTIMUTAGENIC ACTION OF ELGACIN

114

Гнатюк М. С., Гасюк П. А. (Тернопіль) ГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРИ АЦИНАРНОГО ВІДДІЛУ ВЕЛИКИХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

Hnatiuk M. S., Hasiuk P. A. (Ternopil) HYSTOCHEMICAL CHARASTERICS OF ACYNARIC DEPARTMENT STRUCTURE OF HUMAN SALIVARY GLANDS

118

ОГЛЯДИ

Демкович А. Є. (Тернопіль) РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ОДОНТОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ

REVIEWS

Demkovych A. Ye. (Ternopil) CYTOKINES IN THE MECHANISM OF DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PROCESSES OF ODONTOGENIC GENESIS

121

АНАЛІЗ ДОСЯГНЕНЬ У ФАХОВИХ ГАЛУЗЯХ ДО 55-РІЧЧЯ ДВНЗ “ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО”

ANALYSIS OF ACHIEVEMENTS IN PROFESSIONAL BRANCHES TO THE 55th ANNIVERSARY OF SHEI “I. Ya. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY”

Гонський Я. І. (Тернопіль) ПОСТУП БІОХІМІЇ НА ПЕРЕХРЕСТІ ХХ–ХХІ СТ.

Honskyi Ya. I. (Ternopil) MOVEMENT OF BIOCHEMISTRY IN XX–XXI CENTURIES

126

РОЛЬ ВАНІЛОЇДНОГО КОМПОНЕНТА В АНТИНОЦИЦЕПТИВНІЙ
ДІЇ КЕТОРОЛАКУ

Було досліджено вплив неопіоїдного аналгетика кеторолаку на TRPV1 на моделі спінальної ноцицептивної стимуляції "tail-flick" і супраспінальної аналгезії "Hot plate". Виявлено помірну модуляцію капсаїцином антиноцицептивного ефекту кеторолаку на моделі "гаряча пластина" і відсутність ефекту при експериментальному запаленні. Показано вплив капсаїцину на антиноцицептивні ефекти кеторолаку на моделі "tail-flick".

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кеторолак, капсаїцин, капсазепін, ванілоїдний рецептор TRPV1.

ВСТУП. Проблема фармакотерапії болю важлива й актуальна. На сьогодні немає аналгетичного засобу, який би оптимально відповідав вимогам клініки. Наркотичні аналгетики, незважаючи на їх високу ефективність, застосовують обмежено через здатність викликати фізичну та психічну залежність. Ненаркотичні знеболювальні засоби, як правило, ефективні при слабкому та помірному болю, хоча й можуть проявляти високу ефективність при окремих видах болю. Крім того, вони мають певні обмеження в застосуванні через свої побічні ефекти. Введення в медичну практику нових знеболювальних засобів (вибіркові інгібітори ЦОГ-2, флупертин, нефопам та ін.) зробило значний прогрес у знеболюванні, однак ця проблема все ще далека від вирішення.

Одним із шляхів вирішення проблеми знеболювання є оптимізація застосування вже широко відомих аналгетичних засобів шляхом поглибленого вивчення особливостей їх фармакодинаміки і токсичності. Детальне вивчення механізмів знеболювальної дії, поряд з поглибленою інформацією про нозологію, дає можливість знайти основний препарат для лікування певного больового синдрому. Наприклад, широко відомий нестероїдний протизапальний препарат "Індометацин", який на сьогодні є основним засобом для лікування пароксизмальних гемікраній [1]. Одним із підходів до вивчення фармакодинаміки аналге-

тика є оцінка його рецепторної дії. Ванілоїдний рецептор (TRPV1) – один зі специфічних іонних каналів, що відіграє значну роль у процесах болю, а також у процесах запалення [7, 8]. Значну кількість TRPV1 виявлено як у ноцицептивних нейронах периферичної нервової системи (на всьому протязі від периферичного нервового закінчення до центрального відрізка), так і в центральній нервовій системі [7, 8]. TRPV1 відіграє значну роль як у передачі та модуляції болю, так і в інтеграції різних больових стимулів.

Кеторолак на сьогодні є одним з найбільш ефективних ненаркотичних аналгетиків. Аналізуючи структуру кеторолаку та агоніста TRPV1 капсаїцину, нами було виявлено спільні структурні фрагменти між цими молекулами, що не виключає здатності препарату впливати на TRPV1. В попередніх наших дослідженнях у дослідах *in vitro* оцінено здатність кеторолаку впливати на TRPV1 ворітної вени [4].

Метою даної роботи було оцінити наявність ванілоїдного компонента в аналгетика в експериментах *in vivo*.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження виконано на білих статевозрілих нелінійних щурах масою 160–180 г і білих нелінійних мишах масою 18–22 г розведення віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України. Тварини перебували на стандартному харчовому раціоні згідно із санітарно-

гігієнічними нормами. Усі дослідження проводили відповідно до методики і вимог ЕЦ МОЗ України та правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [3].

У дослідженні використовували агоніст TRPV1 капсаїцин (Sigma) та його антагоніст капсазепін (Sigma). В експерименті застосовували метод фармакологічного аналізу, для чого аналізатор вводили до чи після введення анальгетика. Анальгезивну активність оцінювали на термічних моделях ноцицептивної стимуляції “гаряча пластина” і “tail-flick” [5, 6].

В експерименті на моделі “гаряча пластина” досліджували речовини використовували у дозах: капсаїцин – 5 мг/кг підшкірно, кеторолак – 0,7 мг/кг внутрішньом’язово. Експеримент виконували за схемою: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату. Вимірювання проводили через 15, 30, 60 хв після введення аналізатора. 2. Введення препарату, через 5 хв аналізатора. Вимірювання – через 15, 30, 60 хв після введення препарату. Знеболювальну активність оцінювали за зміною латентного періоду “облизування” лапки. В окремій групі дослідів оцінювали вплив капсаїцину на антиноцицептивний ефект анальгетиків у тварин із запаленням, яке моделювали шляхом субплантарного введення 10 % розчину каоліну в об’ємі 0,02 мл на мишу [4]. Експеримент проводили на приладі “Hot plate”, для чого відбирали тварин, в яких латентний період реакції “облизування” лапки не перевищував 20 с. Після цього у мишей моделювали експериментальне запалення. Через 24 год у піддослідних мишей вивчали рівень ноцицепції. Аналізатор та анальгетик вводили у дозах: капсаїцин – 5 мг/кг підшкірно, кеторолак – 0,7 мг/кг внутрішньом’язово. Експеримент виконували за схемою: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату. Вимірювання – через 15, 30, 60 хв після введення аналізатора. 2. Введення препарату, через 5 хв аналізатора. Вимірювання – через 15, 30, 60 хв після введення препарату.

В експерименті на моделі “tail-flick” досліджували речовини використовували у дозах ЕД₅₀: капсаїцин – 10 мг/кг підшкірно, капсазепін – 1 мг/кг внутрішньочеревно, кеторолак – 3 мг/кг внутрішньом’язово. Експеримент виконували за схемою: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату. Вимірювання – через 15, 30, 60 хв після введення аналізатора. 2. Введення препарату, через 5 хв аналізатора. Вимірювання – через 15, 30, 60 хв після введення препарату. Антиноцицептив-

ний ефект оцінювали за зміною латентного періоду відсмикування хвоста від інфрачервоного джерела тепла.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента і непараметричних критеріїв – метод знаків [2]. Відмінності вважали достовірними при рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для вивчення ванілоїдного компонента дії кеторолаку було обрано моделі термічної ноцицептивної стимуляції “tail-flick” та “гаряча пластина”. Модель “tail-flick” характеризує спінальний рівень ноцицепції та адекватна для використання, оскільки спінальні нейрони відіграють важливу роль у проведенні болювого збудження. Слід зазначити, що у спінальних нейронах міститься велика кількість TRPV1. Модель “гаряча пластина” характеризує супраспінальний рівень ноцицепції. Відомо, що значна кількість TRPV1 міститься і в головному мозку тварин, що повинно відігравати певну роль у регуляції болю. В окремих дослідях було оцінено вплив кеторолаку на TRPV1 при запаленні, оскільки відомо, що аферентні нейрони, що експресують TRPV1, продукують субстанцію Р – один із медіаторів запалення [3]. Отримані результати наведено в таблицях 1–3.

На моделі ноцицептивної стимуляції “гаряча пластина” кеторолак проявляв суттєвий антиноцицептивний ефект, що виникав уже через 15 хв після введення препарату. Збільшення латентного періоду реакції у піддослідних тварин складало +83,33 % (табл. 1).

Попереднє введення кеторолаку призводило до значного збільшення латентного періоду реакції у тварин. Антиноцицептивний ефект у відповідні терміни спостереження зростав у 1,3–4 рази (табл. 1). Попереднє введення капсаїцину перед анальгетиком також викликало збільшення латентного періоду реакції, однак на дещо нижчому рівні. Слід відмітити той факт, що відмінності між цими групами були недостовірні. Максимум антиноцицептивного ефекту проявлявся через 30 хв після початку експерименту, що збігається з динамікою розвитку ефекту як кеторолаку, так і капсаїцину.

При експериментальному моделюванні реакції запалення (каоліновий набряк), застосуванні кеторолаку, в експерименті проявлялась достовірна активність, що можна пояснити значною протизапальною дією препарату. Латентний період реакції зростав до +115,11 % на 15 хв експерименту і до +170,33 % через 60 хв. При введенні аналізатора як до,

так і після введення препарату суттєвих змін у розвитку антиноцицептивної активності кеторолаку не спостерігалось. Винятком є 60 хв експерименту при використанні схеми кеторолак+капсаїцин, однак ці відмінності не вірогідні. Максимальний ефект проявлявся через 30 хв (табл. 2). Аналізуючи отримані експериментальні дані, можна говорити про помірну модуляцію капсаїцином антиноцицептивного ефекту кеторолаку в інтактних тварин на моделі “гаряча пластина”. При експериментальному запаленні (каоліновий набряк) ванілоїдний компонент фармакологічної дії кеторолаку, найімовірніше, відсутній, оскільки не спостерігається потенціювання або зниження його ефекту.

Кеторолак проявляв антиноцицептивну активність на моделі “tail-flick”. Введення препарату викликало знеболювальний ефект, максимум якого проявлявся вже через 30 хв (табл. 3).

При введенні антагоніста TRPV1 капсаєпіну в перші 15 хв не спостерігалось вірогідних змін латентного періоду реакції порівняно з вихідним значенням. На 60 хв латентний період реакції достовірно збільшувався до +54,85 %, що можна пояснити блокуючою дією аналізатора на рецептор.

Застосування схеми кеторолак+капсаїцин викликало значне збільшення латентного періоду реакції, максимум якого припадав на 30 хв (+138,7 %) після початку експерименту.

Таблиця 1 – Вплив капсаїцину на антиноцицептивну активність кеторолаку при одноразовому внутрішньом’язовому введенні на моделі “гаряча пластина” (n=6)

Період спостереження	Вихід.	15 хв	30 хв	60 хв	90 хв	120 хв
Група	Латентний період реакції, с					
Кеторолак	8,1±3,1	14,37±2,58	14,85±4,83	14,17±6,13	12,26±6,60	10,5±1,27
Зміни до вихід., %	–	+77,41 %	+83,33 %*	+77,94 %	+51,36 %	+29,63 %
Капсаїцин	12,08±1,45	13,97±5,04	14,5±5,13	23,7±6,85	19,78±5,25	16,12±5,94
Зміни до вихід., %	–	+15,64 %	+20,03 %	+96,19 %*	+63,74 %	+33,44 %
Кеторолак+капсаїцин	13,75±1,95	60±0	47,8±19,21	27,57±8,48	38,36±13,36	28,53±7,33
Зміни до вихід., %	–	+336,2 %***	+247,6 %**	+100,51 %*	+178,9 %*	+107,49 %**
Капсаїцин+кеторолак	9,7±1,47	34,6±9,16	22,25±9,75	20,92±5,0	23,97±4,34	15,94±4,33
Зміни до вихід., %	–	+256,7 %**	+129,4 %	+115,67 %**	+147,11 %**	+64,33 %

Примітка * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Таблиця 2 – Вплив капсаїцину на антиноцицептивну активність кеторолаку при одноразовому внутрішньом’язовому введенні на моделі “гаряча пластина” у мишей з каоліновим набряком (n=6)

Період спостереження	Вихід. 1 ¹	Вихід. 2 ²	15 хв	30 хв	60 хв
Група	Латентний період реакції, с				
Кеторолак	14,72±2,53	8,36±2,97	18,0±6,94	21,1±5,71	22,6±3,6
Зміни до вихід. 2, %	–	–	+115,11 %	+152,9 %*	+170,33 %**
Капсаїцин	13,5±4,46	7,11±3,11	4,06±1,7	5,96±0,61	8,38±0,41
Зміни до вихід. 2, %	–	–	-42,9 %	-16,2 %	+17,2 %
Кеторолак+капсаїцин	16,2±2,83	8,46±3,06	19,11±1,72	19,38±3,01	14,66±3,5
Зміни до вихід. 2, %	–	–	+125,8 %**	+129,1 %*	+73,2 %
Капсаїцин+кеторолак	14,32±0,99	8,34±3,76	19,76±6,7	21,32±7,1	22,76±5,11
Зміни до вихід. 2, %	–	–	+136,9 %	+155,6 %*	+172,9 %*

Примітки:

1. Вихід. 1¹ – латентний період до моделювання каолінового набряку; Вихід 2² – латентний період через 24 год після моделювання каолінового набряку.

2. * – p<0,05 – достовірні зміни відносно Вихід. 2.

Таблиця 3 – Вплив капсаїцину та капсазепіну на антиноцицептивну активність кеторолаку при одноразовому внутрішньом'язовому введенні на моделі “tail-flick” (n=5)

Період спостереження	Вихід.	15 хв	30 хв	60 хв
Група	Латентний період реакції, с			
Кеторолак	3,44±0,42	4,4±0,82	5,01±0,71	3,8±0,56
Зміни до вихід., %	–	+27,9 %*	+46,5 %*	+10,4 %
Капсаїцин	3,24±0,97	2,7±0,43	2,78±1,44	3,22±0,84
Зміни до вихід., %	–	-16,6 %	-14,19 %	-0,61 %
Кеторолак+капсаїцин	3,82±0,83	6,24±1,72	9,12±4,1	6,86±4,8
Зміни до вихід., %	–	+78,2 %*	+138,7 %*	+79,5 %
Капсаїцин+кеторолак	4,12±1,61	7,8±3,7	7,8±3,88	5,48±1,37
Зміни до вихід., %	–	+89,3 %*	+89,3 %*	+31,06 %*
Капсазепін	4,74±1,51	4,56±1,53	5,22±1,23	7,34±0,61
Зміни до вихід., %	–	-3,8 %	+10,12 %	+54,85 %*
Кеторолак+капсазепін	4,74±1,08	7,74±1,08	6,7±1,52	5,28±0,63
Зміни до вихід., %	–	+63,2 %*	+41,4 %*	+11,04 %
Капсазепін+кеторолак	5,14±1,04	7,78±1,37	6,70±1,49	6,3±1,1
Зміни до вихід., %	–	+51,36 %*	+30,5 %*	+22,7 %

Примітка. * – $p < 0,05$ (непараметричні критерії, метод знаків).

Використання аналізатора і препарату в комбінації капсаїцин+кеторолак також спричиняло збільшення латентного періоду реакції, однак на дещо нижчому рівні (+89,3 %).

Введення антагоніста TRPV1 на фоні кеторолаку (як у схемі капсазепін+кеторолак, так і в схемі кеторолак+капсазепін) не викликало кардинальних змін порівняно з індивідуальним застосуванням кеторолаку (табл. 3).

Аналізуючи вищенаведені дані, можна говорити про вплив капсаїцину на антиноцицептивні ефекти кеторолаку і відсутність модуляції ефектів аналгетика з боку капсазепіну на моделі ноцицептивної стимуляції “tail-flick”.

ВИСНОВКИ. 1. Виявлено помірну модуляцію капсаїцином антиноцицептивного ефекту кеторолаку в інтактних тварин на моделі “гаряча пластина”.

2. При експериментальному запаленні ванілоїдний компонент фармакологічної дії кеторолаку, найімовірніше, відсутній, оскільки не спостерігається потенціювання або зниження його ефекту.

3. Показано вплив капсаїцину на антиноцицептивні ефекти кеторолаку і відсутність модуляції ефектів аналгетика з боку капсазепіну на моделі ноцицептивної стимуляції “tail-flick”.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Каннер Р. Секреты лечения боли / Р. Каннер. – М. : БИНОМ, 2006. – 400 с.
2. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2002. – 640 с.
3. Миронов Н. Ю. Ванилоидные рецепторы: структура, участие в регулировании функций организма, терапевтический потенциал / Н. Ю. Миронов, В. В. Чурюканов // Экспер. и клин. фармакология. – 2006. – **69**, № 5. – С. 55–69.
4. Порівняльне дослідження впливу піродазолу, парацетамолу та кеторолаку на ванілоїдний рецептор TRPV1 / І. Л. Мончак, О. Є. Ядловський, Т. А. Бухтіарова, А. І. Соловйов // Фармакологія та лікарська Токсикологія. – **20**, № 1. – С. 35–39.

5. Стефанов А. В. Доклинические исследования лекарственных средств : методические рекомендации / А. В. Стефанов. – К. : Авицена, 2002. – 568 с.
6. D'Amoue F. E. A method for determining lose of pain sensation / F. E. D'Amoue, D. L. Smalh // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1941. – **72**. – P. 74.
7. Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels / S. Brauchi, G. Orta, C. Mascayano [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – **104**, № 24. – P 10246–10251.
8. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists / M. Cui, P. Honore, C. Zhong [et al.] // J. Neurosci. – 2006. – **26**, № 37. – P. 9385–9393.

РОЛЬ ВАНИЛОИДНОГО КОМПОНЕНТА В АНТИНОЦИЦЕПТИВНОМ ДЕЙСТВИИ КЕТОРОЛАКА

Резюме

Было исследовано влияние неопиоидного анальгетика кеторолака на TRPV1 на модели спинальной ноцицептивной стимуляции "tail-flick" и супраспинальной анальгезии "Hot plate". Выявлено умеренную модуляцию капсаицином антиноцицептивного эффекта кеторолака на модели "горячей пластины" и отсутствие эффекта при экспериментальном воспалении. Показано влияние капсаицина на антиноцицептивные эффекты кеторолака на модели "tail-flick".

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кеторолак, капсаицин, капсазепин, ванилоидный рецептор TRPV1.

O. Ye. Iadlovskiy, T. A. Bukhtiarova
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

THE ROLE OF VANILOID RECEPTOR IN ANTINOCICEPTIVE ACTION OF KETOROLAC

Summary

It was studied in the effect of non-opioid analgesic ketorolac to TRPV1 in the model of spinal nociceptive action tail-flick and supraspinal nociceptive action Hot plate. It was found out that capsaicin moderate modulation of antinociceptive effect of ketorolac is exposed on the models of hot plate model and absence of effect at experimental inflammation. It was shown the influence of capsaicin on the antinociceptive effects of ketorolac on the Tail-flick model.

KEY WORDS: capsaicin, capsazepin, ketorolac vaniloid receptor TRPV1.

Отримано 11.07.11

Адреса для листування: О. Є. Ядловський, Інститут фармакології та токсикології АМН України, вул. Ежена Потье, Київ, 03680, Україна.

ВПЛИВ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ НА ГІДРАТАЦІЮ ЛЮФІЛІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ ТОНКОЇ КИШКИ

Методами ^1H ЯМР-спектроскопії та термогравіметрії проведено вивчення стану води у ліофілізованій тканині тонкої кишки щурів та впливу на неї суспензії препарату "Силікс", яку вводили перорально. Досліджено, що внутрішньотканинна вода присутня переважно у слабоасоційованому стані. Після регідратації частка сильноасоційованої води зростає. Дія на кишечник силіксу проявляється зменшенням середнього радіуса внутрішньотканинних порожнин, заповнених водою. Запропоновано схему гідратації тканин, яка пояснює сукупність отриманих експериментальних результатів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ЯМР-спектроскопія, гідратні структури, кремнезем, слабо- та сильно-асоційована вода.

ВСТУП. Високодисперсні кремнеземи (ВДК), синтезовані в процесі гідролізу хлоридів силіцію у полум'ї водневого пальника, широко застосовують у медичній практиці в ролі структуруючого компонента готових лікарських форм, ефективного ентеросорбенту, здатного адсорбувати велику кількість білкових речовин і зв'язаних з ними токсинів, а також біологічно активного матеріалу, що впливає на біодоступність лікарських препаратів [1, 4–6]. Тривалі медико-біологічні дослідження показали відсутність у ВДК помітної токсичності та негативного впливу на тканини організму лабораторних тварин, у тому числі й на кишечник, після їх систематичного контакту з аморфним кремнеземом [4]. На сьогодні ряд кремнеземів (силікс, біле вугілля, полісорб) широко використовують у медичній практиці. Проте механізм їх біологічної активності повністю не з'ясовано.

Метою даної роботи було вивчити зміни гідратних властивостей ліофілізованої тканини тонкої кишки щурів після тривалого контакту з ВДК.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Основним методом дослідження було обрано низькотемпературну ^1H ЯМР-спектроскопію [2, 7, 10]. Використання цього методу дозволяє за температурними змінами інтенсивності сигналу води (депресії температури замерзання) визначати

розмір водних поліасоціатів (кластерів), локалізованих у нанорозмірних порожнинах біоматеріалу, а за величиною хімічного зсуву зв'язаної води розраховувати ступінь асоційованості води. При цьому враховується той факт, що неасоційована вода (газова фаза, розчин у слабополярному розчиннику) має хімічний зсув протонів $\delta_{\text{H}} \approx 1,5$ м.ч., а тетракоординувана вода у льоді – $\delta_{\text{H}} \approx 7$ м.ч.

Досліди проводили на 5 білих нелінійних щурах-самцях із середньою масою 350–380 г. Під час експерименту (5 діб) усі тварини отримували стандартний раціон віварію з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч [3]. Тваринам дослідної групи протягом усього часу виконання експерименту щоденно внутрішньошлунково вводили 5 % водну суспензію силіксу в дозі 500 мг/кг 1 раз на добу. Щурам контрольної групи 1 раз на добу інтрагастрально вводили відповідний об'єм води.

З досліду тварин виводили шляхом дислокації шийних хребців під легким ефірним наркозом. Усі роботи проводили відповідно до стандартних операційних процедур, згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова.

Після розтину стінки черевної порожнини виділяли тонку кишку, яку ретельно промивали охолодженим 1,15 % розчином KCl. Матеріа-

© Л. П. Морозова, О. І. Штатсько, М. Б. Луцюк,
І. В. Таран, В. С. Маланич, В. В. Туров, 2012.

лом подальшого дослідження слугували відрізки кишки, які зважували, поміщали у стерильні контейнери і ліофілізували.

Перед фізико-хімічними вимірюваннями ліофілізовані відрізки кишки, що мали вигляд фрагментів масою до 100 мг, подрібнювали шляхом легкого розтирання в агатовій ступці до одержання однорідного порошку з розміром частинок близько 0,1 мм. Для приготування зразків 200–250 мг подрібненої тканини тонкої кишки поміщали в п'ятиміліметрову вимірювальну ампулу ЯМР і вимірювали спектри ЯМР у температурному інтервалі 200–280 К. У подальшому до зразка додавали 500 мкл дейтерохлороформу і повторювали вимірювання в середовищі органічного розчинника. Додаткові порції води вводили крізь органічну фазу. Після інтенсивного струшування зразок герметизували і зрівнювали при кімнатній температурі протягом тижня.

Спектри ЯМР одержували на ЯМР-спектрометрі високого розрішення (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зонduючий імпульс тривалістю 3 мкс. Температуру в датчику регулювали за допомогою термоприставки Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивність сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням процедури розкладання сигналу на його складові при припущенні гауссовської форми сигналу й оптимізації його нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розрішених сигналів була не меншою 5 %, а для сигналів, що перекриваються, – ± 10 %. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об'єктах концентрацію незамерзаючої води вимірювали при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Методику ЯМР-вимірювань і визначення термодинамічних характеристик та радіуса кластерів міжфазної води докладно описано в [2, 7, 10].

Для визначення геометричних розмірів кластерів адсорбованої води використовували рівняння Гіббса–Томсона, що зв'язує радіус сферичного або циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, локалізованого в порах радіуса R; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння можна використовувати для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності вели-

чини C_{uw} , отриманої на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням води, для водних суспензій твердих тіл або гідратованих біологічних об'єктів, коли застосування інших методів аналізу пористої структури ускладнене [2, 7, 10]. На практиці рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, в якому константа k для багатьох гетерогенних систем, що містять воду, близька до 50 [2, 9].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оскільки навіть після ліофілізації в біологічних тканинах залишається певна кількість води, для її визначення було використано метод термогравіметрії (рис. 1, а). На термогравіметричній кривій препарату кишкової тканини інтактною тварини (зразок Init.) фіксуються три основні ділянки швидкої втрати маси, розділені ділянками більш плавної зміни залежності $m(T)$. Перша з них, розташована в межах $50 < T < 170$ °C, стосується видалення фізично адсорбованої води. Відповідно до даних рисунка 1, а, її кількість складає близько 10 %. Ділянка в межах $280 < T < 400$ °C може бути віднесена на рахунок термічного руйнування біополімерів та їх осмолення, а остання ділянка ($400 < T < 670$ °C) – карбонізації продуктів термолізу та їх окиснення киснем повітря до вуглекислого газу. Практично ідентичну криву $m(T)$ (не наведено тут) було отримано і для тканини кишечника, що контактував із SiO_2 .

На рисунку 1, б показано зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР контрольного зразка Init. на повітрі. Спектр являє собою сильно розширений сигнал неправильної гауссовської форми, інтенсивність якого зменшується з зниженням температури відповідно до часткового замерзання зв'язаної води, а його хімічний зсув зміщується в ділянку слабких магнітних полів (більших величин хімічного зсуву). Відповідні залежності $C_{uw}(T)$ і $\delta_H(T)$ наведено на рисунку 1, в. При $T=280$ К величина δ_H не перевищує 2 м.ч., отже, згідно з [2, 7, 10], вона може кваліфікуватися як слабоасоційована (WAW). Як було показано в [2], якщо температура замерзання води перевищує 250 К, така вода є слабозв'язаною. Тоді до слабозв'язаної належить велика частина води, яка міститься у внутрішніх порожнинах кишкової тканини зразка Init., що контактує з повітряним середовищем (рис. 1, б).

Після замерзання WAW частина води, що залишилася в адсорбованому стані, має хімічний зсув, який відповідає сильноасоційованій воді (SAW). Його максимальна величина досягає 7,5 м.ч. (рис. 1, в). Отже, структура сітки

водневих зв'язків у такій воді наближається до структури гексагонального льоду [8].

Відповідно до рівняння (1), за депресією температури замерзання можна розрахувати розподіл за радіусами кластерів зв'язаної води, яка заповнює внутрішній простір між структурними елементами біополімерних або клітинних структур (рис. 1, г). Максимум розподілу відповідає кластерам води з радіусом $R \approx 4$ нм, хоча значна частина води (слабозв'язаної) входить до складу кластерів більшого розміру, аж до $R \approx 50$ нм.

Слід зазначити, що для біологічних об'єктів близькі за значеннями хімічні зсуви слабоасоційованої води можуть мати протони аліфатичних груп жирів, ліпідів і гідрофобних фрагментів деяких типів біополімерів. Однак при цьому величина їх хімічного зсуву не повинна залежати від температури. Хоча зазначені речовини у відчутній кількості й присутні в тканинах кишки, ймовірно, для використання твердих зразків їх сигнал занадто широкий (часи релаксації ядерних спінів малі) й не робить істотного внеску у вимірювану величину інтенсивності сигналу зв'язаної води.

Для зразка Init. заміна повітряного середовища на середовище слабополярного органічного розчинника – дейтерохлороформу призводить до істотної зміни вигляду спектрів ^1H ЯМР зв'язаної води (рис. 2, а). У спектрах стають помітними три сигнали сильноасоційованої води (SAW1–3), сигнал слабоасоційованої води і два сигнали (ASW1 і ASW2), які можуть бути віднесені не тільки до кластерів води (в яких кожна молекула бере участь в утворенні приблизно одного водневого зв'язку), але також і до окремих молекул води, адсорбованих на електрондонорних центрах, що входять до складу структурних елементів кишкової тканини.

Зі зниженням температури відбувається зменшення інтенсивності всіх сигналів зв'язаної води, причому максимальна зміна інтенсивності фіксується для сигналів WAW і SAW3. Під впливом середовища CDCl_3 температура замерзання WAW знижується, тобто частина міжфазної води стає сильнозв'язаною. Така трансформація свідчить про можливість участі слабополярного органічного середовища у формуванні структури кластерів води. Суттєве зменшення ширини сигналів міжфазної води в середовищі хлороформу може бути зумовлене двома основними факторами: зменшенням неоднорідного уширення, викликаного великою різницею у величинах магнітної сприйнятливості повітря і твердого зразка, та уповільненням під впливом рідкого середо-

вища молекулярного обміну між кластерами води, локалізованими в різних компартментах (порожнинах) усередині біоматеріалу. Для зразка тканини кишечника, що контактував з кремнеземом (зразок Af_{SiO_2} , рис. 2, б), у спектрах ^1H ЯМР спостерігаються тільки два сигнали – WAW і SAW3. Їх ширина значно більша, ніж для зразка Init.

Сукупність змін у спектрах ^1H ЯМР води, пов'язаної з тканинами кишки після їх ліофілізації (рис. 1, а і 2, а, б), можна пояснити на основі схеми (рис. 3).

Біоматеріал містить внутрішні порожнини різного розміру і форми, що позначені на рисунку 3, а S1–6, розмір яких може досягати десятків нм. Гідрофільно-ліпофільні властивості стінок пор у різних компартментах можуть різнитися, але на поверхні є значне число центрів, з якими молекули води можуть утворювати водневозв'язані комплекси, що є передумовою для формування в порах різного розміру кластерів сильноасоційованої води. Якщо води достатньо, то вона може заповнювати більшу частину об'єму пор, тоді розподіл за розмірами кластерів води відображає розподіл за розмірами внутрішніх порожнин. Завдяки динамічній рівновазі адсорбованої води і насиченої пари між компартментами S1–6 відбувається швидкий молекулярний обмін, що зумовлює наявність у повітряному середовищі тільки одного сигналу адсорбованої води, хімічний зсув якого визначається усередненим значенням хімічного зсуву всіх типів адсорбованої води. При заміні повітря на середовище слабополярного органічного розчинника (хлороформу) можливість молекулярного обміну через газове середовище усувається, і в спектрах можуть бути зареєстровані окремі сигнали, які відносять до різних типів компартментів (пор).

Оскільки поверхня внутрішніх порожнин (пор) утворена структурними елементами клітин, вони містять нерівності, розмір яких вимірюється десятими частками нм (рис. 3, б). Якщо поверхня гідрофобна, а внутрішній простір обмежений, то адсорбовані в таких порожнинах молекули води можуть взаємодіяти зі стінками лише за дисперсійним механізмом, не утворюючи водневозв'язаних комплексів, як з поверхнею, так і з іншими молекулами води (цьому перешкоджають просторові обмеження). Така вода в спектрах реєструється як слабоасоційована. Враховуючи співвідношення інтенсивностей сигналів WAW і SAW на рисунку 2, можна зробити висновок, що для вибраних зразків адсорбована вода є переважно слабоасоційованою.

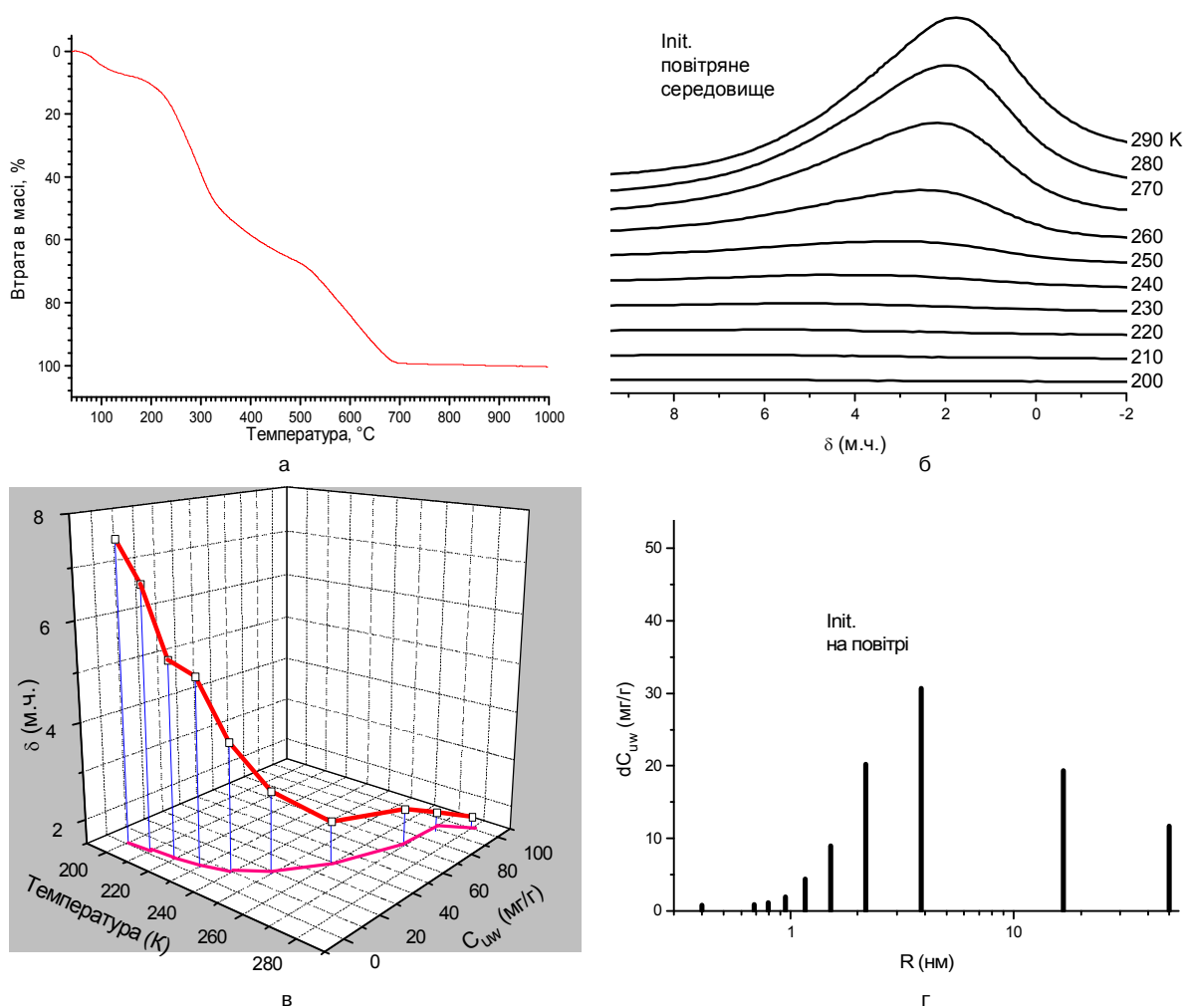


Рис. 1. Крива втрати маси (а); зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР зв'язаної води (б); залежності хімічного зсуву та концентрації незамерзаючої води від температури (в) і розподіл зв'язаної води за радіусами кластерів (г) для зразка Init. у повітряному середовищі.

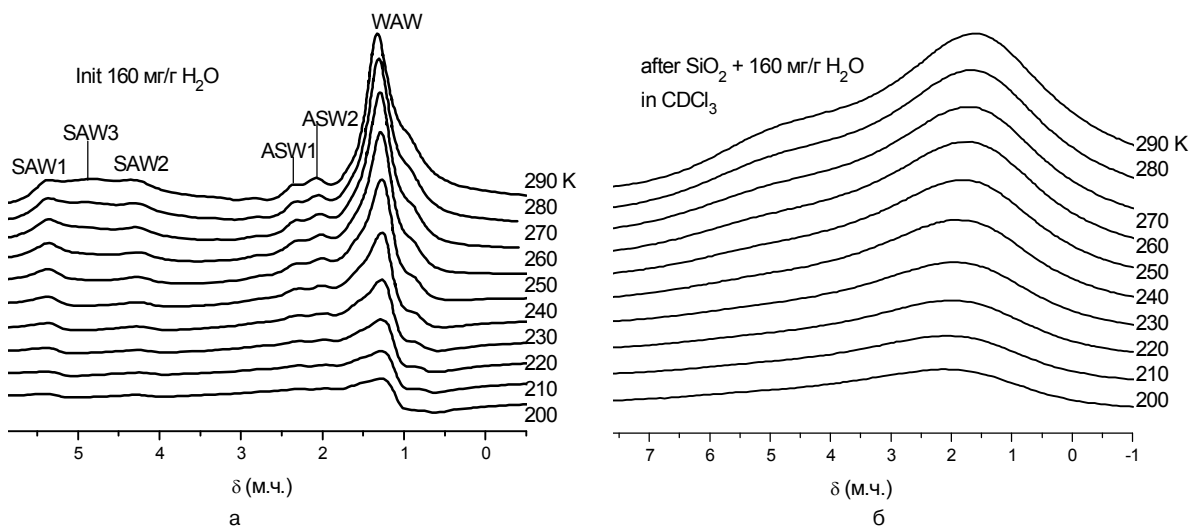


Рис. 2. Зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР води для зразка ліофілізованої тканини кишечника Init. (а) і після контакту із суспензією SiO_2 (б).

Відповідно до даних рисунка 2, більша частина WAW здатна замерзати зі зниженням температури. Це можливо тільки шляхом попе-

реднього утворення впорядкованої структури, подібної до структури гексагонального льоду. Ймовірно, його формування відбувається в

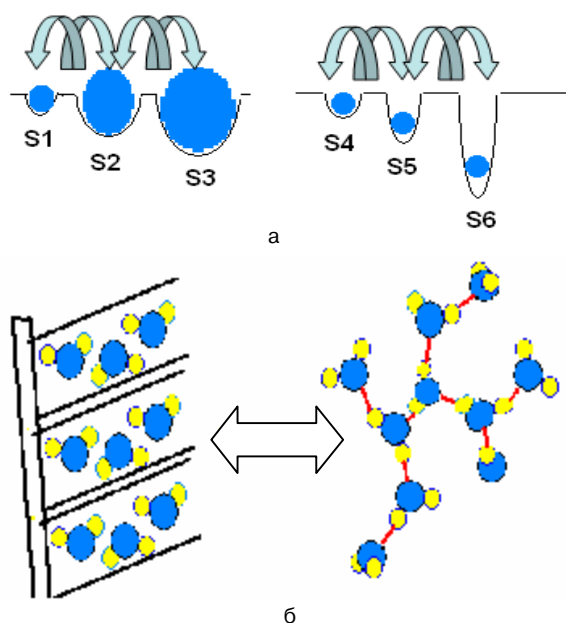


Рис. 3. Схема формування кластерів сильно- (а) і слабоасоційованої (б) води в ліофілізованій тканині кишки.

нанорозмірних порах, розташованих безпосередньо біля поверхні, що адсорбує воду за гідрофобним механізмом (рис. 3, б), причому виграш енергії в результаті формування впорядкованої сітки водневих зв'язків кластера льоду компенсує енергію переміщення молекул води із субнанометрових порожнин, локалізованих на гідрофобних ділянках поверхні біоматеріалу.

На рисунку 4 наведено результати порівняльних досліджень гідратних властивостей зразків ліофілізованих тканин кишки Init. і Af_{SiO₂}. Вимірювали температурні залежності концентрації сильнозв'язаної води (рис. 4, а, б) і розраховані на їх основі за рівнянням (1) розподіли за радіусами кластерів SAW (рис. 4, в, г). Аналогічні розрахунки для WAW не проводили, оскільки, як зазначалося вище, замерзання слабоасоційованої води може відбуватися зі зміною місця її локалізації і вони не відображають дійсної будови внутрішніх порожнин, що адсорбують WAW.

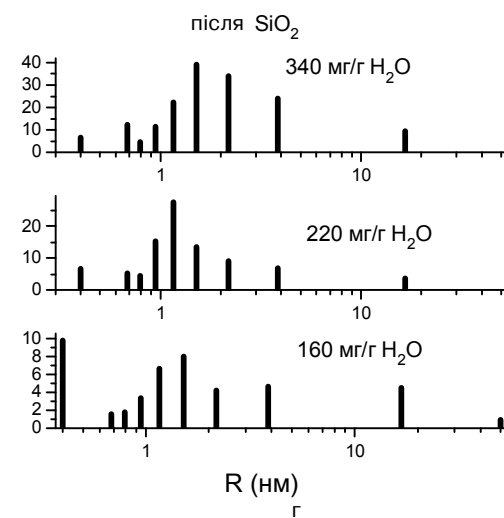
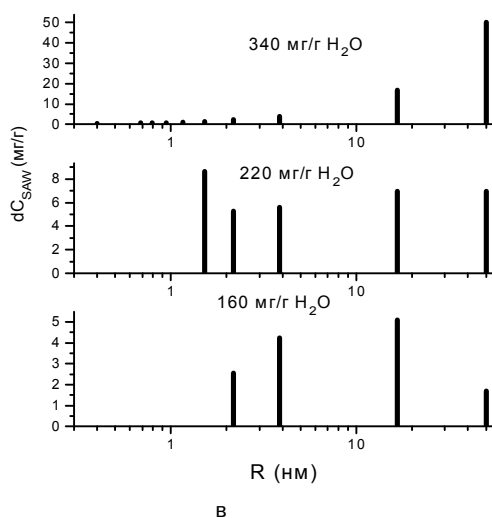
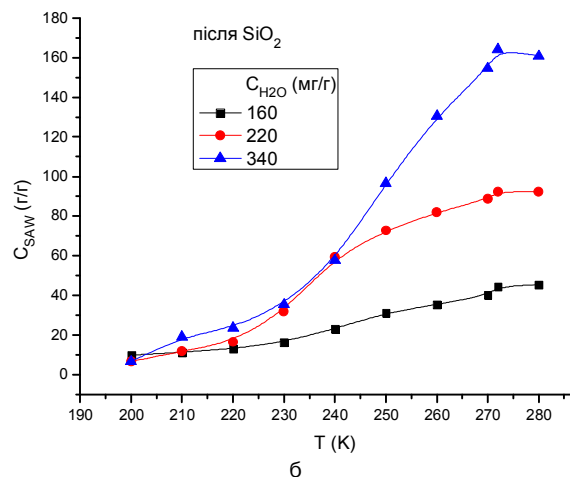
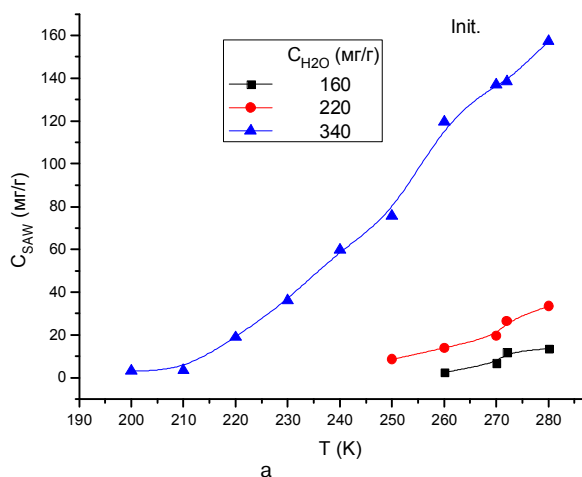


Рис. 4. Зміна з температурою концентрації сильнозв'язаної води SAW3 (а, б) і розподіли за радіусами кластерів SAW3 (в, г) для зразка ліофілізованої тканини кишечника Init. (а, в) і тканини, що контактувала із суспензією SiO₂ (б, г).

Відмінності в характері залежностей $C_{\text{SAW}}(T)$ (рис. 4, а, б) виявилися суттєвими. Так, якщо для зразка Init. при $C_{\text{H}_2\text{O}}=160$ і 220 мг/г сильноасоційована вода (SAW3) фіксується тільки при $T \geq 250$ К, то для зразка Af_{SiO₂} – у всьому доступному для вимірювання діапазоні температур. Ці відмінності зумовлені формуванням у тканинах різних систем кластерів сильноасоційованої води.

При $C_{\text{H}_2\text{O}}=160$ мг/г у зразку Init. г (рис. 4, в) спостерігаються кластери SAW з радіусами 11–50 нм. У зразку Af_{SiO₂} (рис. 4, г) максимум розподілу $dC_{\text{SAW}}(R)$ зміщується в бік зменшення значень R , причому значна частина кластерів має радіус $R < 0,5$ нм. Ця тенденція зберігається і при збільшенні вмісту води у зразку. При $C_{\text{H}_2\text{O}}=340$ мг/г у контрольному зразку більша частина води входить до складу кластерів з $R=50$ нм, тоді як у зразку Af_{SiO₂} середній розмір кластерів SAW становить 1–3 нм.

ВИСНОВКИ. Під впливом високодисперсного кремнезему середній розмір кластерів води в регідратованій після ліофілізації тканині кишки лабораторних тварин істотно зменшився. Оскільки отримані розподіли $dC_{\text{SAW}}(R)$ відображають реальні розподіли внутрішніх порожнин (пор), які містяться в біоматеріалі, можна стверджувати, що тканина кишки після впливу суспензії кремнезему стала більш однорідною. З іншого боку, в ній зменшилася кількість слабоасоційованої води, зв'язаної за механізмом гідрофобної гідратації. Це свідчить про зменшення доступних для адсорбованих молекул води гідрофобних порожнин субнанометрового розміру. Ймовірно, поверхня зразка тканини кишки Af_{SiO₂} стає більш гідрофільною, і у вузьких нанопорах формується більша кількість кластерів сильноасоційованої води. Можливо, ці зміни лежать в основі феномена процесів всмоктування і секреції в кишечнику *in vivo*, зазначеного в наших попередніх експериментах [4].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вильцанюк А. А. Энтеросорбция в комплексном лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости / А. А. Вильцанюк, И. И. Геращенко. – Харьков, 2009. – 128 с.
2. Гунько В. М. Вода на межфазной границе / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наукова думка, 2009. – 694 с.
3. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – 3-е изд., перераб. и доп. – К. : Вища школа, 1983. – 383 с. (Гл. 9. Крысы. – С. 243–277.)
4. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А. А. Чуйко. – К. : Наукова думка, 2003. – 375 с.
5. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии / под ред. А. П. Шпака, В. Ф. Чехуна, составители П. П. Горбик, В. В. Пуров. – К. : Наукова думка, 2011. – 444 с.
6. Полимеры в фармации / под ред. А. И. Тенцовой, М. Т. Алюшина. – М. : Медицина, 1985. – 252 с.
7. Туров В. В. Кластеризованная вода и пути ее использования / В. В. Туров, В. М. Гунько. – К. : Наукова думка, 2011. – 313 с.
8. Kinney D. R. Water and the Silica Surface As Studied by Variable Temperature High Resolution ¹H NMR / D. R. Kinney, I. S. Chaung, G. E. Maciel // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – **115**. – P. 6786–6794.
9. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – **54**. – P. 97–122.
10. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turrov, Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – **118**, № 1–3. – P. 125–172.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА ГИДРАТАЦИЮ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ ТОНКОЙ КИШКИ

Резюме

Методами ^1H ЯМР-спектроскопии и термогравиметрии проведено изучение состояния воды в лиофилизированной ткани тонкой кишки крыс и влияния на нее перорально вводимой суспензии препарата "Силикс". Обнаружено, что внутритканевая вода присутствует преимущественно в слабоассоциированном состоянии. После регидратации доля сильноассоциированной воды возрастает. Воздействие на кишечник силикса проявляется уменьшением среднего радиуса внутритканевых полостей, заполненных водой. Предложена схема гидратации тканей, объясняющая совокупность полученных экспериментальных результатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЯМР-спектроскопия, гидратные структуры, кремнезем, слабо- и сильноассоциированная вода.

L. P. Morozova, O. I. Shtatko, M. B. Lutsyuk, I. V. Taran, V. S. Malanitch, V. V. Turov
O. O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY NAS OF UKRAINE, KYIV

EFFECT OF HIGHLY DISPERSED SILICA ON HYDRATION LIOPHILIZED TISSUE OF SMALL INTESTINE

Summary

By methods of ^1H NMR spectroscopy and thermogravimetry there was conducted the study of the water state in lyophilized rat intestinal tissue and the influence of preparation "Silics" suspension, which was administered orally. It was determined that interstitial water is present mainly in weakly associated condition. After rehydration the part of strongly associated water increased. Action of "Silics" on small intestine manifested as decrease of the average radius of interstitial cavities filled with water. It was proposed the scheme of tissue hydration, which explained a set of experimental results.

KEY WORDS: NMR spectroscopy, hydrated structures, silica, weakly and strongly associated water.

Отримано 21.11.11

Адреса для листування: Л. П. Морозова, вул. Писарева, 3, кв. 93, Вінниця, 21036, Україна.

АКТИВНІСТЬ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ У ЛІПОСОМАЛЬНІЙ ФОРМІ
СТОСОВНО *Staphylococcus aureus*

Було встановлено, що антимікробна активність ліпосомального лінкоміцину і ліпосомального бензоїлпероксиду, отриманих на основі яєчного лецитину, відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* вища, ніж антимікробна активність розчину лінкоміцину і бензоїлпероксиду, в 3 і 14 разів відповідно. Негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів та лінкоміцину, більш ефективні, ніж нейтральні ліпосоми: їх мінімально пригнічувальна концентрація (МПК) у 7 разів менша МПК лінкоміцину відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus*. Бензоїлпероксид у комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності й більш широким спектром дії відносно *Staphylococcus aureus*, ніж кожний із препаратів окремо.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпосоми, мінімально пригнічувальна концентрація, стафілокок *Staphylococcus aureus*, лінкоміцин, бензоїлпероксид.

ВСТУП. Шкіра хворих на atopічний дерматит засяяна різними мікроорганізмами, кількість яких значно більша, ніж на шкірі здорових людей. Так, наприклад, золотавий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) висівається зі шкіри хворих на atopічний дерматит у 80–100 % випадків. При шкірних захворюваннях мікробної етіології в більшості випадків основу медикаментозного лікування і профілактики складають антибіотики. Широке застосування антибіотиків має негативні наслідки, одним з яких є вироблення у збудників лікарської резистентності до пеніциліну, гентаміцину, тетрацикліну, метициліну, лінкоміцину, сульфаніламідів, а також до антибіотиків нового покоління: фторхінолонів, цефалоспоринов II і III поколінь, глікопептидів.

У зв'язку з цим, проблема профілактики і лікування інфекційних захворювань залишається актуальною. Одним зі шляхів її вирішення є впровадження в медичну практику нових хіміотерапевтичних засобів.

Необхідність пошуку нових наночасток і ліпосомальних форм лікарських препаратів зумовлена недостатньою ефективністю і токсичністю існуючих антибіотиків, зростанням резистентності до них мікроорганізмів. Відомо, що наночастки і ліпосомальні форми лікарських засобів дозволяють значно підвищити ефективність препаратів, знизити їх токсичність, терапевтичні дози і якісно змінити ха-

© Н. М. Іванова, Г. І. Мавров, С. А. Деркач, Е. В. Коцар, 2012.

рактер їх дії. Так, у роботі [4] було показано, що, незважаючи на низькі концентрації, ефективність ліпосомального бензилпеніциліну для інгібування росту бактеріальної біоплівки золотавого стафілокока була вищою, ніж інтактного бензилпеніциліну.

У зв'язку з вищевикладеним, метою дослідження було вивчити ефективність дії антимікробних речовин у ліпосомальній формі стосовно *Staphylococcus spp.*

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі було використано: 10 % спиртовий розчин яєчного лецитину (ЗАТ "Біолік", Україна), ДМСО (Росія), суміш полярних ліпідів з негативним зарядом, отриману за оригінальною технологією, розробленою Н. М. Івановою [3]. Штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 отримано з Інституту мікробіології й імунології імені І. І. Мечникова АМН України. У роботі також застосовували субстанцію бензоїлпероксиду (Aldrich, США), лінкоміцин (ЗАТ "Дарниця", Україна), агар Мюллера-Хінтона (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія)), м'ясо-пептонний бульйон.

Одержання ліпосом. Ліпосоми одержували методом випарювання ліпідів на вакуумному ротаційному випарювачі ("Vakuum-Rotation", Німеччина) з наступним суспендуванням у забуференому фізіологічному розчині з рН 7,4 і озвучуванням на диспергаторі УЗДН-А (Росія). Озвучування ліпосом проводили при охолодженні до 2–4 °С.

Одержання ліпосомальної форми антимікробних препаратів. Субстанцію бензоїлпероксиду (БП) розчиняли в хлороформі у зв'язку з його поганою розчинністю у водних розчинах і додавали до спиртових або хлороформних розчинів ліпідів у співвідношенні бензоїлпероксид:ліпіди 1:10, 1:20. Далі суміш випарювали й одержували ліпосоми, як зазначено вище.

Визначення розміру ліпосом. Розмір ліпосом визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності досліджуваної ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450–700 нм [2], розмір ліпосом складав 160–180 нм.

Очищення антибіотиків, які були інтеркольовані, від тих, що не були інтеркольовані, здійснювали шляхом ультрацентрифугування (центрифуга MSE-Superspeed 65, Англія) протягом години при 100 000 g. Вихід ліпосом визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм.

Визначення МПК антимікробних препаратів і їх ліпосомальних форм проводили мікротитраційним способом. Антибіотик і бензоїлпероксид розводили методом серійних розведень середовищем МПБ у плоскодонних планшетах, додавали до культури *Staphylococcus aureus*, інкубували при 34 °C протягом 24 год. Контролем слугувала культура *Staphylococcus aureus* без антимікробних речовин. Після цього висівали на щільне середовище Мюллера-Хінтона для визначення мінімально пригнічувальної концентрації (МПК).

Ефективність спільної антимікробної дії лінкоміцину та бензоїлпероксиду стосовно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* визначали за допомогою методу checkerboard.

Мінімально пригнічувальною вважали найменшу концентрацію, що затримувала ріст *Staphylococcus aureus* протягом періоду інкубації.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Серед антибіотиків ми зупинилися на лінкоміцині, що належить до групи лінкозамідів. Він має бактериостатичну дію щодо широкого спектра мікроорганізмів, при підвищенні дози проявляє бактерицидну дію. Протимікробний механізм дії лінкоміцину полягає в інгібуванні синтезу білків у клітинах мікроорганізмів. Препарат активний відносно грампозитивних аеробних і анаеробних мікроорганізмів, у тому числі *Staphylococcus spp.*

Бензоїлпероксид сам проявляє широкий спектр антимікробної дії. Він активний відносно бактерій, у тому числі й резистентних до анти-

біотиків. При визначенні МПК лінкоміцину і бензоїлпероксиду спочатку було використано ліпосоми (Лс) на основі яєчного лецитину (ФХ), тому що він є м'яким ліпідом і традиційно застосовується в ліпосомології. Співвідношення антибіотика і лецитину складало 1:20. У результаті визначення МПК лінкоміцину та його ліпосомальної форми встановлено, що ліпосоми, отримані на основі ФХ і лінкоміцину, більш ефективні, ніж розчин лінкоміцину при дії на планктонні клітини *Staphylococcus aureus* (рис. 1, № 2). МПК ліпосом цього складу була в 3 рази меншою, ніж МПК лінкоміцину.

У наступному експерименті для одержання ліпосомальної форми лінкоміцину ми використовували суміш полярних ліпідів з великим негативним зарядом, тому що в наших попередніх роботах було показано, що негативний заряд ліпосом істотно збільшує відсоток включення антибіотиків у ліпосоми [1].

Негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів і лінкоміцину, були найбільш ефективними, їх МПК була в 7 разів меншою МПК лінкоміцину відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* (рис. 1, № 3).

При визначенні МПК ліпосомальної форми бензоїлпероксиду на основі яєчного лецитину встановлено, що його МПК складала 31 мкг/мл, що було в 14 разів менше МПК бензоїлпероксиду, розчиненого у ДМСО.

Наступним етапом роботи було вивчення спільної дії лінкоміцину і БП на планктонні клітини *Staphylococcus aureus*. Дію лінкоміцину і БП у комбінації вивчали методом checkerboard.

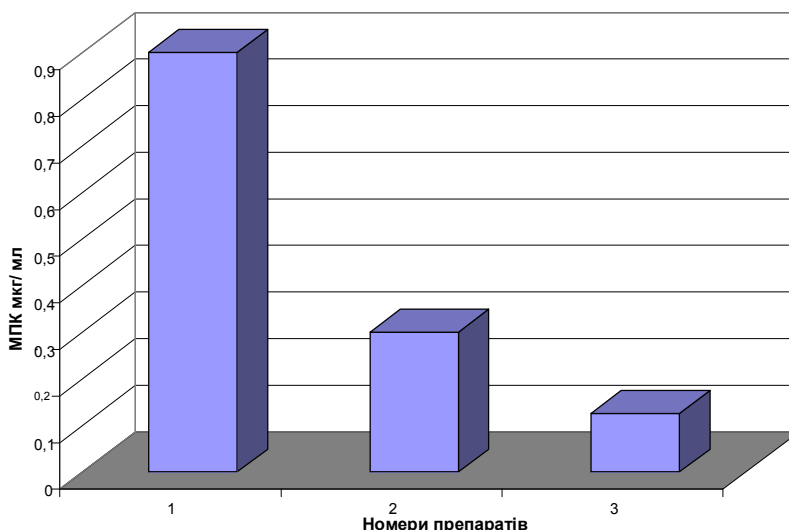
Особливістю методу checkerboard є те, що при вивченні комбінованого ефекту лінкоміцину вноситься від більшої концентрації (лунка № 1) послідовно до меншої концентрації (до лунки № 11, лунка № 12 – контроль – культура *Staphylococcus aureus* без антибіотика), більша концентрація БП вноситься в лунку № 11, а зменшені концентрації – аж до лунки № 1. Розраховують МПК для лінкоміцину і БП окремо та в комбінації. Визначають фракційний індекс інгібуючої концентрації ФІК за формулою:

$$\text{ФІК} = \frac{\text{МПК лінкоміцину в комбінації/МПК лінкоміцину одного} + \text{МПК БП у комбінації/МПК БП одного}}{2}$$

При цьому якщо $\text{ФІК} < 0,5$, то відзначається синергізм дії антимікробних речовин, якщо $\text{ФІК} 0,5 - < 1,0$ – адитивність, якщо $\text{ФІК} 1,0 - < 4,0$ – індіферентність і якщо $\text{ФІК} > 4,0$ – антагонізм.

Отримані результати відображено в таблиці 1.

Дані таблиці вказують на те, що БП є ефективним стосовно *Staphylococcus aureus* і в



№ 1 – розчин лінкоміцину, № 2 – ліпосомальний лінкоміцин на основі ФХ, № 3 – ліпосомальний лінкоміцин на основі полярних ліпідів з негативним зарядом.

Рис. 1. Мінімально пригнічувальна концентрація лінкоміцину і його ліпосомальних форм.

Таблиця 1 – Ефективність антимікробної дії лінкоміцину і БП стосовно планктонних клітин *Staphylococcus aureus*

МПК, мкг/мл			ФІК	Ефект комбінованого застосування лінкоміцину+БП
лінкоміцин	БП	лінкоміцин+БП		
0,9	440	0,2+175	0,62	адитивність

комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності й більш широким спектром дії відносно *Staphylococcus aureus*, ніж кожний із препаратів окремо.

Отримані дані свідчать про можливість спільного застосування антибіотиків та бензоїлпероксиду при лікуванні *Staphylococcus aureus*.

ВИСНОВКИ. 1. Установлено, що мінімально пригнічувальна концентрація ліпосомальної форми антибіотика лінкоміцину з нейтральним зарядом (лецитинові ліпосоми) стосовно *Staphylococcus aureus* зменшувалась, порівняно з мінімально пригнічувальною концентрацією розчину лінкоміцину, в 3 рази.

2. Негативно заряджені ліпосоми, що містять лінкоміцин, зменшували його мінімально пригнічувальну концентрацію стосовно *Staphylococcus aureus* у 7 разів.

3. Мінімально пригнічувальна концентрація ліпосомальної форми антимікробного препарату бензоїлпероксиду з нейтральним зарядом (лецитинові ліпосоми) стосовно *Staphylococcus aureus* зменшувалась, порівняно з мінімально пригнічувальною концентрацією бензоїлпероксиду, в 14 разів.

4. Бензоїлпероксид є ефективним стосовно *Staphylococcus aureus* і в комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вітчизняний антибіотик ципрофлоксацин для інфузій: протимікробні властивості та створення на його основі ліпосомальної форми / А. Я. Циганенко, Л. Г. Алмакаєва, Н. І. Коваленко [та ін.] // Вісник Вінницького Державного Медичного Університету. – 2002. – 6. – С. 367–368.

2. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде : учебно-методическое пособие по биоорганической химии / под ред. Г. М. Сорокоумова, А. А. Селищева, А. П. Каплун. – М., 2000. – 105 с.

3. Hard charged liposomes inhibit complement – induced haemolysis / N. N. Ivanova, A. P. Kaplun, V. I. Shvets [et al.] // 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Proceeding. Abstracts. – Стокгольм, 1997. – P. 757–758.

4. Kim H. J. The delivery of benzyl penicillin to *Staphylococcus aureus* biofilms by use of liposomes / H. J. Kim, Jones M. N. // J. Liposome Res. – 2004. – № 14. – P. 123–139.

Н. Н. Иванова, Г. И. Мавров, С. А. Деркач, Е. В. Коцар
ИНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ ПО ОТНОШЕНИЮ К STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Резюме

Было установлено, что антимикробная активность в отношении планктонных клеток *Staphylococcus aureus* липосомального линкомицина и липосомального бензоилпероксида, полученных на основе яичного лецитина, выше, чем антимикробная активность раствора линкомицина и бензоилпероксида, в 3 и 14 раз соответственно. Отрицательно заряженные липосомы, полученные на основе полярных липидов и линкомицина, более эффективны, чем нейтральные липосомы: их МПК в 7 раз меньше МПК линкомицина в отношении планктонных клеток *Staphylococcus aureus*. Бензоилпероксид в комбинации с линкомицином владеет адитивностью антимикробной активности и более широким спектром действия по отношению к *Staphylococcus aureus*, чем каждый из препаратов отдельно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липосомы, минимально подавляющая концентрация, стафилококк *Staphylococcus aureus*, линкомицин, бензоилпероксид.

N. M. Ivanova, H. I. Mavrov, S. A. Derkach, E. V. Kotsar
INSITUTE OF DERMATOLOGY AND VENEROLOGY OF AMS OF UKRAINE, KHARKIV

ACTIVITY OF LIPOSOMAL ANTIMICROBIC PREPARATIONS CONCERNING STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Summary

It was found out the antimicrobial activity of liposomal lincomycin and liposomal benzoyl peroxide above, than antimicrobial activity of the lincomycin solution and benzoyl peroxide in 3 and 14 times accordingly concerning planktonic cells *Staphylococcus aureus*. Negatively charged liposomes received on the basis of polar lipids and lincomycin were more effective, than neutral liposomes. Minimum inhibitory concentration of them less of minimum inhibitory concentration of lincomycin in 7 times concerning planktonic cells of *Staphylococcus aureus*. The combination of benzoyl peroxide with lincomycin led to additive activities against *Staphylococcus aureus* and has given its wider antimicrobial activity than each of preparations.

KEY WORDS: the liposomes, minimum inhibitory concentration, *Staphylococcus aureus*, lincomycin, Benzoyl peroxide.

Отримано 12.09.11

Адреса для листування: Н. М. Иванова, вул. Шарикова, 53, кв. 181, Харків, 61189, Україна.

**СКРИНІНГ ПОТЕНЦІЙНИХ АНАЛГЕТИКІВ СЕРЕД ПОХІДНИХ
4-(ГІДРОКСІ)-2-ОКСО-1,2-ДИГІДРОХІНОЛІН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ
НА МОДЕЛІ “ОЦТОВОКИСЛИХ КОРЧІВ”**

Проведено скринінгові дослідження серед похідних 4-(гідроксі)-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот, які спрямовані на пошук нових потенційних аналгетиків, на моделі “оцтовокислих корчів”. За результатами досліджень встановлено, що максимальну аналгетичну активність проявляє речовина під лабораторним шифром ВО-60. Її аналгетична активність у дозі 20 мг/кг дорівнює 75,3 %.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: аналгетики, скринінг, аналгетична активність.

ВСТУП. На сьогодні можна, безсумнівно, вважати, що біль належить до найпоширеніших скарг пацієнтів і значною мірою формує стан організму хворого в цілому [1, 6]. Відомо, що саме з інтенсивним больовим синдромом звертаються до лікарів майже 65 % пацієнтів [6, 7].

Аналгетичні засоби, хоча й використовуються сьогодні у великих об'ємах, усе ж мають широкий спектр небажаних ефектів, прояв яких у багатьох випадках є причиною припинення лікування обраним лікарським засобом [5]. Однією з найбільш розповсюджених побічних реакцій нестероїдних протизапальних лікарських засобів (близько 30 % випадків) є гастротоксичність, що проявляється ураженням слизових оболонок з формуванням ерозій та виразок. Інші небажані ефекти, хоча і зустрічаються рідше, однак можуть спричинити небезпечні для життя стани, такі, як шлунково-кишкові кровотечі, анафілактичний шок, гострий набряк легень, кардіоваскулярні реакції, лікарський вовчак [2, 5].

Тому зрозуміло, що вимоги до нових знеболювальних засобів дуже суворі. Перш за все до них можна віднести високу фармакотерапевтичну активність, мінімальну кількість побічних реакцій, а також доступність для пацієнта [2, 4].

Саме тому цілеспрямований пошук високоєфективних та нешкідливих знеболювальних лікарських засобів є актуальною проблемою сучасної медицини, і особливу увагу

приділяють сполукам з принципово новою хімічною структурою. До таких сполук можна віднести і досліджувані нами речовини, що за своєю хімічною структурою не мають аналогів серед аналгетичних засобів та є похідними 4-гідроксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот, тому і виступають речовинами, перспективними для використання як знеболювальних препаратів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 552 білих мишах обох статей масою 18–23 г. Піддослідних тварин утримували в стандартних умовах віварію Луганського державного медичного університету при природному освітленні й вільному доступі до води та їжі. Усі дослідження проводили відповідно до міжнародних правил поводження з тваринами (Директива 86/309 Європейської спільноти від 24 грудня 1986 р.), комісії з біоетики Луганського державного медичного університету (наказ від 02.09.09 № 6) та рекомендацій ДЕЦ МОЗ України [3]. Знеболювальну дію потенційних аналгетиків вивчали на моделі “оцтовокислих корчів”. При відтворенні даного патологічного стану введення оцтової кислоти сприяє загальній активації ноцицептивної системи тварини і місцевому вивільненню брадикініну, гістаміну, серотоніну, простагландинів, лейкотриєнів та інших медіаторів болю, що призводить до розвитку мимовільних скорочень м'язів живота – “корчів”, які супроводжуються витягуванням задніх кінцівок і

вигинанням спини. Саме тому дослідження аналгетичної активності (АА) знову синтезованих сполук на моделі "оцтовокислих корчів" дозволяє визначити вплив досліджуваної речовини відразу на всі медіатори периферичного компонента болю [3].

"Оцтовокислі корчі" відтворювали шляхом внутрішньочеревного введення 0,6 % розчину оцтової кислоти з розрахунку 0,1 мл на 10 г маси тіла тварини. Хімічний подразник вводили через 1 год після введення досліджуваних сполук з наступним спостереженням за мишами протягом 20 хв та визначенням кількості "корчів". Тварини контрольної групи в еквівалентній кількості отримували 0,9 % розчин натрію хлориду. Як препарати порівняння використовували метамізол натрію ("Анальгін-Дарниця", 50 %, 2 мл) перорально в дозі 55 мг/кг та диклофенак натрію ("Наклофен", 75 мг/3 мл, KRKA, Словенія) перорально в дозі 5 мг/кг. Усі досліджувані речовини вводили перорально одноразово в дозі 20 мг/кг за 1 год до відтворення патології у вигляді суспензій, які готували ex tempore загальноприйнятими методами з використанням емульгатора Twin-80.

Аналгетичну активність оцінювали за здатністю речовини зменшувати кількість "корчів" у дослідній групі порівняно з контрольною і виражали у відсотках. Розрахунок проводили за формулою:

$$AA = \frac{C_k - C_d}{C_k} \cdot 100 \%,$$

де АА – аналгетична активність, %;

Ск – середня кількість "корчів" у контрольній групі;

Сд – середня кількість "корчів" у дослідній групі.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента та непараметричних методів аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати проведених досліджень показали, що під впливом подразнювального агента (оцтова кислота) в мишей формується виражений больовий синдром, який протягом перших 20 хв проявляється скороченнями м'язів живота у кількості $83 \pm 1,3$ (табл.).

Таблиця – Аналгетична активність потенційних аналгетиків на моделі "оцтовокислих корчів" (n=6)

Шифр	Середня кількість "корчів"	АА, %	Шифр	Середня кількість "корчів"	АА, %
1	2	3	4	5	6
I серія					
BO-1	$25 \pm 1,03^*$	$69,8 \pm 1,24$	BO-8	$44,3 \pm 1,7^*$	$46,5 \pm 2,1$
BO-2	$64,8 \pm 1,6^*$	$21,8 \pm 2,0$	BO-9	$68,3 \pm 1,1^*$	$17,6 \pm 1,2$
BO-3	$28,6 \pm 1,2^*$	$65,4 \pm 1,44$	BO-10	$78,8 \pm 2,1$	$5,1 \pm 2,6$
BO-4	$54 \pm 1,1^*$	$34,9 \pm 1,3$	BO-11	$66,6 \pm 1,8^*$	$19,6 \pm 2,2$
BO-5	$50 \pm 1,3^*$	$39,5 \pm 1,4$	BO-12	$49,5 \pm 1,4^*$	$40,3 \pm 1,78$
BO-6	$50 \pm 1,2^*$	$39,5 \pm 1,4$	BO-13	$69,5 \pm 1,9^*$	$16,2 \pm 2,3$
BO-7	$42,1 \pm 1,2^*$	$49,1 \pm 1,5$			
II серія					
BO-14	$59,3 \pm 2,6$	$28,5 \pm 3,1$	BO-19	$50,3 \pm 2,5^*$	$39,3 \pm 3,1$
BO-15	$29,6 \pm 2,4^*$	$64,2 \pm 2,9$	BO-20	$41,3 \pm 3,1^*$	$50,2 \pm 3,8$
BO-16	$37,8 \pm 2,2^*$	$54,4 \pm 2,6$	BO-21	$41,3 \pm 3,1^*$	$50,2 \pm 3,8$
BO-17	$63 \pm 2,5^*$	$24,1 \pm 3$	BO-22	$53,1 \pm 2,3^*$	$35,9 \pm 2,7$
BO-18	$54,8 \pm 2,4^*$	$33,9 \pm 2,9$	BO-23	$64,6 \pm 1,8^*$	$22,1 \pm 2,1$
III серія					
BO-24	$67,3 \pm 2,4^*$	$18,8 \pm 2,9$	BO-36	$55,6 \pm 2,2^*$	$32,9 \pm 2,6$
BO-25	$64,1 \pm 2^*$	$22,6 \pm 2,4$	BO-37	$53,7 \pm 1,5^*$	$35,1 \pm 1,8$
BO-26	$52,6 \pm 2,3^*$	$36,5 \pm 2,8$	BO-38	$46 \pm 2,1^*$	$44,3 \pm 2,6$
BO-27	$32,6 \pm 2,4^*$	$60,6 \pm 2,9$	BO-39	$48,1 \pm 1,9^*$	$41,9 \pm 2,3$
BO-28	$62,8 \pm 2,3^*$	$24,2 \pm 2,8$	BO-40	$63,1 \pm 2,2^*$	$23,8 \pm 2,7$
BO-29	$55,6 \pm 2,9^*$	$32,9 \pm 3,5$	BO-41	$71,6 \pm 1,5^*$	$13,6 \pm 1,8$
BO-30	$59,3 \pm 2^*$	$28,5 \pm 2,4$	BO-42	$78,5 \pm 1,7^*$	$5,4 \pm 2$
BO-31	$62,1 \pm 1,8^*$	$25,1 \pm 2,2$	BO-43	$64,5 \pm 1,8^*$	$22,2 \pm 2,2$
BO-32	$43 \pm 1,7^*$	$48,1 \pm 2,1$	BO-44	$83,5 \pm 1,7$	$-0,6 \pm 2,1$
BO-33	$71 \pm 1,7^*$	$14,4 \pm 2$	BO-45	$51,5 \pm 1,7^*$	$37,9 \pm 2,1$
BO-34	$46,5 \pm 2^*$	$43,9 \pm 2,4$	BO-46	$54,1 \pm 1,9^*$	$34,7 \pm 2,2$
BO-35	$59,3 \pm 1,1^*$	$28,5 \pm 1,3$			

1	2	3	4	5	6
IV серія					
BO-47	27,8±1,1*	66,6±1,3	BO-58	44,3±1,8*	46,5±2,2
BO-48	57,8±2,1*	30,3±2,5	BO-59	27±1*	67,4±1,2
BO-49	46±1,5*	44,5±1,8	BO-60	20,5±1,4*	75,3±1,7
BO-50	45,1±4,5*	45,5±5,4	BO-61	30,5±1,4*	63,2±1,7
BO-51	38,1±1*	54±1,2	BO-62	41±1,7*	50,6±2,1
BO-52	72,6±1,1*	12,4±1,3	BO-63	49,1±1,7*	40,7±2
BO-53	51,6±4*	37,7±4,4	BO-64	50,1±1,9*	39,5±2,3
BO-54	53,5±0,7*	36,5±0,9	BO-65	53,5±1,5*	35,5±1,8
BO-55	38,5±0,7*	53,6±0,9	BO-66	55,6±2,2*	32,9±2,7
BO-56	38,6±1,4*	53,4±1,7	BO-67	47,5±2,5*	42,7±3
BO-57	50,1±2,3*	39,5±2,8			
V серія					
BO-68	57,8±3*	30,3±3,6	BO-81	45,6±1*	44,9±1,2
BO-69	46,3±2*	44,1±2,4	BO-82	52,1±1,2*	37,1±1,5
BO-70	42,3±1,9*	48,99±2,3	BO-83	66,1±1,6*	20,2±1,9
BO-71	55,1±1,5*	33,5±1,8	BO-84	52,6±1*	36,5±1,2
BO-72	67,1±2,3*	19±2,7	BO-85	61±1,3*	26,5±1,6
BO-73	70,8±1*	14,6±1,2	BO-86	58,5±1,6*	29,5±1,9
BO-74	52,8±1,4*	36,3±1,7	BO-87	63,1±2,3*	23,8±2,8
BO-75	49,8±1,3*	39,9±1,6	BO-88	69,6±1,3*	16±1,6
BO-76	42,5±2,3*	48,7±2,8	BO-89	51,3±1,7*	38,1±2
BO-77	58,8±2,3*	29,1±2,8	BO-90	53,6±1,3*	35,3±1,6
BO-78	58,5±1,5*	29,5±1,9	BO-91	49±1*	40,9±1,2
BO-79	44,8±1,3*	45,9±1,6	BO-92	47,6±1,2*	42,5±1,5
BO-80	43,8±1,4*	47,1±1,6			
Препарати порівняння					
Метамізол натрію	53,8±1,4*	35,1±1,7	Диклофенак натрію	40,1±2,3*	51,6±2,8

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи тварин.

Аналіз наведених у таблиці результатів досліджень показав, що найбільш виражену знеболювальну активність проявили сполуки під лабораторним шифром BO-1, BO-3, BO-15, BO-27, BO-47, BO-59, BO-60, BO-61, аналгетична активність яких, відповідно, склала 69,87, 65,4, 64,2, 60,4, 66,6, 67,4, 75,3, 63,2 %. Слід зазначити, що АА сполуки-лідера BO-60 значно перевищує АА препаратів порівняння, а саме: метамізол натрію – майже на 100 %, а диклофенак натрію – на 45 %. Також досить високу АА проявили сполуки під лабораторним шифром BO-16, BO-20, BO-21, BO-51, BO-55, BO-62, АА яких, відповідно, склала 54,4, 50,2, 50,2, 54, 53,6, 50,6 %. На відміну від вищенаведених речовин, усі інші сполуки в аналогічній дозі суттєво не знижували кількість “корців”, зафіксованих у контролі, а отже, не мали вираженого аналгетичного ефекту.

Для наочності оцінки АА найактивніших сполук у порівняльному аспекті результати досліджень показано на рисунку, з якого видно, що здатність до активування антиноцицептивної системи організму піддослідних тварин значно більше реалізується при використанні сполук BO-1, BO-59 та BO-60.

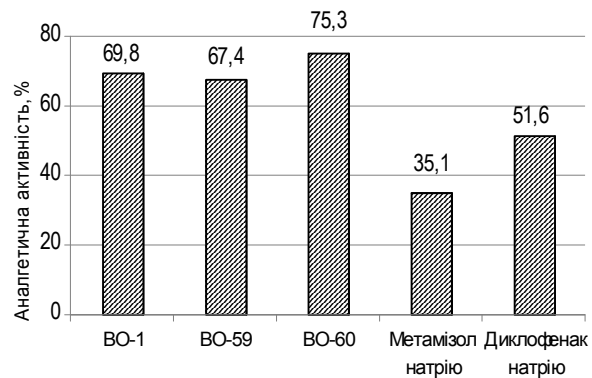


Рис. Порівняльний аналіз найактивніших досліджуваних сполук.

ВИСНОВКИ. З усіх вивчених потенційних аналгетиків найбільш виражену знеболювальну дію проявляє речовина під лабораторним шифром BO-60, її аналгетична активність складає 75,3 %. Саме тому досить перспективним є подальше поглиблене дослідження речовини BO-60 як потенційного аналгетика щодо виявлення аналгетичної дії на інших моделях болю, механізмів знеболювальної дії та її побічних реакцій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Виктор А. П. Контроль за безопасностью нестероидных противовоспалительных препаратов при медицинском применении / А. П. Виктор // Therapia. – 2009. – № 3(35). – С. 8–18.
2. Виктор А. П. Проблемы применения анальгетиков-антипиретиков в соответствии с критериями их безопасности / А. П. Виктор, В. Г. Кучер, А. В. Кошуба // Укр. ревматол. журн. – 2006. – № 2(24). – С. 4–9.
3. Доклинические исследования лекарственных средств : методические рекомендации / под ред. А. В. Стефанова. – К. : Авицена, 2002. – 420 с.
4. Одинак М. М. Болевые синдромы в неврологической практике / М. М. Одинак, С. А. Живолупов, И. Н. Самарцев // Журн. неврол. и псих. – 2009. – № 9. – С. 80–88.
5. Палій І. Г. Біль та знеболення в загальноклінічній практиці / І. Г. Палій, І. Г. Резніченко // Сімейна медицина. – 2007. – № 1. – С. 38–41.
6. Эффективность лорноксикама и кеторолака в профилактике и лечении послеоперационного болевого синдрома у пациентов нейрохирургического профиля / В. И. Петров, А. В. Сабанов, В. Г. Медведов [и др.] // Хирургия. – 2009. – № 2. – С. 64–70.
7. Ядловский О. Е. Поиск ненаркотических анальгетиков: проблемы и перспективы / О. Е. Ядловский // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 9. – С. 48–55.

Л. В. Савченкова, С. И. Фоменко

ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНАЛГЕТИКОВ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ 4-(ГИДРОКСИ)-2-ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА МОДЕЛИ “УКСУСНОКИСЛЫХ КОРЧЕЙ”

Резюме

Проведены скрининговые исследования среди производных 4-(гидрокси)-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот, которые направлены на поиск новых потенциальных анальгетиков, на модели “уксуснокислых корчей”. По результатам исследований установлено, что наиболее выраженную анальгетическую активность проявляет вещество под лабораторным шифром ВО-60. Его анальгетическая активность в дозе 20 мг/кг составляет 75,3 %.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **анальгетики, скрининг, анальгетическая активность.**

L. V. Savchenkova, S. I. Fomenko
LUHANSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

SCREENING OF POTENTIAL ANALGETICS OF THE DERIVATIVES 4-(GIDROXI)-2-OXO-1,2-DIHYDROHYNOLIN-3-CARBONS ACIDS ON THE MODEL OF ACETIC “CONVALTIONS”

Summary

There were conducted screening researches directed on the search of potential analgetics of the derivative 4-(gidroxi)-2-oxo-1,2-dihydrohynolin-3-carbons acids on the model of acetic “convaltions”. According to the results of research it is established that maximum analgesic activity shows substance under laboratory code number BO-60, analgesic activity at dose 20 mg/kg was 75,3 %.

KEY WORDS: **analgetics, screening, analgetic's activity.**

Отримано 07.11.11

Адреса для листування: Л. В. Савченкова, Луганський державний медичний університет, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1 г, Луганськ, 91045, Україна.

АКТИВНІСТЬ ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ-3-КІНАЗИ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТАСОЦІЙОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Наведено результати дослідження активності фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки щурів при експериментальному колітасоційованому канцерогенезі. Показано, що розвиток запалення в слизовій оболонці товстої кишки супроводжується зниженням активності досліджуваного ензиму в середньому на 50 %. При стимуляції злоякісної трансформації специфічним проканцерогеном відмічено збільшення PI3-кіназної активності в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки піддослідних тварин. На 10-й тиждень розвитку онкопатології гістологічними та цитологічними дослідженнями була підтверджена аденокарцинома товстої кишки. Активність PI3K у ці терміни досліджень досягала максимального значення та перевищувала контроль більш ніж у 2 рази. Очевидно, в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фосфатидилінозитол-3-кіназа, колітасоційований канцерогенез, епітеліоцити слизової оболонки товстої кишки (колоноцити).

ВСТУП. Одним з найважливіших внутрішньоклітинних сигнальних месенджерів, що забезпечує реалізацію програми виживання клітини і блокує дію широкого спектра індукторів її загибелі, є фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI3K) та шляхи сигнальної трансдукції, що активуються даним ферментом. Подвійна ферментативна активність (ліпід- та протеїнкіназна), притаманна PI3K, як і її здатність активувати цілий ряд сигнальних білків, включаючи деякі онкобілки, вказує на принципове значення цього ензиму в регуляції таких функцій клітини, як ріст, старіння та пухлинна трансформація [7, 10].

Фосфатидилінозитол-3-кіназа є одним з найважливіших регуляторних білків, що перебувають на перетині різних сигнальних каскадів та контролюють ключові функції клітини. Активуватись PI3K може як у результаті безпосередньої її взаємодії з тирозинкіназами, так і за рахунок зв'язування з білками Ras. Даному протеїнкіназному месенджерному шляху належить провідна роль в опосередкуванні дії інсуліну, ростових факторів, інтегринів та рецепторів, спряжених з G-білками. Крім того, він залучений у регуляцію клітинного виживання, метаболізму, експресії генів, проходження клітинного циклу та синтезу білків [4, 23].

© О. О. Кравченко, М. О. Тимошенко, Л. М. Гайда, О. В. Сокур, Л. І. Остапченко, 2012.

Усі протеїнкінази цього каскаду належать родині серин-треонінових фосфотрансфераз та формують єдину досить розгалужену сигнальну мережу [2]. Більшість із цих протеїнкіназ містить плекстрингомодіфіковані (PH) домени, які специфічно зв'язуються з фосфоінозитидними ліпідами, включаючи фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат (ФІФ₃), що генерується в плазматичній мембрані у відповідь на дію агоністів [5, 21]. Активація протеїнкіназ, що містять PH-домени, серед яких найбільш важливі PKB/Akt та 3-фосфоінозитидзалежна протеїнкіназа-1 (PDK1), залежить безпосередньо від дії фосфатидилінозитол-3-ОН-кінази (PI3K). Тому PI3K є одним з найважливіших регуляторних білків, які контролюють ключові функції клітини [8].

Відомо, що фосфатидилінозитол-3-кіназа відіграє особливу роль у процесі пухлинної трансформації, оскільки їй притаманна не тільки власна онкогенна активність, але і здатність утворювати комплекси з деякими вірусними та клітинними онкобілками, серед яких: src, ras, rac, alb, T-антиген [22]. Для реалізації трансформуючого потенціалу останніх необхідна обов'язкова присутність PI3K у клітині. Вважають, що в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів, а саме: виникнення постійно генерованого PI3K-залежного мітогенного

сигналу, активація деяких протонкогенів (src, ras, gас та ін.) і стимуляція PI3K/PKB-шляху, яка призводить до часткового блокування апоптозу, наслідком чого є збільшення життєздатності клітин та реорганізація актинового цитоскелета [15, 19, 20].

Беручи до уваги все вищесказане, значний інтерес викликає дослідження особливостей функціонування фосфатидилінозитол-3-кінази за умов розвитку хронічних запальних патологій, одним з найпоширеніших і несприятливих ускладнень яких є злаякісна трансформація клітин. Тому метою даної роботи було вивчити активність PI3K у клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів на різних етапах колітасоційованого канцерогенезу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції. Експерименти проводили на білих лабораторних щурах-самцях з початковою масою 160–180 г. Їх поділили на 9 груп по 10–15 тварин: 1-ша – контрольні тварини, яких утримували на стандартному раціоні віварію; 2–4 – тварини з 1-, 3- та 7-денним терміном розвитку виразкового коліту відповідно; 5–9 – тварини, яких піддавали впливу специфічного проканцерогену.

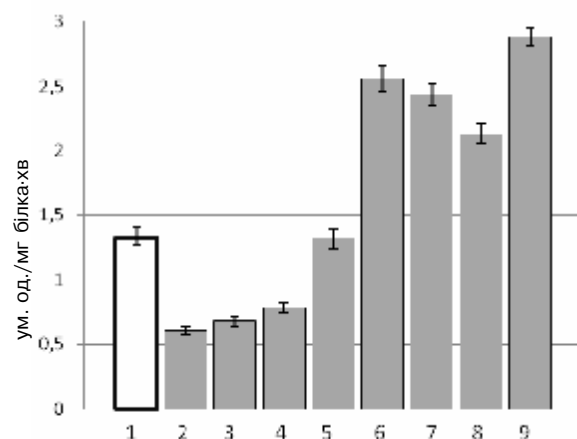
Колітасоційований канцерогенез моделювали, замінюючи питну воду 1,5 % розчином декстрансульфатнатрієвої солі (ДСН) з відносною молекулярною масою 35 000–50 000 ("ICN", США) протягом 7 днів з наступним підшкірним введенням специфічного проканцерогену – 1,2-диметилгідрозину (ДМГ) ("Aldrich", США) в дозі 20 мг/кг маси тіла згідно з рекомендаціями [1]. Формування патології діагностували за специфічними симптомами (зміни консистенції випорожнень, присутність у них домішок крові) та морфолого-гістологічним дослідженням пошкоджень слизової оболонки товстої кишки.

Епітеліальні клітини слизової оболонки товстої кишки (колоноцити) виділяли хелаторним методом згідно з [17]. Отримані клітини гомогенізували та використовували для визначення активності фосфатидилінозитол-3-кінази. Активність ферменту вимірювали за допомогою стандартного флуоресцентного набору PI3-Kinase HTRF™ Assay ("Millipore", США). Активність ферменту виражали в умовних одиницях за 1 хв на 1 мг білка, вміст якого визначали методом Бредфорд [3]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної

статистики. В роботі використовували мікропланшетний спектрофлуорометр фірми "BioScience" (США).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті проведених досліджень було встановлено, що активність ферменту, який генерує 3'ОН-фосфопохідні фосфатидилінозитидів та регулює PKB, PDK, PKC та MAP кіназоопосередковані месенджерні каскади, зазнає суттєвих змін як у процесі розвитку запалення, так і при наступній злаякісній трансформації клітин слизової оболонки товстої кишки. Зокрема, вже на 1-шу добу дії запального чинника – декстрансульфатнатрієвої солі в колоноцитах відмічено статистично достовірне зниження активності досліджуваного ензиму на 54 % порівняно з контролем (рис.). В наступні терміни розвитку коліту (3, 7 доби), на фоні проявів виражених симптомів запалення і раніше встановленого нами [11] зростання вмісту внутрішньоклітинного кальцію, спостерігалось зменшення активності PI3-кінази на 49 і 41 % відповідно відносно показників інтактних тварин.

В експериментах з використанням специфічних інгібіторів PI3K та/або при трансфекції клітин різними варіантами гена PI3K було встановлено, що PI3K бере участь у регуляції принаймні двох важливих функцій клітин: поділу (забезпечуючи внутрішньоклітинну передачу сигналів, стимульованих ростовими факторами) та апоптозу (перешкоджаючи його розвитку в клітинах) [14]. Це дає



1 – контроль; 2 – 1-ша доба розвитку коліту; 3 – 3-тя доба розвитку коліту; 4 – 7-ма доба розвитку коліту; 5 – 2-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 6 – 4-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 7 – 6-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 8 – 8-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 9 – 10-й тиждень дії проканцерогену ДМГ.

Рис. Активність фосфатидилінозитол-3-кінази при експериментальному колітасоційованому канцерогенезі.

підстави припустити, що запальні реакції в слизовій оболонці товстої кишки на початкових стадіях коліту супроводжуються захисними явищами активації апоптозу та пригніченням мітотичних процесів.

Серед інших важливих функцій PI3K, прямо або опосередковано пов'язаних з передачею мітогенного сигналу, слід виділити участь у рецепторній down-регуляції (ендоцитозі та деградації активованих рецепторів ростових факторів), регуляції синтезу лізосомальних ферментів, а також участь PI3K у реорганізації актинового цитоскелета та в управлінні мембранним транспортом [12]. Тому, очевидно, зафіксовані нами симптоми коліту, пов'язані з порушенням везикулярного транспорту слизу та розбалансуванням водно-іонної рівноваги, принаймні частково зумовлені зниженням активності фосфатиділінозитол-3-кінази.

Слід також зазначити, що даний фермент відіграє важливу роль у реакціях імунотетентних клітин, забезпечуючи їх хемокін-індуковану міграцію до джерела запалення та регуляцію синтезу прозапальних цитокінів, включаючи інтерлейкін-1 β , фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерферон γ , а також проти-запального інтерлейкіну-4 [22].

Введення специфічного проканцерогену – 1,2-диметилгідразину характеризувалось вираженим зростанням активності досліджуваного ферменту. На 2-й тиждень дії диметилгідразину активність фосфатиділінозитол-3-кінази підвищувалась відносно показників, зафіксованих у період запалення, та досягала значень, характерних для контрольних тварин (рис.). Наступне введення проканцерогену призводило до постійного зростання активності PI3K в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки. Так, на 4-й тиждень стимуляції злоякісної трансформації PI3-кіназна активність перевищувала контроль на 92 %, на 6-й та 8-й тижні – на 83 і 60 % відповідно. Максимуму даний параметр досягав на 10-й тиждень дії диметилгідразину, перевищуючи контроль більш ніж у 2 рази. Зазначимо, що в цей період у кишечнику спостерігались макроскопічні утвори.

Отримані результати узгоджуються з даними літератури [15, 19] про значення фосфорилювання інозитидів для виживання клітин. Протеїнкіназа B (PKB/Akt) – основний фермент, що активується PI3-кіназним шляхом, залучений у супресію апоптозу через модифікацію проапоптичного білка Bad (що попереджує його зв'язування з Bcl-2), каспази-9, декількох транскрипційних факторів, а також кінази синтази глікогену-3 (GSK-3), яка регулює ста-

більність β -катеніну та цикліну D. Велике значення в процесі PI3K-залежної трансформації клітин належить також стимуляції RAS/RAF/ERK-кіназного каскаду та збільшенню активності транскрипційного фактора AP-1 [24].

Сучасні дослідження показали, що важливу роль у розвитку онкопатології різної локалізації відіграють мутації гена, який кодує каталітичну субодиницю PI3-кінази p110 α , що часто призводять до гіперактивації ферменту. Більшість з відомих пухлинних супресорів та онкогенів бере участь у сигнальних шляхах, що регулюються PI3K. Посилення PI3K-сигналу проявляється збільшенням накопичення ліпідних вторинних посередників, посиленням сигналу і трансформацією клітин. Крім того, незважаючи на різноманіття проліферативних стимулів, у пухлинних клітинах існує універсальний механізм інтеграції проліферативного і трансляційного сигналів. Цю роль відіграє PI3K/Akt шлях, що забезпечує в клітинах швидку підготовку апарату синтезу білка у відповідь на проліферативний стимул та підтримання великої швидкості трансляції щойно синтезованої мРНК. У літературі є дані про те, що активація PI3K призводить до стимуляції в пухлинних клітинах Akt, ключового ефектора PI3K/Akt сигнального шляху. Так, накопичення в пухлинах активованої Akt (фосфорилуваної в положенні S473) спостерігається при злоякісних процесах, таких, як: множинна мієлома, гострий мієлолейкоз, пухлини голови та шиї, рак легень, молочної залози, шлунка, товстої кишки, ендометрія, яєчника, передміхурової залози, пухлини головного мозку, нирок та меланоми [16, 18]. Такі пухлини характеризуються агресивним ростом, стійкістю до хіміо- та променевої терапії і несприятливим прогнозом для пацієнтів [6, 9].

Таким чином, отримані результати вказують на те, що розвиток колітасоційованого канцерогенезу супроводжується порушенням функціонування однієї з важливих ланок сигнальної трансдукції – фосфатиділінозитол-3-кіназного шляху в епітеліальних клітинах слизової оболонки кишечника. Причому запальний період характеризується зниженням активності PI3K, а дія проканцерогену призводить до її гіперактивації. Імовірно, в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів: виникнення PI3K-залежного мітогенного сигналу, що постійно генерується, активація деяких протоонкогенів (src, ras, gas та ін.) і стимуляція PKB-шляху, що призводить до часткового блокування апоптозу та збільшення виживання клітин, тому ці фактори можуть бути використані

як біомаркери диспластичної трансформації та для терапевтичної корекції в клітинах слизової оболонки товстої кишки.

ВИСНОВКИ. 1. Отримані дані свідчать про те, що в патогенез колітасоційованого канцерогенезу залучені порушення процесів внутрішньоклітинної сигналізації, які призводять не лише до змін у функціонуванні клітин, а й до розладів їх поділу та загибелі.

2. Розвиток запальних уражень слизової оболонки товстої кишки супроводжується зниженням активності фосфатидилінозитол-3-кінази в епітеліоцитах кишечника на всіх етапах спостереження.

3. Встановлено зростання активності ферменту, що забезпечує фосфорилювання фосфатидилінозитидів, в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки за умов введення щурам специфічного проканцерогену, який стимулює розвиток колоректального раку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium / W. Jian-Guo, W. Dong-Fei, L. Bing-Jian, [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – **10**, № 20. – P. 2958–2962.
2. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase / M. Hayashi, R. I. Taping, T. H. Chao [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 12. – P. 8631–8634.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
4. Carpenter C. L. Phosphoinositide kinases / C. L. Carpenter, L. C. Cantley // *Current Opinion in Cell Biology.* – 1996. – **8**. – P. 153–158.
5. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase / T. Kobayashi, M. Deak, N. Morrice [et al.] // *Biochem. J.* – 1999. – **344**. – P. 189–197.
6. Dai D. L. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. / D. L. Dai, M. Martinka, G. Li // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – **23**. – P. 1473–1482.
7. Engelman J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations / J. A. Engelman // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – № 9. – P. 550–562.
8. Fruman D. A. Phosphoinositide kinases / D. A. Fruman, R. E. Meyers // *An. Review of Biochem.* – 1998. – **67**. – P. 481–507.
9. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer / M. G. Schlieman, B. N. Fahy, R. Ramsamoj [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – **89**. – P. 2110–2115.
10. Jiang B. H. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis / B. H. Jiang, L. Z. Liu // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – **1784**. – P. 150–158.
11. Kravchenko O. O. Intracellular calcium content, phospholipase C and protein kinase C activity under colitis-associated carcinogenesis development / O. O. Kravchenko, O. V. Drobinska, L. I. Ostapchenko // *Abstracts of the 35th FEBS Congress Goteborg (Gothenburg), 2010.* – P. 136.
12. Lee G. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis / G. Lee, T. Goretsky // *Gastroenterology.* – 2010. – **139** (3). – P. 869–881.
13. Massion P. P. Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression / P. P. Massion, P. M. Taflan // *American J. of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2004. – **170**. – P. 1088–1094.
14. Peng X. D. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sulfate-induced colitis in mice / X. D. Peng, X. H. Wu // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – **332**, № 1. – P. 46–56.
15. PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications / A. Carnero, C. Blanco-Aparicio, O. Renner [et al.] // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2008. – **8**, № 3. – P. 187–198.
16. Qiao M. Metastasis and AKT activation / M. Qiao, S. Sheng, A. B. Pardee // *Cell Cycle.* – 2008. – **7**. – P. 2991–1996.
17. Roediger W. E. W. Method of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies / W. E. W. Roediger, S. C. Truelove // *Gut.* – 1979. – **20**, № 6. – P. 484–497.
18. Shtilbans V. Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry / V. Shtilbans, M. Wu, D. E. Burstein // *Ann Diagn Pathol.* – 2008. – **12**. – P. 153–160.
19. Strahl T. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae* / T. Strahl, J. Thorner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1771**, № 3. – P. 353–404.
20. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer / P. Liu, H. Cheng, T. M. Roberts, J. J. Zhao // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2009. – **8**. – P. 627–644.
21. Tolias K. F. Pathways for phosphoinositide synthesis / K. F. Tolias, L. C. Cantley // *Chem. Phys. Lipids.* – 1999. – **98**. – P. 69–77.
22. van Dop W. A. The absence of functional PI3Kgamma prevents leukocyte recruitment and ame-

- liorates DSS-induced colitis in mice / W. A. van Dop, S. Marengo // Immunol Lett. – 2010. – **131**, № 1. – P. 33–39.
23. Vanhaesebroeck B. The study of phosphoinositide 3-kinase function / B. Vanhaesebroeck, R. C. Stein, M. D. Waterfield // Cancer Surv. – 1996. – **2**. – P. 249–270.
24. Vivanco I. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer / I. Vivanco, C. L. Sawyers // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – **2**. – P. 489–501.

О. А. Кравченко, М. А. Тимошенко, Л. Н. Гайда, О. В. Сокур, Л. И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

АКТИВНОСТЬ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3-КИНАЗЫ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИТАССОЦИИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме

Представлены результаты исследования активности фосфатидилинозитол-3-киназы (ПИЗК) в эпителиоцитах слизистой оболочки толстой кишки крыс при экспериментальном колитассоциированном канцерогенезе. Показано, что развитие воспаления в слизистой оболочке толстой кишки сопровождается снижением активности исследуемого фермента в среднем на 50 %. При стимуляции злокачественной трансформации специфическим проканцерогеном отмечено увеличение ПИЗК-киназной активности в эпителиоцитах слизистой оболочки толстой кишки подопытных животных. На 10 неделю развития онкопатологии гистологическими и цитологическими исследованиями была подтверждена аденокарцинома толстой кишки. Активность ПИЗК в эти сроки исследований достигала максимального значения и превышала контроль более чем в 2 раза. Очевидно, в основе трансформирующего действия ПИЗК лежат комплексные изменения клеточных сигнальных путей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фосфатидилинозитол-3-киназа, колитассоциированный канцерогенез, эпителиоциты слизистой оболочки толстой кишки (колоноциты).

O. O. Kravchenko, M. O. Tymoshenko, L. M. Haida, O. V. Sokur, L. I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KIVY NATIONAL UNIVERSITY

THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE ACTIVITY UNDER EXPERIMENTAL COLITIS-ASSOCIATED CARCINOGENESIS DEVELOPMENT

Summary

The results of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity researching in rat colonocytes under experimental colitis-associated carcinogenesis development are presented. The decreasing of the phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat colonocytes on 41–50 % relatively to the control was estimated on first till seventh day of experimental ulcerative colitis development. The important role of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in the normal processes of angiogenesis, survival and differentiation of cell was well known but it also took part in tumors growth. So, we found, that the processes of malignant transformation after inflammation in colon mucous epithelial cells were accompanied the increase of the PI3K enzyme activity on 60–92 % relatively to the control during eight weeks of specific procarcinogen (1, 2- dimethylhydrazine) injections. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity exceeded control indexes in 2 times on the tenth 10 week of carcinogenesis, when adenocarcinoma was examined. The shown hyper activation of PI3K could result to uncontrolled proliferation of the cell.

KEY WORDS: phosphatidylinositol 3-kinase, colitis-associated carcinogenesis, colon mucous epithelial cells (conocytes).

Отримано 12.09.11

Адреса для листування: О. О. Кравченко, вул. Наб.-Корчуватська, 96, кв. 59, Київ, 03045, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ НА ВМІСТ ФОСФОЛІПІДНИХ ФРАКЦІЙ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ І ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

У роботі вивчено стан фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів лінії Вістар за умов тривалого перорального впливу поліолів – промислових хімічних забруднювачів водних об'єктів навколишнього середовища. Поліолі на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003) у дозі 1/100 LD₅₀ на 30-ту добу впливу збільшують відсотковий вміст фосфатидилетаноламіну, суттєво – лізофосфатидилхоліну на фоні зниження фосфатидилхоліну, сфінгомієліну. Підвищення вмісту лізофосфатидилхоліну є маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів. Досліджувані сполуки не впливають на відсотковий вміст фосфатидилсерину. Отримані результати свідчать про мембранотропну дію речовин, що реалізується через зміну фосфоліпідного складу клітинних мембран.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліолі, мембрани еритроцитів, мембрани гепатоцитів, фосфоліпідний склад.

ВСТУП. Порушення структурно-функціонального стану клітинних мембран, зокрема еритроцитів і гепатоцитів, за умов дії багатьох хімічних факторів супроводжується виникненням різних патофізіологічних і клінічних проявів. Структурно-функціональні властивості біологічних мембран багато в чому визначаються фосфоліпідним складом, який впливає на їх проникність, спряженість та послідовність численних ферментативних процесів. Відомо, що мембрани еритроцитів і гепатоцитів піддаються значним пошкодженням за умов дії ряду ксенобіотиків. Їх розглядають як універсальні моделі для вивчення мембранотропних ефектів [4, 5, 7].

До поширених промислових хімічних забруднювачів навколишнього середовища, в тому числі водних екосистем, належать поліолі на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60). Останні характеризуються великим об'ємом синтезу та широким використанням у промисловості й побуті як основи мийних засобів, емульгаторів, антикорозійних і бактерицидних препаратів тощо [11]. Доведено можливість надходження речовин даного класу в організм людини з питною водою. Регламентація вмісту поліолів в об'єктах навколишнього середовища здійснюється на базі використання тимчасових розрахункових нормативів. Проте механізми біологічної дії цих сполук вивчено недостатньо, а саме їх урахування є підставою для їх адекватної регламентації. Крім того, проведення таких досліджень має суттєве значен-

ня для вирішення наукової проблеми щодо охорони здоров'я населення та об'єктів довкілля від забруднення і негативного впливу шкідливих хімічних речовин, яка на сучасному етапі набула глобального світового значення та особливої актуальності для України у зв'язку з погіршенням загальної екологічної ситуації [1, 3, 10]. Роботу виконано в межах науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету "Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища" (номер держреєстрації 0110U001812).

Метою даного дослідження було визначити вміст фосфоліпідних фракцій мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів за умов тривалого впливу поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60) у дозі 1/100 LD₅₀.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: поліоксипропілентриол – П-1103К і поліоксиетиленоксипропілентриол – П-3003-2-60. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г. Процедури з експериментальними тваринами проводили відповідно до вимог Державного комітету з етики. Щурів утримували в стаціонарних умовах віварію при постійних температурі та природному освітленні [8]. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 30 днів у дозі 1/100 LD₅₀, що, відповідно, складало: для П-1103К – 0,012 г/кг, для

П-3003-2-60 – 0,032 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Вміст фосфоліпідних фракцій досліджували через 30 діб після початку експерименту. В кожній групі було по 10 тварин. Забій щурів проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Плазматичні мембрани одержували методом диференційного центрифугування в градієнті щільності сахарози [9]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Кейтса [6]. Випаровування екстрактів ліпідів здійснювали у струмі сухого азоту. Для розділення індивідуальних фосфоліпідів на фракції використовували метод двомірної мікротонкошарової хроматографії [13]. Ідентифікацію фосфоліпідів проводили за допомогою специфічних реакцій та стандартних розчинів. Кількісний вміст загальних та індивідуальних фосфоліпідів у ліпідних екстрактах оцінювали за кількістю неорганічного фосфору, яку визначали за допомогою молібденового реагенту [12]. Співвідношення фосфоліпідних фракцій розраховували у відсотках фосфору фосфоліпідів кожної фракції до фосфору загальних ліпідів, взятих за 100 %. Для вивчення фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів визначали фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ), фосфатидилсерин (ФС), лізофосфатидилхолін (ЛФХ). Статистичний аналіз цифрового матеріалу проводили за допомогою комп'ютерного пакета для обробки й аналізу статистичної інформації "Statistica 6.0" [2]. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Стюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіантів. Визначали середнє арифметичне варіаційного ряду (М) і середню помилку середнього арифметичного (m). Відмінності між двома вибі-

ками вважали достовірними, якщо ймовірність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Поліолі 1103К і 3003-2-60 на 30-ту добу дії в дозі 1/100 LD₅₀ призводили до таких змін фосфоліпідного складу клітинних мембран (табл.).

Спостерігалось достовірне збільшення відсотка ФЕА у мембранах еритроцитів і гепатоцитів. Для поліолу 1103К це, відповідно, складало 54 і 26 %, а для поліолу 3003-2-60 – 35 і 21 % порівняно з контрольною групою тварин. Збільшення ФЕА, найімовірніше, пов'язане зі зниженням його трансметилування та перетворенням на ФХ. Враховуючи те, що ФЕА в структурному відношенні відіграє прооксидантну роль у клітинних мембранах, то факт його підвищення свідчить про деяку компенсаторну роль з боку перебудови біологічних мембран у відповідь на тривалий вплив поліолів. Відсотковий вміст ФХ, навпаки, зазнавав достовірного зниження, яке в середньому в мембранах еритроцитів складало 28 %, а гепатоцитів – 40 %. Слід зазначити, що на цьому фоні суттєво збільшувався вміст ЛФХ: для поліолу 1103К – у 2,7 і 6,4 раза, для 3003-2-60 – у 2,4 і 3,6 раза відповідно для еритроцитів і гепатоцитів. Зменшення рівня ФХ свідчить, з одного боку, про зниження його ресинтезу в процесі обміну фосфоліпідів, а з іншого – про зниження його антиоксидантної функції та перехід з ненасиченого стану в насичений. Тоді підвищення фракції ЛФХ відбувається внаслідок блокади метаболічних шляхів перетворення на ФХ, порушення процесів інгібування та виведення з організму.

Підвищення концентрації ЛФХ може бути маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів. Цю фракцію також можна роз-

Таблиця – Вплив поліолів у дозі 1/100 LD₅₀ на вміст фосфоліпідних фракцій мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів (% від загальної кількості фосфоліпідів, $M \pm m$, $n=10$)

Поліол	ФЕА	ФХ	СМ	ФС	ЛФХ
Еритроцити					
1103К	32,5±2,7*	36,3±3,2*	8,5±0,8*	12,6±0,9	12,5±0,8*
3003-2-60	28,4±2,5*	31,9±2,7*	9,3±0,8*	11,9±1,2	11,3±0,9*
Контроль	21,1±1,9	47,2±5,3	14,2±1,1	13,4±1,0	4,7±0,5
Гепатоцити					
1103К	29,7±3,2*	26,7±2,2*	9,4±0,9*	12,3±1,1	8,6±0,5*
3003-2-60	28,5±2,3*	23,1±1,9*	8,8±0,7*	14,9±1,3*	7,9±0,7*
Контроль	23,5±2,1	41,3±3,8	18,5±1,1	11,3±1,2	2,2±0,2

Примітки:

1. Вміст загальних фосфоліпідів еритроцитів у контрольній групі тварин становив (2,7±0,3) ммоль/г білка, в дослідних групах – у середньому (2,9±0,3) ммоль/г білка; вміст загальних фосфоліпідів гепатоцитів у контрольній групі тварин складав (0,74±0,05) ммоль/г білка, в дослідних групах – у середньому (0,71±0,06) ммоль/г білка.

2. * – $p < 0,05$ відносно контролю.

глядати як індикатор розгортання процесів вільнорадикального окиснення, що зумовлює порушення проникності в бік її збільшення, зміну плинності й стабільності біологічних мембран. Лізоформи фосфоліпідів, як відомо, сприяють появі дефектів у ліпідному бішарі та виникненню в ньому іонних каналів, що супроводжується порушенням бар'єрної функції мембрани.

За дії поліолів у дозі $1/100 LD_{50}$ спостерігалось, порівняно з контрольною групою тварин, достовірне зниження вмісту СМ фракції: у мембранах еритроцитів – на 40 і 35 %, гепатоцитів – на 49 і 52 % відповідно для поліолів 1103К та 3003-2-60. Зменшення СМ може бути однією з причин зниження захисних властивостей клітинних мембран, виникнення ацидотичних зсувів у плазмі крові, змін електростатичних властивостей та проникності мембран.

Виявлені зміни вмісту фосфоліпідних фракцій ФЕА, ФХ, СМ, ЛФХ відбувалися на фоні незмінного вмісту ФС.

Підтвердженням порушення структурної організації ліпідного матриксу клітинних мембран еритроцитів і гепатоцитів є підвищення коефіцієнта співвідношення суми легкоокиснювальних фракцій фосфоліпідів (ФС, ФЕА) до суми важкоокиснювальних фракцій (СМ, ФХ). Для еритроцитів у випадку поліолу 1103К цей коефіцієнт дорівнював $(1,08 \pm 0,12)$ ум. од., у випадку 3003-2-60 – $(0,98 \pm 0,095)$ ум. од. на фоні контролю $(0,61 \pm 0,064)$ ум. од. Для гепатоцитів це складало, відповідно, $(1,72 \pm 0,18)$ і $(1,39 \pm 0,12)$ ум. од. на фоні контролю $(0,57 \pm 0,06)$ ум. од.

Таким чином, тривалий вплив поліолів призводить до суттєвих змін фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів. Наслідками цього впливу є збільшення їх проникності, порушення трансмембранної дифузії, полегшення надходження медіаторів запалення в тканини, збільшення масопереносу кисню, від вмісту якого прямо залежить інтенсивність вільнорадикальних процесів. Але

безпосередньо на фосфоліпідному складі, як основному субстраті окиснювальних процесів у біомембранах, відображається виявлена в ході попередніх досліджень активація перекисного окиснення ліпідів, вільнорадикальної модифікації білків, NO-залежної окиснювальної системи за умов впливу поліолів. Про глибину інтенсифікації вільнорадикальних реакцій свідчить також зниження важкоокиснювальної фосфоліпідної фракції – СМ, яка в метаболічному відношенні відрізняється від інших фракцій найменшою швидкістю обміну в мембранах.

ВИСНОВКИ. 1. На 30-ту добу дія поліолів на основі гліцеролу в дозі $1/100 LD_{50}$ супроводжується збільшенням відсоткового вмісту ФЕА та, особливо, ЛФХ на фоні зниження ФХ і СМ у мембранах еритроцитів і гепатоцитів щурів. Підвищення вмісту ЛФХ є маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів.

2. Досліджувані сполуки не впливають на відсотковий вміст ФС у мембранах еритроцитів і гепатоцитів щурів.

3. На 30-ту добу поліолу 1103К і 3003-2-60 у дозі $1/100 LD_{50}$ підвищують коефіцієнт співвідношення суми легкоокиснювальних фракцій фосфоліпідів (ФС, ФЕА) до суми важкоокиснювальних фракцій (СМ, ФХ), що також вказує на порушення структурної організації ліпідного матриксу клітинних мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів.

4. Виявлені зміни фосфоліпідного складу біомембран з суттєвим утворенням лізоформ фосфоліпідів свідчать про мембранотропні ефекти поліолів на основі гліцеролу.

Перспективи подальших досліджень.

У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування механізмів біологічної дії поліолів, зокрема оцінку активності ферментних і рецепторних мембраноз'язаних комплексів, з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белозерова С. М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С. М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 3. – С. 13–19.
2. Боровиков В. А. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В. А. Боровиков. – СПб. : Питер, 2003. – 688 с.
3. Гнатейко О. З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зов-

нішнього середовища / О. З. Гнатейко, Н. С. Лук'яненко // Здоровье ребенка. – 2007. – № 6 (9). – С. 15–24.

4. Губський Ю. І. Жирнокислотний склад ліпідів головного мозку щурів при токсичному ураженні 1,2-дихлоретаном та уведення нікотинамідом / Ю. І. Губський, Л. В. Яницька, Т. С. Брюзгіна // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – № 1. – С. 19–22.

5. Камкин А. Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. – М. : Академия Год, 2008. – 592 с.

6. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.

7. Литовченко Т. А. Исследование фосфолипидного состава мембран эритроцитов у больных эпилепсией / Т. А. Литовченко, В. И. Жуков // Проблемы медицины. – 1999. – № 5. – С. 49–50.

8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

9. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М. : Медицина, 1977. – 371 с.

10. Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону : міжвідомч. зб. наук. праць / відп.

ред. С. В. Беспалова. – Донецьк : ДонНУ, 2006. – С. 106–112.

11. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, Л. Д. Попова, О. В. Зайцева [и др.]. – Х. : Торнадо, 2000. – 438 с.

12. Brockhuse R. M. Phospholipids structure of erythrocytes and hepatocytes / R. M. Brockhuse // Clin. Biochem. – 1974. – **14**, № 3. – P. 157–158.

13. Vashovsky V. E. UPTL of phospholipids micstures containing phosphotidyl glycerol / V. E. Vashovsky, T. A. Terekkive // J. High Res. Chromatogr. – 1979. – **2**, № 11. – P.671–672.

Ю. К. Резуненко, С. А. Стеценко, В. А. Прокопов
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ВЛИЯНИЕ ПОЛИОЛОВ НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ ФРАКЦИЙ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Резюме

В работе изучено состояние фосфолипидного состава мембран эритроцитов и гепатоцитов крыс линии Вистар в условиях длительного перорального воздействия полиолов – промышленных химических загрязнителей водных объектов окружающей среды. Полиолы на основе глицерола (П-1103К, П-3003) в дозе 1/100 LD₅₀ на 30-е сутки влияния увеличивают процентное содержание фосфатидилэтаноламина, существенно – лизофосфатидилхолина на фоне снижения фосфатидилхолина, сфингомиелина. Повышение содержания лизофосфатидилхолина является маркером развертывания патологических изменений на уровне мембранных структур в условиях длительного воздействия полиолов. Исследуемые вещества не влияют на процентное содержание фосфатидилсерина. Полученные результаты свидетельствуют о мембранотропном действии веществ, которое реализуется через изменение фосфолипидного состава клеточных мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полиолы, мембраны эритроцитов, мембраны гепатоцитов, фосфолипидный состав.

Yu. K. Rezunenko, S. O. Stetsenko, V. O. Prokopov
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF POLYOLS STRUCTURALLY BASED ON GLYCEROL ON CONTENT OF PHOSPHOLIPID FRACTIONS IN ERYTHROCYTE AND HEPATOCYTE MEMBRANES OF RATS

Summary

The present work investigates the state of phospholipid membranes of erythrocytes and hepatocytes in the rat organism (Wistar population) at the conditions of polyols prolonged peroral administration. These substances are primary industrial chemical pollutants of water objects environment. Polyols chemically based on glycerol (P-1103K, P-3003) in 1/100 LD₅₀ on the 30th experimental day increase the content of phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine on the background of decreasing the content of phosphatidylcholine, sphingomyelin. Increasing of the content of lysophosphatidylcholine is a marker of the beginning pathological processes at the level of membrane structures at the conditions of polyols prolonged administration. These compounds don't influence on the content of phosphatidylserine. The obtained results support membranotropic action of polyols which is realized by changing the phospholipid content of cells' membranes.

KEY WORDS: polyols, erythrocyte membranes, hepatocyte membranes, phospholipid content.

Отримано 12.11.11

Адреса для листування: Ю. К. Резуненко, Харківський національний медичний університет, просп. Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.

МЕТАБОЛІЗМ АЦЕТИЛХОЛІНУ В ПОШКОДЖЕНОМУ АДРЕНАЛІНОМ МІОКАРДІ САМЦІВ І САМОК ЩУРІВ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ МОДУЛЯТОРІВ АКТИВНОСТІ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ

У досліджах на статевозрілих самцях і самках щурів досліджено вплив прекурсора синтезу оксиду азоту L-arginine і неселективного блокатора L-NAME на вміст та інтенсивність ферментативного гідролізу ацетилхоліну (АХ) в міокарді передсердь і шлуночків при розвитку некротичного процесу в серці. Встановлено, що L-arginine (600 мг/кг) та L-NAME (25 мг/кг) впливають на вміст даного медіатора та інтенсивність його ферментативного гідролізу в міокарді передсердь і шлуночків. Пошкодження серця адреналіном на тлі L-arginine відбувається за умов збереження високого рівня АХ у передсердях без впливу на його рівень у шлуночках. L-NAME суттєвіше впливає на інтенсивність ферментативного гідролізу АХ, особливо в міокарді шлуночків, змінює характер динаміки досліджуваних показників при розвитку некротичного процесу. Чутливішими до коригувального впливу обох препаратів є самки щурів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: некроз міокарда, стать, оксид азоту, метаболізм ацетилхоліну.

ВСТУП. Різке зростання стресових перевантажень у житті людей сприяє підвищенню рівня захворюваності серцево-судинної системи. Більшість людей, які страждають від ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда, складають чоловіки. Серед головних ланок патогенезу стресорного пошкодження міокарда слід виділити кардіотоксичні ефекти катехоламінів, зокрема адреналіну. До них належать енергодефіцит та ацидоз [11, 14], активація перекисного окиснення ліпідів [2, 8, 16], накопичення іонів кальцію в кардіоміоцитах [9, 12, 15], активація мембраноруйнівних процесів, розвиток дистрофії міокарда, некрозу, активація апоптозу [10, 13]. Зважаючи на це, набувають особливої актуальності наукові дослідження, пов'язані з обмеженням дії даного чинника. Доведено, що естрогени пригнічують розвиток атеросклерозу, який є головною причиною ішемічної хвороби серця та некрозу міокарда. До встановлених кардіо- та вазопротекторних ефектів естрогенів відносять їх здатність запобігати експресії адгезивних молекул, регулювати функцію ендотелію, сприяючи виділенню ендотелієзалежного релаксуючого фактора оксид азоту через активацію ендотеліальної NO-синтази [6, 7, 13, 16, 18].

Серед інших природних факторів, здатних захистити міокард за таких умов, особливу

роль відіграє холінергічна ланка автономної нервової системи (АНС). Нейрогуморальні механізми останньої реалізуються за посередництва ацетилхоліну, що забезпечує відповідний до потреб серця ритм, регулює екстра- та інтракардіальну гемодинаміку, впливає на скоротливу функцію кардіоміоцитів, захищає мембрани від пошкодження, бере участь у регуляції метаболізму міокарда [2, 4, 17]. В основі багатьох досліджень лежить твердження, що важливим регулятором метаболізму в міокарді є оксид азоту, який, знижуючи потребу міокарда в кисні, зменшує ішемічні та реперфузійні пошкодження серцевого м'яза. Проте на сьогодні немає переконливих даних, які демонстрували б статеві особливості метаболізму парасимпатичного медіатора за умов розвитку некротичного процесу в серці залежно від активності системи оксиду азоту.

Метою даного дослідження було вивчити вплив модуляторів активності системи оксиду азоту на вміст та інтенсивність ферментативного гідролізу ацетилхоліну в пошкодженому адреналіном міокарді залежно від статі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди провели на 108 білих лабораторних статевозрілих самцях (♂) і самках (♀) щурів (170–210 г), в яких моделювали адреналінове пошкодження міокарда (АПМ) шляхом внутрішньом'язового введення адреналіну (1 мг/кг). Активність син-

© М. Р. Хара, К. Є. Юрїїв, О. В. Кузів, 2012.

тезу оксиду азоту змінювали введенням L-arginine (600 мг/кг) в черевну порожнину за 15 хв до відтворення АПМ або L-NAME (NG-Nitro-L-arginine-methyl ester hydrochloride, 25 мг/кг) за аналогічною схемою [11]. Тварин поділили на три групи (1-ша – щури з АПМ без корекції; 2-га – щури з АПМ, що розвивалося на тлі L-arginine; 3-тя – щури з АПМ, що розвивалося на тлі L-NAME) і спостерігали через 1 та 24 год після ін'єкції адреналіну. В міокарді передсердь (ПС) та шлуночків (ШЛ) визначали вміст ацетилхоліну (АХ) [1] та активність ферментативного його гідролізу за показником загальної холінестеразної активності (ЗХЕА) [3]. Усі експерименти й евтаназію щурів проводили відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001) та узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [5]. Отримані результати піддавали статистичній обробці для визначення середнього арифметичного (М), стандартної похибки середнього арифметичного (m), критерію Стюдента (t). Достовірною вважали відмінність при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналізуючи отримані дані, встановили, що вміст АХ у ПС контрольних ♂ 1-ї групи був на 10,3 % меншим, ніж у ♀ (табл. 1). На 1 та 24 год розвитку АПМ цей показник знижувався, що у ♂ склало, відповідно, 1,2 та 1,4 раза, а в ♀ – 1,4 та 1,5 раза. Вміст медіатора в ПС ♂ на 1 год розвитку АПМ був на 3,6 % більшим, ніж у ♀, а через 24 год спостереження даний показник ♀ переважав такий у ♂ на 5,2 %. Інтенсивність гідролізу медіатора на 1 та 24 год експерименту зменшувалася, зокрема в ♂ в 1,8 та 2,1 раза, а в ♀ в 1,3 та 1,6 раза відповідно. Достовірної різниці між тваринами різної статі за даним показником не було.

Введення L-arginine (2-га група) сприяло тому, що вміст АХ у міокарді ПС ♂ підвищився в 1,4 раза, а в ПС ♀ – в 1,7 раза, завдяки чому даний показник ♀ був на 37 % більшим, ніж у ♂. Розвиток АПМ на такому тлі супроводжувався зниженням вмісту АХ у ПС ♂, що на 1 год спостереження склало 10 %, а на 24 год – 16 %. У ПС ♀ динаміка була хвилеподібною, зокрема на 1 год АПМ цей показник зріс на 11 %, а на 24 год зменшився до рівня контролю даної групи. Порівняння абсолютних значень ♂ і ♀ даної групи показало, що вміст

АХ у міокарді ПС ♂ був в 1,7 раза меншим, ніж у ♀, на обох етапах спостереження.

За застосування L-arginine і на 1, і на 24 год розвитку АПМ вміст АХ у міокарді ПС був більшим, ніж у тварин 1-ї групи. Зокрема, у ♂ така різниця становила 1,5 та 1,7 раза на кожному з етапів експерименту, в ♀ – у 2,6 та 2,7 раза відповідно. Отримані результати показали, що за застосування L-arginine накопичення АХ у міокарді ПС було суттєвішим у самок.

Після введення L-arginine ЗХЕА підвищилася лише в міокарді ПС ♀, що склало 1,6 раза (табл. 2). Такі зміни могли бути проявом адаптації організму ♀ за умов суттєвого збільшення вмісту медіаторної фракції АХ для збереження функціонального стану пейсмеркерів синусового вузла. На 1 год розвитку АПМ на тлі L-arginine ЗХЕА ПС ♀ зменшилася в 1,7 раза, а на 24 год – в 1,8 раза, що могло сприяти збереженню вищих значень вмісту АХ при патології. У ♂ зміни даного показника були аналогічними на 1 год експерименту та інтенсивнішими на 24 год, а саме зменшення в 3,0 рази. Варто зазначити, що при застосуванні L-arginine ЗХЕА ПС ♀ була достовірно більшою в 1,9 раза на 1 год АПМ, а на 24 год – в 1,4 раза, що свідчило про суттєвіший вплив препарату на метаболізм парасимпатичного медіатора у тварин цієї групи.

У міокарді ШЛ контрольних ♂ 1-ї групи вміст АХ був на 5,2 % меншим, ніж в ♀. На 1 та 24 год розвитку АПМ даний показник знижувався у тварин обох статей, зокрема у ♂ – в 1,6 та 2,8 раза, а в ♀ – у 2,6 та 2,6 раза відповідно. Слід зауважити, що на 1 год експерименту вміст АХ у міокарді ШЛ ♂ був в 1,6 раза більшим при відсутності такої різниці на 24 год спостереження.

Введення L-arginine тваринам 2-ї групи мало наслідком зменшення вмісту АХ у міокарді ШЛ ♂ на 7,3 %, а в ♀ – збільшення на 6,5 %, що демонструвало різну роль прекурсора в метаболізмі медіатора. Розвиток АПМ на тлі L-arginine також супроводжувався зниженням вмісту АХ у міокарді даного відділу серця. Зокрема, у ♂ на 1 год експерименту даний показник зменшився на 41 %, а на 24 год – на 51 %. У ♀ максимальне зниження цього показника реєстрували вже на 1 год розвитку АПМ, що становило 58 %, а на 24 год ця відмінність збереглася і становила 57 %. Вміст АХ у міокарді ШЛ ♂ в контролі був на 22 % меншим, а на 1 год АПМ – на 15 % більшим, ніж у ♀, за відсутності такої різниці на 24 год експерименту.

Після введення L-arginine ЗХЕА міокарда ШЛ підвищилась, що могло пояснити зменшення вмісту АХ. Інтенсивнішими такі зміни були в ♀, приріст показника в яких становив 2,4 раза, тоді як у ♂ – лише 1,6 раза, що доводило більшу чутливість самок до коригувальних ефектів прекурсора. Розвиток АПМ на такому тлі характеризувався зменшенням аналізованого показника у самок на 1 і 24 год експерименту в 2,3 та 2,3 раза відповідно. У ♂ достовірних змін не спостерігалось. При застосуванні L-arginine ЗХЕА ШЛ ♂ на 1 год розвитку АПМ була в 2,0 рази більшою, ніж у ♀, а на 24 год – в 1,7 раза.

Порівняння результатів, отриманих у тварин 1-ї та 2-ї груп, засвідчило, що застосування L-arginine не вплинуло ні на вміст, ні на характер динаміки АХ у міокарді ШЛ ♂. У ♀ ефект прекурсора синтезу оксиду азоту проявився тим, що вміст АХ в міокарді ШЛ на 1 год розвитку АПМ був на 18 % більшим, ніж без такої корекції. Цю перевагу варто оцінити позитивно, зважаючи на те, що 1-ша год спостереження характеризується гіперадреналінемією та початком реалізації негативних кардіотоксичних ефектів катехоламіну. Слід зазначити, що такий позитивний, на нашу думку, вплив L-arginine був характерним лише для самок. ЗХЕА міокарда ШЛ ♂ 2-ї групи підвищилась, порівняно з аналогічним показником тварин 1-ї групи, в 1,6 раза, а в ♀ – у 2,4 раза. Розвиток АПМ сприяв зростанню даного показника в ♂ 2-ї групи як на 1, так і на 24 год експерименту, завдяки чому абсолютні його значення були у 2,4 та 2,0 рази більшими, ніж у тварин 1-ї групи. У ♀ 2-ї групи ЗХЕА міокарда ШЛ була достовірно вищою порівняно з 1-ю, що на 1 год АПМ становило 1,3 раза, а на 24 год – 1,4 раза. Проведений аналіз виявив суттєвіший вплив L-arginine на ферментативну складову метаболізму АХ у міокарді шлуночків при розвитку в них некротичного процесу. Адже прекурсор синтезу оксиду азоту не вплинув на характер та інтенсивність змін його вмісту, а лише на активність гідролізу.

Зважаючи на встановлений вплив L-arginine на метаболізм АХ, відкритим залишилося питання щодо ролі синтаз оксиду азоту на цей процес. Тому наступним етапом наших досліджень стало вивчення впливу L-NAME – речовини, яка пригнічує, головним чином, ендотеліальну NOS.

Введення L-NAME (3-тя група) викликало нагромадження АХ у міокарді ПС ♂, що склало 8 %, та його дефіцит у ♀, який дорів-

нював 43 % (табл. 1). Це було черговим підтвердженням суттєвішої чутливості організму самок до участі системи оксиду азоту в метаболізмі медіатора. Розвиток АПМ на такому тлі характеризувався зменшенням досліджуваного показника у ♂, що на 1 год експерименту склало 22 %, а на 24 год – 47 %. У ♀ динаміка була іншою, а саме: на 1 год розвитку АПМ вміст АХ у міокарді ПС підвищився на 5 %, а на 24 год – знизився до вихідного рівня даної групи тварин. Порівняння показників ♂ 1-ї та 3-ї груп показало, що L-NAME жодним чином не вплинув на абсолютні значення та характер динаміки вмісту АХ у цьому відділі серця. У ♀ на 24 год АПМ, яке розвивалося на тлі L-NAME, вміст АХ у ПС був на 6 % більшим завдяки відсутності коливань, притаманних тваринам, у яких даний препарат не використовували.

За застосування блокатора оксиду азоту L-NAME ЗХЕА міокарда ПС тварин обох статей зросла (табл. 2). Розвиток АПМ на такому тлі супроводжувався зменшенням даного показника як на 1, так і на 24 год експерименту, що у ♂ становило 1,7 та 3,4 раза, а в ♀ – 1,5 та 2,9 раза відповідно. Важливо зазначити, що ЗХЕА міокарда ПС тварин, у яких АПМ розвивалося на тлі L-NAME, була достовірно більшою (у ♂ – в 1,1 раза, а у ♀ – в 2,1), ніж без такого впливу на 1 год експерименту. Через добу ця динаміка стала протилежною, зокрема спостерігали зниження ЗХЕА у ♂ в 1,6 раза, а у ♀ дана різниця була недостовірною.

Вміст АХ у міокарді ШЛ ♂ після введення L-NAME зменшився на 16 %, а в ♀ збільшився на 12 %. При розвитку АПМ на такому тлі у ♂ дефіцит АХ наростав. Зменшення цього показника у тварин даної групи на 1 год експерименту склало 33 %, а на 24 год – 57 %. У ♀ суттєве (на 62 %) зниження вмісту АХ відбулося вже на 1 год розвитку АПМ при збереженні такої різниці на 24 год експерименту.

Порівняння абсолютних значень самців і самок даної (3-ї) групи показало, що достовірно тварини відрізнялися як на 1, так і на 24 год розвитку АПМ. Вміст АХ у міокарді ШЛ ♀ був на 19 % меншим на 1 год АПМ та на 33 % більшим, ніж у ♂, на 24 год експерименту. Варто сказати, що абсолютне значення вищевказаного показника самців 3-ї групи на обох етапах розвитку АПМ на тлі L-NAME не відрізнялося від такого в 1-й групі, а в ♀ воно було на 27 % більшим на 24 год спостереження.

Після введення L-NAME зросла ЗХЕА міокарда ШЛ тварин обох статей, а саме: в 1,6 раза в ♂ та у 2,2 раза в ♀. Розвиток АПМ

на цьому тлі характеризувався зменшенням досліджуваного показника у ♂, що на 1 год експерименту склало 20 %, а на 24 год – 22,7 %. У ♀ динаміка була схожою та інтенсивнішою: на 1 год АПМ ЗХЕА в міокарді ШЛ знизилась на 47 %, а на 24 год – на 48 %. Порівняно з ♂ 1-ї групи на 1 год розвитку АПМ даний показник збільшився на 44 %, а на

24 год – на 43 %, у ♀ переважав порівнюване значення на 28 та 34 % відповідно. Узагальнюючи наведені факти, слід сказати, що застосування L-NAME не вплинуло на характер динаміки ЗХЕА міокарда ПС та ШЛ при реалізації кардіотоксичного ефекту адреналіну. Разом із тим, ступінь таких був іншим і залежав від статі.

Таблиця 1 – Вміст ацетилхоліну в міокарді передсердь і шлуночків щурів при пошкодженні міокарда адреналіном на тлі L-arginine та L-NAME (мкмоль/кг, M±m, n=6)

	Група	Стать	Контроль	АПМ 1 год	АПМ 24 год
Передсердя	1-ша група (без корекції)	♂	13,1±0,23#	11,1±0,27*#	9,1±0,19*#
		♀	14,6±0,11#	10,7±0,06*#	9,6±0,08*#
	2-га група (L-arginine)	♂	18,2±0,19#	16,4±0,15*#	15,3±0,19*#
		♀	25,0±0,15#	28,0±0,35*#	25,5±0,27*#
	3-тя група (L-NAME)	♂	14,1±0,32#	11,6±0,15*#	9,6±0,18*#
		♀	10,2±0,03#	10,7±0,10*#	10,2±0,05*#
Шлуночки	1-ша група (без корекції)	♂	5,5±0,32	3,4±0,13*#	2,0±0,21*
		♀	5,8±0,16	2,2±0,11*#	2,2±0,23*
	2-га група (L-arginine)	♂	5,1±0,15#	3,0±0,19*#	2,5±0,13*
		♀	6,2±0,10#	2,6±0,11*#	2,7±0,19*
	3-тя група (L-NAME)	♂	4,6±0,06#	3,1±0,08*#	2,0±0,03*#
		♀	6,6±0,16#	2,5±0,11*#	3,0±0,13*#

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – достовірна (p≤0,05) відмінність у межах статі; # – достовірна відмінність між тваринами різної статі; • – достовірна відмінність відносно показника тварин 1-ї групи.

Таблиця 2 – Загальна холінергічна активність міокарда передсердь і шлуночків щурів при пошкодженні міокарда адреналіном на тлі L-arginine та L-NAME (ммоль/(кг·год), M±m, n=6)

	Група	Стать	Контроль	АПМ 1 год	АПМ 24 год
Передсердя	1-ша група (без корекції)	♂	388,7±7,3#	216,1±7,8*#	187,8±10,0*
		♀	272,3±6,8#	126,5±10,0*#	171,9±7,7*
	2-га група (L-arginine)	♂	393,4±7,4#	243,0±4,7*•	130,9±13,7*#
		♀	422,0±8,5#	249,0±5,0*•	235,8±7,9*#
	3-тя група (L-NAME)	♂	393,0±24,5	235,7±4,3*#	116,3±23,1*•
		♀	407,7±17,2•	271,2±5,4*#	139,3±16,9*
Шлуночки	1-ша група (без корекції)	♂	118,9±6,8#	86,3±5,9*	82,9±6,7
		♀	97,2±4,8#	82,0±3,3*	74,4±4,4
	2-га група (L-arginine)	♂	193,8±10,9#	204,3±3,3#	180,2±6,2#
		♀	236,6±8,3#	104,7±6,9*#	104,7±6,8*#
	3-тя група (L-NAME)	♂	189,5±8,6#	152,9±3,8*#	146,4±15,7*
		♀	215,7±3,7#	114,1±3,4*#	112,6±10,2*

ВИСНОВКИ. L-arginine та L-NAME впливають на вміст ацетилхоліну та активність його ферментативного гідролізу в міокарді передсердь і шлуночків. Пошкодження серця адреналіном на тлі L-arginine відбувається за умов збереження високого рівня АХ у передсердях без впливу на його рівень у шлуночках. L-NAME суттєвіше впливає на інтенсивність ферментативного гідролізу медіатора, особливо в міокарді шлуночків, змінює характер динаміки

досліджуваних показників при розвитку некротичного процесу. Чутливішими до коригувального впливу обох препаратів є самки щурів.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні впливу донатора та блокатора активності системи оксиду азоту на ступінь структурного пошкодження міокарда тварин різної статі при відтворенні в ньому некротичного процесу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічний метод визначення вмісту ацетилхоліну в міокарді щурів / В. В. Файфура, Л. М. Сас, Н. Я. Потіха, С. В. Дзига // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 4. – С. 118–121.
2. Бурлака А. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик. – К. : Наукова думка, 2006. – 228 с.
3. Визначення активності холінестерази в міокарді щурів / М. Р. Хара, Л. М. Сас, Н. Я. Потіха [та ін.] // Здобутки клін. та експер. мед. – 2006. – № 2. – С. 110–112.
4. Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту N-нітро-L-аргініну на вміст катехоламінів у крові щурів за умов стресу / Н. М. Кургалюк, Т. М. Мишутіна, Т. В. Серебровська [та ін.] // Ендокринологія. – 2002. – **7**, № 1. – С. 73–76.
5. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – **8**, № 1. – С. 142–145.
6. Караева Е. Н. Новые аспекты действия эстрогенов / Е. Н. Караева // Экспер. и клин. фарм. – 2003. – **66**, № 4. – С. 71–78.
7. Караченцев А. Н. Вазоактивные эффекты половых гормонов / А. Н. Караченцев, П. В. Сергеев // Пробл. эндокр. – 1997. – **43**, № 2. – С. 45–53.
8. Лагодич Т. С. Вплив донаторів оксиду азоту на скоротливу функцію міокарда // Фізіол. журн. – 2001. – **47**, № 1. – С. 34–39.
9. Марков Х. М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов / Х. М. Марков // Кардиология. – 2005. – **45**, № 6. – С. 87–95.
10. Сагач В. Ф. Роль эндотелію в регуляції кровообігу / В. Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 1998. – **44**, № 3. – С. 115–116.
11. Хара М. Р. Вміст нітрит-аніона в крові та міокарді гонадектомованих щурів різної статі за зміненої активності системи оксиду азоту / М. Р. Хара, А. М. Дорохіна // Мед. хімія. – 2010. – **12**, № 1. – С. 94–97.
12. Хара М. Р. Оксид азоту та серцево-судинна система (огляд літератури) / М. Р. Хара, А. М. Дорохіна // Здобутки клін. та експер. мед. – 2010. – **12**, № 1. – С. 14–19.
13. Хара М. Р. Особливості перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у гонадектомованих самок щурів при моделюванні некротичного пошкодження міокарда та корекції / М. Р. Хара, В. Є. Пелих // Мед. хімія. – 2010. – № 1. – С. 80–82.
14. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome C oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q / K. Chandran, D. Aggarwal, R. Q. Migrino [et al.] // Biophys J. – 2009. – **96**, № 4. – P. 1388–1398.
15. Impact of age and sex on sudden cardiovascular death following myocardial infarction [Electronic source] / S. Z. Abildstrom, C. Rask-Madsen, M. M. Ottesen [et al.] // Heart. – 2002. – **88**, № 6. – P. 573–578. – Access mode: <http://heart.bmj.com/content/88/6/573.full.pdf>
16. Monkada S. Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology / S. Monkada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs // Pharmacol. Rev. – 1991. – **43**, № 2. – P. 109–142.
17. Phillips G. B. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk factors for myocardial infarction / G. B. Phillips, T. Jing, S. B. Heymsfield // Metabolism. – 2003. – **52**, № 6. – P. 784–790.
18. Sana S. On behalf of the Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe / S. Sana, H. Kesteloot, D. Kromhout // Eur. Heart. J. – 1997. – № 18. – 1231–1248.

М. Р. Хара, Е. Е. Юриив, О. В. Кузів

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА В ПОВРЕЖДЕННОМ АДРЕНАЛИНОМ МИОКАРДЕ САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА

Резюме

В опытах на половозрелых самцах и самках крыс исследовано влияние прекурсора синтеза оксида азота L-arginine и неселективного блокатора L-NAME на содержание и интенсивность ферментативного гидролиза ацетилхолина (АХ) в миокарде предсердий и желудочков при воспроизведении некротического процесса в сердце. Установлено, что L-arginine (600 мг/кг) и L-NAME (25 мг/кг) влияют на содержание данного медиатора и интенсивность его ферментативного гидролиза в миокарде предсердий и желудочков. Повреждение сердца адреналином на фоне L-arginine происходит при сохранении высокого уровня АХ в предсердиях без влияния на его уровень в желудочках. L-NAME существенно влияет на интенсивность ферментативного гидролиза АХ, особенно в миокарде желудочков, изменяет характер динамики исследуемых

показателей при развитии некротического процесса. Чувствительнее к корригируемому влиянию двух препаратов являются самки крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: некроз миокарда, пол, оксид азота, метаболизм ацетилхолина.

M. R. Khara, K. Ye. Yuriyiv, O. V. Kuziv
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

METABOLISM OF ACETYLCHOLINE IN THE MYOCARDIUM DAMAGED BY ADRENALINE OF FEMALE AND MALE RATS USING THE ACTIVITY MODULATORS OF NITRIC OXYDE SYSTEM

Summary

In experiments on sexually mature male and female rats was investigated the influence of the precursor of nitric oxide synthesis L-arginine and non-selective blocker L-NAME on the content and intensity of enzymatic hydrolysis of acetylcholine in the myocardium of atriums and ventriculars at the development of necrotic process in the heart. The L-arginine (600 mg/kg) and L-NAME (25 mg/kg) affect on the content of this neurotransmitter and its enzymatic hydrolysis activity in the myocardium of atriums and ventriculars. Damaging of the heart by adrenaline on the background of L-arginine occurs while preserving a high level of acetylcholine in the atriums without affecting its level in the ventriculars. L-NAME has essential influence on the intensity of the enzymatic hydrolysis of acetylcholine, especially in the myocardium of ventricles, this blocker changes the dynamics of the researches parameters in the development of necrotic process. More sensitive to the corrective influence of both drugs are female rats.

KEY WORDS: necrosis of myocardium, sex, nitric oxyde, metabolism of acetylcholine.

Отримано 04.01.12

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

**ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ ТА α -ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ
НА ПОКАЗНИКИ ТІОЛДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ**

Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу шляхом односторонньої оклюзії сонної артерії викликало виникнення тяжкої неврологічної симптоматики, яка супроводжувалася порушенням тіолдисульфідної рівноваги, активацією процесів окисної модифікації білків та підвищенням рівня білка Hsp 70. Проведення фармакотерапії тіотриазоліном та α -ліпоєвою кислотою показало здатність препаратів у різні строки експерименту обмежувати дію окисного стресу на нейрональні клітини, яка проявлялася гальмуванням утворення продуктів окисної модифікації білків, зменшенням вмісту окисненого глутатіону та нормалізацією активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Виявлені патобіохімічні ефекти тіотриазоліну та α -ліпоєвої кислоти зумовлені наявністю в їх структурі тіольної групи, що дозволяє цим препаратам відігравати роль донаторів SH-груп та нормалізувати стан системи глутатіону за умов окисного стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальна церебральна ішемія, тіолдисульфідна рівновага, тіотриазолін, α -ліпоєва кислота, білок теплового шоку.

ВСТУП. Протягом багатьох років інсульт займає лідируючі позиції серед причин захворюваності, смертності та інвалідизації у світі. На частку ішемічних порушень мозкового кровообігу припадає близько 80 % усіх видів інсульту. На даний час детально вивчено етіологічні чинники і патогенез церебральної ішемії, стали доступними передові методи діагностики [5, 9].

Одним із ключових механізмів пошкодження нервової тканини при порушенні мозкового кровообігу є гіпоксія. Дефіцит кисню за умов ішемії головного мозку призводить до швидкого розладу функціонування прооксидантної і антиоксидантної систем, які в нормі формують стабільний енергетичний гомеостаз. Перспективним у цьому напрямку є вивчення стану антиоксидантної системи, в яку входить цілий ряд сполук, зокрема система глутатіону [7, 8]. Відомості про роль глутатіону при ішемії головного мозку є суперечливими. Так, за даними ряду авторів, зменшення рівня глутатіону підсилює ішемічне пошкодження головного мозку, а підвищення – знижує [3]. З іншого боку, глутатіон може викликати викид глутамату, масивне вивільнення якого призводить до розвитку глутамат-кальцієвого

каскаду і пошкодження нейронів та клітин глії. Основною роллю системи глутатіону є захист клітин від активних форм кисню (АФК), продукція яких значно збільшується при ішемії мозку [6]. Система глутатіону бере участь у реалізації цілого ряду найважливіших фізіологічних процесів: детоксикації та антиоксидантного захисту; біохімічних перетворень вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти та убіхінону; регуляції тіолдисульфідної рівноваги; процесі транспорту амінокислот; підтримці відновного середовища клітини; регуляції вуглеводного, ліпідного, білкового та нуклеїнового обмінів; підтримці оптимального стану і функцій біологічних мембран; обміні ряду ейкозаноїдів – простагландинів та лейкотриєнів. Глутатіон також є резервом цистеїну в клітині й бере участь у реалізації механізмів програмованої клітинної загибелі [4, 10].

Останнім часом з'явилися дані про роль білка теплового шоку Hsp 70 при інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення, що супроводжується порушенням тіолдисульфідної рівноваги, глутаматної ексайтотоксичності. Експресія білка Hsp 70 індукується в клітинах живих організмів у відповідь на дію чисельних стресових факторів, таких, як тепловий шок, гіпоксія, ішемія, метаболічні порушення, вірус-

© С. В. Горбачова, І. Ф. Бєленічев, 2012.

на інфекція, дія фармакологічних агентів. Білок Hsp 70 бере участь у всіх процесах життєдіяльності тканин організму. Імовірно, більшість захисних функцій білка Hsp 70 пов'язана з його шаперонною активністю [13, 16].

Одним із перспективних методів лікування ішемічного інсульту є нейропротекторна терапія з використанням препаратів, спрямованих на метаболічний захист мозку. До таких препаратів з нейропротекторним ефектом належить α -ліпоева кислота, яка чинить позитивний вплив на енергетичний обмін шляхом активації мітохондріальних ферментів і має антиоксидантну дію [10].

З огляду на це, метою даного дослідження були вивчення стану тіолдисульфідної системи, її корекція тіотриазоліном і α -ліпоевою кислотою та кореляція виявлених змін з інтенсивністю експресії білка теплового шоку Hsp 70 за умов експериментальної церебральної ішемії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом необоротної односторонньої оклюзії сонної артерії у монгольських піщанок масою 65–70 г, яких найчастіше використовують для моделювання порушення мозкового кровообігу. Всі експериментальні процедури проводили згідно з Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях. Піщанок виводили з експерименту під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) внутрішньочеревно [11].

Кожного дня з 1-ї до 4-ї доби у тварин оцінювали вираження неврологічного дефіциту за шкалою С. Р. McGrow [15]. Тяжкість стану визначали за сумою відповідних балів, відмічали парези, паралічі кінцівок, тремор, маневні рухи, птоз, положення на боці, рухливість, як прояв неврологічного дефіциту розглядали утримування піщанок на стержні діаметром 15 см, що обертається зі швидкістю 3 об./хв. Біохімічні дослідження головного мозку проводили через 24 год та на 4 добу ішемії. Для цього збагачену фракцію нейронів шляхом диференційованого ультрацентрифугування розділяли на дві фракції – цитозольну і мітохондріальну. Центрифугування проводили при 60 000 g у рефрижераторній центрифугі Centrifuge 5804R ("Eppendorf", Німеччина). В отриманих цитозольній і мітохондріальній фракціях спектрофотометрично досліджували відповідні показники. Концентрацію відновленого й окисненого глутатіону визначали в депротейнізованому цитозолі флуориметричним методом з реєстрацією показників на флуо-

риметрі Hitachi MPF-4 (Японія). Як флуоресцентний реагент використовували о-фталевий альдегід ("Sigma", США). Активність глутатіонредуктази (ГР) оцінювали за споживанням NADPH ("Sigma", США), а глутатіонпероксидази (ГПП) – за швидкістю окиснення NADPH у зв'язаній глутатіонредуктазній системі [1, 2]. У гомогенаті кори біохімічними методами визначали вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) за рівнем альдегідних (АФГ) та карбоксильних (КФГ) продуктів ОМБ за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним [14].

Концентрацію в тканинах головного мозку білка Hsp 70 визначали методом Вестерн-блот-аналізу. Білки розділяли в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенесення білків з ПААГ на мембрану нітроцелюлози здійснювали шляхом електроелектролізу протягом 45 хв. Передінкубацію Вестерн-блотів проводили в розчині TBST з 5 % знежиреним молоком протягом 1 год. Потім Вестерн-блоти інкубували за присутності первинних моноклональних антитіл (Santa Cruz Biotechnology) проти HSP у розведенні 1:1000 протягом 1 год. Після відмивання блоти інкубували за наявності вторинних антитіл (Santa Cruz Biotechnology), кон'югованих з пероксидазою хрому (розведення 1:2000), упродовж 1 год. Детекцію HSP здійснювали за допомогою денситометрії в програмі "Adobe Photoshop" [12].

Статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Стюдента. Результати аналізу показників вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Моделювання експериментальної церебральної ішемії призводило до інтенсифікації ОМБ, що підтверджувалось накопиченням альдегідних та карбоксильних продуктів у тканинах головного мозку експериментальних тварин. Концентрація альдегідфенілгідразонів (АФГ) як ранніх маркерів пошкодження білкових молекул через 24 год від початку оклюзії сонної артерії підвищувалася в 3,1 раза порівняно з псевдооперованими тваринами. Накопичення кетонфенілгідразонів (КФГ) як найбільш токсичних продуктів окисного пошкодження білків на 4 добу експерименту свідчило про високу інтенсивність окисного стресу в тканинах головного мозку. Величина КФГ у цей термін експерименту досягала 1,8 у. о., що в 6,2 раза перевищувало аналогічний показник псевдооперованих тварин (табл. 1).

При проведенні аналізу стану тіолдисульфідної системи за умов експериментальної

церебральної ішемії було виявлено як тяжкі порушення вмісту окиснених та відновлених форм глутатіону, так і зниження активності ключових ферментів вказаної антиоксидантної системи – глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Тенденція до зменшення концентрації відновленої форми глутатіону та активності ферментів одночасно з підвищенням активності процесів окисної модифікації білків свідчила про виснаження антиоксидантних систем нервової тканини при церебральній патології. Так, у тварин контрольної групи в гомогенаті тканин головного мозку через 24 год після моделювання гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) було зареєстровано зниження активності ГПР на 64,4 %, а активності ГР – на 75 %, яке відбувалося паралельно з накопиченням окисненого глутатіону (табл. 2, 3). У ході біохімічних досліджень на 4 добу експерименту встановлено подальше виснаження вмісту відновленої форми глутатіону та накопичення його окисненої

форми, що відбувалося на фоні подальшого зниження активності антиоксидантних ферментів (ГПР, ГР).

Проведення фармакотерапії тіотриазоліном та α -ліпоевою кислотою показало здатність препаратів у різні строки експерименту обмежувати дію окисного стресу на нейрональні клітини, яка проявлялася гальмуванням утворення продуктів окисної модифікації білків, зменшенням вмісту окисненого глутатіону та нормалізацією активності ГПР та ГР. Підвищення активності вказаних ферментів може свідчити про захист нейронів від активних форм кисню і продуктів окисної модифікації та пероксидації за умов церебральної ішемії, що дозволяє певною мірою відновити тіолдисульфідну рівновагу. Виявлені патобіохімічні ефекти тіотриазоліну та α -ліпоевої кислоти зумовлені наявністю в їх структурі тіольної групи, що дозволяє цим препаратам відігравати роль донаторів SH-груп та нормалізувати стан системи глутатіону при окисному стресі.

Таблиця 1 – Показники окисної модифікації білків у мозку тварин у різні терміни церебральної ішемії

Група тварин	Продукти ОМБ, у. о./г білка			
	АФГ (270 нм)		КФГ (363 нм)	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	0,45±0,05	0,41±0,03	0,25±0,03	0,29±0,04
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	1,4±0,035	2,1±0,04	0,56±0,03	1,8±0,08
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	0,72±0,02*	1,3±0,03*	0,34±0,01*	0,82±0,12*
Тварини з ГПМК+ α -ліпоева кислота (n=7)	0,74±0,03*	1,42±0,02*	0,36±0,01*	0,95±0,16*

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – $p \leq 0,05$ відносно групи тварин з ГПМК.

Таблиця 2 – Активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази в тканинах мозку тварин з ГПМК

Група тварин	ГПР, мкмоль/мг білка/хв		ГР, мкмоль/г білка/хв	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	68,9±4,8	61,2±4,6	15,1±1,1	12,8±0,78
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	24,5±3,1	15,3±2,6	6,0±0,95	4,7±0,62
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	45,6±3,9*	37,5±1,5*	10,4±0,88*	7,5±0,86
Тварини з ГПМК+ α -ліпоева кислота (n=7)	42,3±3,2*	35,9±3,3*	10,3±0,9*	7,3±1,2

Таблиця 3 – Стан системи глутатіону в тканинах мозку тварин з ГПМК

Група тварин	Глутатіон відновлений		Глутатіон окиснений	
	1 доба	4 доба	1 доба	4 доба
Псевдооперовані тварини (n=10)	3,1±0,07	2,95±0,05	0,12±0,02	0,14±0,02
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	0,54±0,03	0,26±0,04	0,9±0,07	1,65±0,04
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	1,8±0,06*	1,45±0,02*	0,61±0,06*	0,82±0,05*
Тварини з ГПМК+ α -ліпоева кислота (n=7)	2,0±0,05*	1,52±0,03*	0,63±0,05*	0,79±0,04*

ВИСНОВКИ. Моделювання ГПМК шляхом односторонньої оклюзії сонної артерії викликало виникнення тяжких неврологічних порушень у 100 % контрольних тварин (на 4 добу спостерігався середній бал 11,4). У дослідних групах, які отримували експериментальну терапію

тіотриазоліном та α -ліпоевою кислотою, тварин з тяжкою симптоматикою було достовірно менше, ніж у контрольній, і вірогідно знижувалась їх летальність на фоні ГПМК (табл. 4).

Слід відзначити позитивну динаміку відповідних біохімічних показників на тлі викорис-

Таблиця 4 – Розвиток неврологічного дефіциту тварин з ГПМК та вміст білка Hsp 70

Група тварин	1 доба		4 доба		Кількість тварин, які вижили, на 4 добу, %
	Середній бал	Hsp 70, у. о. білка	Середній бал	Hsp 70, у. о. білка	
Псевдооперовані тварини (n=10)	1,9±0,6	15,6±0,41	2,00±0,5	15,5±0,36	100
Тварини з ГПМК (контроль) (n=5)	9,2±1,2	16,9±0,38	11,4±3,00	16,4±0,44	30
Тварини з ГПМК+тіотриазолін (n=6)	6,4±0,8	24,4±0,33*	7,33±0,44	22,7±0,28*	60
Тварини з ГПМК+α-ліпоєва кислота (n=7)	6,8±1,5	19,8±0,4*	7,7±1,77	18,3±0,31	70

тання тіотриазоліну, який майже в 1,8 раза знижував виникнення неврологічної симптоматики та летальності, переважаючи за ними α-ліпоєву кислоту. Аналіз неврологічної симптоматики та дослідження вмісту білка Hsp 70 виявили кореляцію цих показників. Встановлено, що у тварин з високим балом неврологічного дефіциту за шкалою Р. McGrow вміст Hsp 70 більш низький. Підвищення концентрації білка Hsp 70, на нашу думку, пов'язане з його шаперонною активністю за умов окис-

ного стресу, яка спрямована на захист білкових молекул та посилення адаптаційних можливостей нервової тканини при церебральній ішемії. Пов'язуючи ці дані з результатами біохімічних досліджень стану тіолдисульфідної системи, можна стверджувати, що білок Hsp 70 позитивно впливає на синтез та активність антиоксидантних ферментів. Ці дані узгоджуються з результатами зарубіжних досліджень, в яких показано нейропротекторну активність Hsp 70 за умов гіпоксії [16, 17].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 739 с.
- Беленічев І. Ф. Продукти вільнорадикального окиснення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.
- Верлан Н. В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии : дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2008. – 210 с.
- Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии / Э. Г. Горожанская, В. Б. Ларионова, Г. Н. Зубрихина // Рос. онкол. журн. – 2002. – № 5. – С. 29–32.
- Гусев Е. И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов // Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С. 44–48.
- Изучение системы глутатиона у больных с хронической церебральной ишемией / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, В. В. Шпрах [и др.] // Паллиативная медицина и реабилитация : Научно-практич. журн. – 2004. – № 2. – С. 40–41.
- Коржов В. И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В. И. Коржов // Журн. Академії медичних наук України. – 2007. – **13**, № 1. – С. 3–19.
- Острая церебральная недостаточность / В. И. Черный, В. Н. Ельский, Г. А. Городник, А. Н. Колесников. – Донецк : ООО “ИПП “Промінь”, 2007. – 514 с.
- Румянцева С. А. Патологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга / С. А. Румянцева, В. В. Афанасьев, Е. В. Силина // Журн. неврол. и психиатрии. – 2009. – № 3. – С. 64–68.
- Система глутатиона крови при цереброваскулярных заболеваниях и коррекция нарушений ее функций α-липоевой кислотой / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, В. В. Бардымов [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2006. – № 3. – С. 34–38.
- Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації. – К.: Авіцена, 2002. – 527 с.
- Avrames S. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies / S. Avrames, T. Termynck // Mol. Immunol. – 1993. – **30**. – P. 119–127.
- Downstream caspases are novel targets for the anti-apoptotic activity of the molecular chaperone Hsp 70 / E. Y. Komarova, E. A. Afanasyeva, M. M. Bulatova [et al.] // Cell Stress & Chap. – 2004. – № 9. – P. 265–275.
- Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Oxford Press. – 1999. – № 2. – P. 248.
- McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – **34**, № 6. – P. 334–336.

16. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones / R. I. Morimoto, M. P. Kline, D. N. Bimston, J. J. Cotto // Essays Biochem. – 1997. – 32. – P. 17–29.

17. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp 70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury / J. C. Plumier, A. M. Krueger, R. W. Currie [et al.] // Cell Stress Chaperones. – 1997. – № 2. – P. 162–167.

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев
ЗАПОРІЖСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА И α -ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Резюме

Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения путем односторонней окклюзии сонной артерии вызывало возникновение тяжелой неврологической симптоматики, которая сопровождалась нарушением тиолдисульфидного равновесия, активацией процессов окислительной модификации белков и повышением уровня белка Hsp 70. Проведение фармакотерапии тиотриазолином и α -липоевой кислотой показало способность препаратов в разные сроки эксперимента ограничивать действие окислительного стресса на нейрональные клетки, что проявлялось торможением образования продуктов окислительной модификации белков, уменьшением содержания окисленного глутатиона и нормализацией активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Выявленные патобиохимические эффекты тиотриазолина и α -липоевой кислоты обусловлены наличием в их структуре тиольной группы, что позволяет этим препаратам выступать в роли донаторов SH-групп и нормализовать состояние системы глутатиона в условиях окислительного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экспериментальная церебральная ишемия, тиолдисульфидное равновесие, тиотриазолин, α -липоевая кислота, белок теплового шока.

S. V. Horbachova, I. F. Bielenichev
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF THIOTRIAZOLINE AND α -LIPOIC ACID ON MARKERS OF THIOL-DISULFIDE SYSTEM UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Summary

Modeling of acute damage of brain circulation by way of unilateral occlusion of carotid artery causes arising of severity neurological symptomatic, which was accompanied by damaging of thiol-disulfide equilibrium, activation of processes of protein oxidative modification and increasing of level of protein Hsp 70. Conduction of pharmacotherapy with thiotriazoline and α -lipoic acid showed ability of preparations to limit an action of oxidative stress on neuronal cells on different terms of experiment, what was shown on braking of protein oxidative modification products formation, decreasing of oxidative glutathione content and normalization of GPR and GR activity. Pathobiochemical effects of thiotriazoline and α -lipoic acid, which were revealed, stipulated by presence in their structure thiol-group, that allows to these preparations to be in role of SH-groups donators and to normalize state of glutathione system under conditions of oxidative stress.

KEY WORDS: experimental cerebral ischemia, thiol-disulfide equilibrium, thiotriazoline, α -lipoic acid, heat-shock proteins.

Отримано 08.02.12

Адреса для листування: С. В. Горбачова, Запорізький державний медичний університет, вул. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

ВПЛИВ ПОХІДНИХ КРАУН-ЕФІРІВ НА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МІОКАРДІ

Проведено дослідження метаболічних порушень обміну нікотинамідних коферментів та макроергічних сполук – аденілових нуклеотидів, креатинфосфату і ферментів їх метаболізму в тканинах міокарда за умов токсичної антрациклінової кардіоміопатії (ТАК). Вивчено вплив на біоенергетичні процеси в міокарді тварин з ТАК нової фізіологічно активної сполуки метаболічної дії, зокрема похідного урацилу (карбіцилу), порівняно з кардіотоніками інших фармакологічних класів. Встановлено, що метаболічний кардіотонік краун-ефір карбіцил при введенні щурам з рубоміциновою кардіоміопатією значно нормалізує стан окисно-відновних процесів у міокарді; нормалізує ультраструктуру мітохондрій; зменшує вираження порушень енергетичного обміну в кардіоміоцитах; підвищує вміст окиснених форм коферментів НАД⁺ та НАДФ⁺; збільшує рівень АТФ, КрФ, глікогену.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рубоміцин, карбіцил, метаболічні кардіотоніки.

ВСТУП. Захворювання серцево-судинної системи продовжують займати провідне місце серед причин смертності населення більшості індустриальних країн світу. Значну роль серед причин серцевої недостатності відіграють кардіоміопатії, зумовлені різними токсичними чинниками, що викликають стан оксидантного стресу в цілісному організмі [1, 2], в тому числі дією лікарських засобів, зокрема антибіотиків антрациклінового ряду, антиметаболічних препаратів протипухлинної дії [3, 4].

Разом із тим, незважаючи на численні дослідження, біохімічні та молекулярні механізми порушення скоротливої діяльності кардіоміоцитів та її енергозабезпечення за умов серцевої недостатності (СН) усе ще недостатньо вивчено [7, 12], вони становлять одну з актуальних проблем медичної біохімії. Існуючі літературні дані свідчать про доцільність пошуку та вивчення механізмів дії нових серцево-судинних лікарських засобів кардіопротекторної дії серед аналогів природних метаболітів – амінокислот, нуклеотидів, фізіологічно активних азотовмісних гетероциклічних сполук.

Значний інтерес для практичного застосування в кардіології викликає клас макроциклічних поліефірів, представники якого мають високу біологічну активність завдяки своїм унікальним комплексуювальним властивостям і подібності до іонофорних антибіотиків [10]. Тому доцільно вивчити вплив на біо-

енергетичні процеси в міокарді нових похідних класу краун-ефірів порівняно з відомими еталонними кардіотоніками.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

1. Провести дослідження метаболічних порушень обміну нікотинамідних коферментів та макроергічних сполук – аденілових нуклеотидів, креатинфосфату і ферментів їх метаболізму в тканинах міокарда за умов токсичної антрациклінової кардіоміопатії (ТАК).

2. Вивчити вплив на біоенергетичні процеси в міокарді тварин з ТАК нової фізіологічно активної сполуки (ФАС) метаболічної дії, зокрема похідного урацилу (карбіцилу), порівняно з кардіотоніками інших фармакологічних класів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Основні серії експериментальних досліджень виконано на дорослих білих щурах лінії Вістар та кролях, яких утримували у віварії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Утримування і досліди на тваринах проводили відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Експериментальну серцеву недостатність моделювали в дослідах на щурах-самцях шляхом щотижневого внутрішньом'язового введення рубоміцину гідрохлориду в дозі 5 мг/кг маси тіла протягом 5 тижнів. Застосовували такі препарати: ру-

боміцину гідрохлорид ("Мосмедпрепарати" ім. Л. Я. Карпова), даунорубіцин (рубоміцину гідрохлорид виробництва АТ Ферейн, РФ).

Вміст у тканинах міокарда та печінки окиснених (НАД^+ , НАДФ^+) та відновлених форм (НАДН , НАДФН) нікотинамідних коферментів визначали флуорометричним методом, активність НАД -гідролізуючих ферментів – за швидкістю гідролізу НАД^+ [11], вміст аденілових нуклеотидів – електрофоретичним методом з подальшою спектрофотометрією при довжині хвилі 260 та 290 нм. Вміст креатинфосфату (КрФ) оцінювали як різницю між загальним і вільним креатином, який визначали при спектрофотометричному продовженні хвилі 525 нм, глікогену – за допомогою антронового реактиву, активність креатинфосфатокінази (КФК) – за утворенням вільного креатину при інкубації з КрФ [5].

Порушення біоенергетичних процесів у клітинах міокарда за умов експериментальної кардіоміопатії було виявлено в багатьох дослідженнях [6, 8]. Разом із тим, детальних досліджень клітинної біоенергетики в міокарді при експериментальному моделюванні ТАК шляхом введення кардіотоксичного антибіотика рубоміцину раніше не проводили, що і стало об'єктом наших досліджень.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У ході досліджень було встановлено, що введення щурів рубоміцину гідрохлориду призводило до суттєвого порушення реакцій біологічного окиснення та постачання енергетичних субстратів у кардіоміоцитах, про що свідчили негативні зміни в концентрації та катаболізмі

нікотинамідних коферментів НАД^+ і НАДФ^+ , різке зменшення вмісту КрФ та глікогену (в 2,81 і 2,29 раза відповідно) та суттєве (на 75,3 %) зниження активності КФК (табл. 1).

На тлі порушення окиснювальних процесів та зменшення вмісту в кардіоміоцитах КрФ, що є резервом для відновлення макроенергетичних фосфатів у результаті функціонування креатинфосфокіназної реакції [9], в міокарді щурів спостерігалось значне зниження потенціалу фосфорилування та фонду АТФ, необхідного для виконання скорочувальної функції актомиозиновими комплексами міофібрил (табл. 2).

Для оцінки кардіопротекторних ефектів досліджуваного метаболітного ФАС карбіцилу, порівняно з β -адреноміметиком добутаміном, було проведено дослідження впливу зазначених ФАС на показники обміну нікотинамідних коферментів, вміст аденілових нуклеотидів, глікогену і стан креатинфосфокіназної системи за умов моделювання токсичної серцевої недостатності рубоміцином. Як свідчать результати, наведені на рисунку 1, у щурів, яким на тлі рубоміцину гідрохлориду вводили карбіцил, у кардіоміоцитах підвищувався на 24,9 % вміст окиснених форм нікотинамідних коферментів. Коефіцієнт окиснені/відновлені піридиннуклеотиди зростав при дії карбіцилу на 36,9 %. Загальна сума коферментів також збільшилась, що свідчило про тенденцію до нормалізації окиснювальних процесів. Активність НАД -гідролази за умов експерименту нормалізувалась.

Вплив карбіцилу та добутаміну на показники обміну аденілових нуклеотидів у міокарді щурів при ТАК, зумовлений рубоміцином, показано на рисунку 2.

Таблиця 1 – **Зміни показників енергетичного обміну в міокарді щурів при ТАК, модельованій шляхом введення рубоміцину ($M \pm m$)**

Біоенергетичний показник	Контроль	Рубоміцин
$\text{НАД}^+ + \text{НАДФ}^+$, мкмоль/кг тканини	483 $\pm$ 7	365 $\pm$ 7*
$\text{НАД}^+ + \text{НАДФ}^+ + \text{НАДН} + \text{НАДФН}$, мкмоль/кг тканини	820 $\pm$ 14	764 $\pm$ 7*
Коефіцієнт окиснені/відновлені піридиннуклеотиди	1,43 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,02*
НАД -гідролаза, мкмоль/кг·год	2615 $\pm$ 84	3589 $\pm$ 86*
КрФ, мкмоль/г тканини	3,94 $\pm$ 0,88	1,40 $\pm$ 0,20*
КрФ, мкмоль/г тканини·хв	5,75 $\pm$ 0,22	3,28 $\pm$ 0,24*
Глікоген, мг/кг тканини	218 $\pm$ 13	95 $\pm$ 8*

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

Таблиця 2 – **Вміст аденілових нуклеотидів (ммоль/кг тканини) в міокарді щурів за умов експериментальної ТАК ($M \pm m$)**

Нуклеозидфосфати	Контроль	Рубоміцин
АТФ	2,04 $\pm$ 0,07	1,44 $\pm$ 0,03*
АДФ	1,38 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,02*
АМФ	0,89 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,08*
АТФ/АДФ	1,47 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,09*
Потенціал фосфорилування	0,63 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,04*

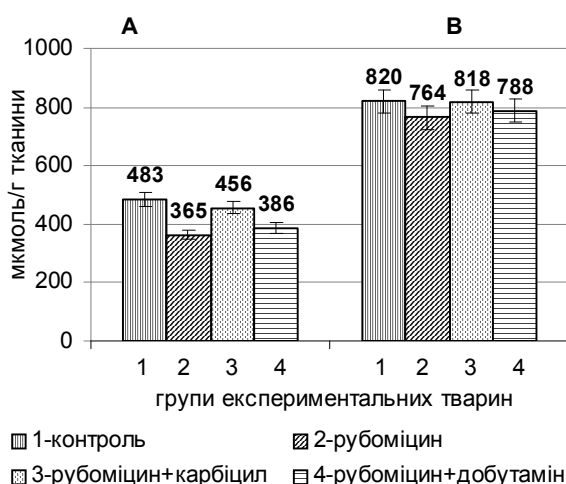


Рис. 1. Вплив кардіотоніків метаболітної дії, порівняно з добутаміном, на суму $\text{NAD}^+ + \text{NADH}^+$ (А) і загальний вміст окиснених та відновлених піридиннуклеотидів (В) у міокарді щурів за умов експериментальної ТАК.

Як свідчать отримані дані, система аденілових нуклеотидів теж зазнала менших порушень у міокарді тварин, які одержували рубоміцин разом із карбіцилом. Було встановлено, що система аденілових нуклеотидів зазнала менших негативних порушень і за умов введення щурам, отруєним рубоміцином, метаболітного препарату карбіцилу вміст АТФ зростає на 21,5 %, потенціал фосфорилування збільшується на 13,7 %, рівень АМФ, відпо-

відно, зменшувався на 28 %, а вміст $\text{P}_{\text{неорг.}}$ наближався до величин у контрольній групі.

Як зазначено вище, важливими біохімічними компонентами кардіоміоцитів, резерви яких за умов експериментальної ТАК суттєво зменшувались, є глікоген та КрФ, що при дії ізоферментів КФК функціонував як транспортер у реакціях синтезу АТФ. Результати вивчення впливу метаболітного препарату карбіцилу, порівняно з β -адреноміметиком добутаміном, на вміст глікогену, КрФ та активність КФК у міокарді щурів при ТАК, зумовленій рубоміцином, наведено в таблиці 3.

За умов введення карбіцилу спричинене рубоміцином зниження в міокарді концентрації як глікогену, так і КрФ було значно менш вираженим. Зокрема, рівень глікогену в серцевому м'язі тварин, які отримували карбіцил на тлі пошкодження рубоміцином, перевищував відповідні значення у щурів, яким вводили рубоміцин без метаболітних препаратів, на 102 %, наближаючись до контрольних величин.

Подібну значну протекторну дію карбіцилу виявлено і стосовно концентрації КрФ та активності КФК у міокарді щурів з пошкодженням рубоміцином.

Підсумовуючи вищенаведене, необхідно відзначити, що досліджувана сполука метаболітної природи карбіцил, що має кардіотонічну активність, суттєво активує процеси енерго-

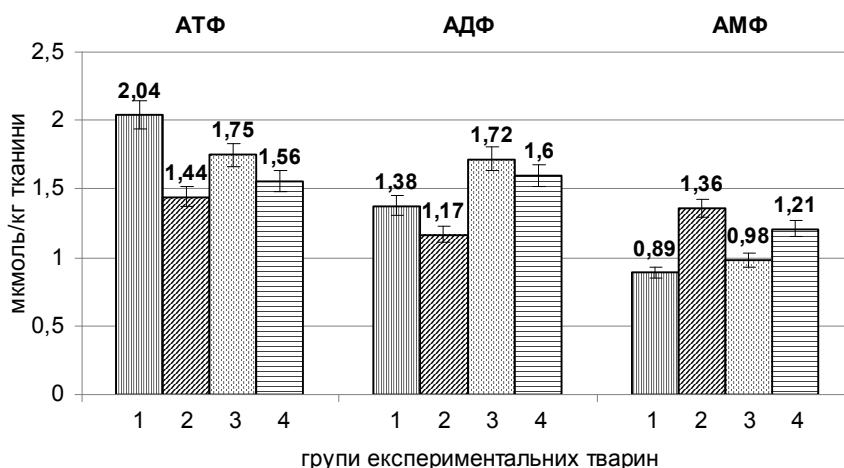


Рис. 2. Вплив карбіцилу та добутаміну на показники обміну аденілових нуклеотидів.

Таблиця 3 – Вплив карбіцилу на вміст КрФ і глікогену та активність КФК у міокарді щурів за умов експериментальної ТАК ($M \pm m$)

Умови експерименту	КрФ, ммоль/г тканини	КФК, мкмоль КрФ/г·хв	Глікоген, мг/кг
Контроль	$3,94 \pm 0,88$	$5,75 \pm 0,22$	$218,2 \pm 13,1$
Рубоміцин	$1,40 \pm 0,20^*$	$3,28 \pm 0,24^*$	$95,2 \pm 8^*$
Рубоміцин+карбіцил	$3,32 \pm 0,68^{**}$	$4,72 \pm 0,32^*$	$192,1 \pm 12,5^*$
Рубоміцин+добутамін	$1,90 \pm 0,54^*$	$2,66 \pm 0,46^*$	$98,3 \pm 11,2^{**}$

утворення та інтенсивність енергетичного обміну в міокарді інтактних тварин; більше того, значною мірою нормалізує порушення в системі макроергічних фосфатів та нікотинамідних коферментів при рубоміциновій ТАК. Значне покращення показників енергетичного обміну в міокарді при впливі карбіцилу, ймовірно, можна пояснити близькістю його хімічної будови до піримідинових основ, які завдяки впливу на синтез нуклеїнових кислот та інших регуляторних молекул мають змогу впливати на пластичні процеси в клітинах і на спряжені з ними процеси енергоутворення.

ВИСНОВКИ. 1. У результаті проведених наукових досліджень вивчено біохімічні механізми порушень біоенергетичних процесів у кардіоміоцитах за умов ТАК, що проявляються

порушеннями окиснювальних процесів у мітохондріях, зменшенням вмісту в кардіоміоцитах резервів метаболітної енергії та макроергічних сполук – глікогену, креатинфосфату, АТФ та АДФ, являючи собою біохімічний субстрат порушення при СН енергозабезпечення скорочувального актоміозинового апарату міофібрил.

2. Уперше встановлено, що метаболітний кардіотонік похідне урацилу краун-ефір карбіцил при введенні щурам з рубоміциновою кардіоміопатією значно нормалізує стан окисно-відновних процесів у міокарді, нормалізує ультраструктуру мітохондрій, зменшує вираження порушень енергетичного обміну в кардіоміоцитах, підвищує вміст окиснених форм коферментів НАД⁺ та НАДФ⁺, збільшує рівень АТФ, КрФ, глікогену.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айстраханов Д. Д. Загальний огляд медико-демографічної ситуації та аналіз тенденцій у сфері охорони здоров'я за останні п'ять років (2002–2006 рр.) / Д. Д. Айстраханов, М. В. Банчук, І. І. Волинкін // Україна: здоров'я нації. – 2007. – № 3. – С. 3–7.
2. Амосова К. М. Діагностика та лікування гострої серцевої недостатності. Основні положення рекомендацій Європейського кардіологічного товариства / К. М. Амосова, Л. О. Ткаченко. // Серце і судини. – 2006. – № 2. – С. 24–33.
3. Бабак В. В. Фармакодинамика сочетанного применения сердечных гликозидов с цистеином, ацетилцистеином, таурином : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук / В. В. Бабак. – К., 1990. – 22 с.
4. Базарнова М. А. Руководство по клинической лабораторной диагностике : учебн. пособие / М. А. Базарнова, А. И. Воробьева, З. С. Баркаган. – К. : Вища школа, 1991. – 615 с.
5. Губский Ю. И. Определение активности перекисного окисления липидов в животных тканях / Ю. В. Хмелевский, Ю. И. Губский, С. Д. Зайцева // Биологическая химия. Практикум. – К. : Вища школа, 1985. – С. 119–121.
6. Ивашкин В. Т. Особенности синтеза оксида азота у больных с хронической сердечной недостаточностью / В. Т. Ивашкин, С. В. Горбатенкова, О. М. Драпкина // Клиническая медицина. – 2004. – № 2. – С. 20–23.
7. Коркушко О. В. Современные представления о синдроме миокардиальной ишемии / О. В. Коркушко, В. Ю. Лишневская // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 1. – С. 8–17.
8. Мохорт Н. А. Фармакодинамика и пути поиска кардиотонических лекарственных средств / Н. А. Мохорт, Н. А. Горчакова, А. И. Гриневич. – К., 1999. – 128 с.
9. Сакс В. А. Биохимические основы защитного действия креатинфосфата на ишемический миокард / В. А. Сакс, С. А. Джавадов, Е. Г. Позин // Фосфо-креатин: биохимическое и фармакологическое действие и клиническое применение. – М., 1989. – С. 134–159.
10. Синкай С. Новые достижения в химии перекисных краун-эфиров и перспективы их развития / С. Синкай // Журн. Всесоюз. химич. общества им. Д. И. Менделеева. – 1985. – № 5. – С. 546–555.
11. Телепнева В. И. Ферментативное превращение НАД в клеточных фракциях скелетных мышц в норме и при денервации / В. И. Телепнева, И. В. Исаева // Вопр. мед. химии. – 1967. – № 13. – С. 242–247.
12. Фролькис В. В. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы / В. В. Фролькис, В. В. Безруков, О. К. Кульчицкий. – К. : Наукова думка, 1994. – 248 с.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КРАУН-ЭФИРОВ НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИОКАРДЕ

Резюме

Проведено исследование метаболических нарушений обмена никотинамидных коферментов и макроэргических соединений – адениловых нуклеотидов, креатинфосфата и ферментов их метаболизма в тканях миокарда в условиях токсической антрациклиновой кардиомиопатии (ТАК). Изучено влияние на биоэнергетические процессы в миокарде животных с ТАК нового физиологически активного соединения метаболического действия, а именно производного урацила (карбицила), в сравнении с кардиотониками других фармакологических классов. Установлено, что метаболический кардиотоник краун-эфир карбицил при введении крысам с рубомициновой кардиомиопатией значительно нормализует состояние окислительно-восстановительных процессов в миокарде; нормализует ультраструктуру митохондрий; уменьшает выраженность нарушений энергетического обмена в кардиомиоцитах; повышает содержание окисленных форм коферментов НАД⁺ и НАДФ⁺; увеличивает уровень АТФ, КрФ, гликогена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рубомицин, карбицил, метаболические кардиотоники.

I. V. Nizhenkovska, O. I. Nizhenkovskyi, O. V. Velchynska, K. Yu. Philipova
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O. O. BOHOMOLOTS, KYIV

INFLUENCE OF CROWN-ETHER'S DERIVATIVES ON THE BIOENERGETICAL PROCESSES IN THE MYOCARD

Summary

Investigation of metabolic disturbs – change of nicotinamid's coenzymes and macroergic compounds – adenilic nucleotides, creatine phosphate and ferments of it's metabolism at myocardial tissue at conditions of toxically antracycliniak cardiomyopathy (TAC) were carried out. The influence on bioenergetical processes at myocardium of animals with TAC of new physiological active compound with metabolic action such as derivative of uracile (Carbicyl) in comparison with cardiotonics of other pharmacological classes were studied. It was shown that metabolic cardiotonic crown-ether Carbicyl essential standardize of position of oxidation-hydrogenization processes at myocardium; standardize of ultrastructural lesion; reduce of expressive of energetically change disturbs at the cardiomiocytes; increase of contents of oxidated forms of coenzymes NAD⁺ and NADP⁺; increase of the level of ATP, creatine phosphate, glycogen.

KEY WORDS: rubomycin, Carbicyl, metabolic cardiotonics.

Отримано 18.10.11

Адреса для листування: О. В. Вельчинська, вул. Анни Ахматової, 16 "Г", кв. 14, Київ–068, 02068, Україна.

ЛІКАРСЬКА ФОРМА ПЕЛОЇДУ КУЯЛЬНИЦЬКОГО ЛИМАНУ ТА ЇЇ ПРОТИЗАПАЛЬНА АКТИВНІСТЬ

На основі проведених біофармацевтичних досліджень встановлено, що пелоїд при регенерації після висушування зберігає свої протизапальні властивості. Тому нами була розроблена самовідновлювальна лікарська форма тривалого зберігання. На моделі карагінанового набряку встановлено, що дана лікарська форма за протизапальною активністю не поступається аплікаціям з нативного пелоїду.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: протизапальна активність, пелоїд, карагінановий набряк.

ВСТУП. Безліч захворювань так чи інакше пов'язані з процесом запалення, що являє собою складну, комплексну місцеву судинно-тканинну захисно-приспосувальну реакцію цілісного організму на вплив патогенного фактора. Вона проявляється розвитком у місці ураження тканини змін кровообігу переважно в мікроциркуляторному руслі, збільшенням проникності судин у поєднанні з дистрофією тканин та проліферацією клітин [2].

Незважаючи на широке різноманіття синтетичних протизапальних засобів, через їх побічні ефекти все ж таки залишається актуальним пошук альтернативних способів лікування. Останнім часом увагу вчених усе більше привертають лікарські засоби природного походження: лікарські рослини, пелоїдотерапія, таласотерапія та ін. [1].

Препарати з лікувальних пелоїдів, зокрема, знаходять застосування при лікуванні хвороб, що супроводжуються запаленням [5]. Найбільш показовим ефектом грязелікування є вплив на місцевий запальний процес. Викликаючи гіперемію тканин, поліпшення трофіки, функцій кровообігу, курс пелоїдотерапії сприяє розсмоктуванню патологічних продуктів запалення. Продукти розпаду білків надходять у кров і діють за типом "автопротеїнотерапії", що підвищує захисні та адаптаційні сили організму, активує систему гіпоталамус-гіпофіз-надниркові залози, підвищує функції симпатико-адреналової системи [2].

Механізм дії пелоїдів пов'язаний із внутрішньоклітинним метаболізмом, що забезпечує новий рівень енергетичного потенціалу

© А.О. Кобернік, І. А. Кравченко, 2012.

організму, змінює реактивність клітинних структур, органів і функціональних систем, через які реалізується терапевтичний ефект [3, 8]. Під впливом лікувальних пелоїдів з'являються сприятливі умови для стимуляції фізіологічних функцій тканини, активізуються реакції окиснення біологічних субстратів, інтенсифікуються біоенергетичні процеси, поповнюються енерговитрати, які витрачаються на боротьбу із запаленням, здійснюється санація запального вогнища [4].

Успішне цілеспрямоване лікування з використанням пелоїду можливе лише за умов санаторно-курортного режиму [5]. Тому, з метою збільшення кількості потенційних споживачів за рахунок можливості використання пелоїдотерапії в амбулаторних і домашніх умовах, актуальним стає питання щодо створення лікарської форми на основі нативного пелоїду Куяльницького лиману.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При встановленні оптимального складу лікарської форми використовували стандартні аналітичні методи титрування: трилонометрію – для визначення кількості катіонів та метод Мора – для визначення кількості аніонів [9].

Ферментативну активність каталази визначали таким чином. Наважку 5 г пелоїду поміщали в колбу, заливали 25 мл 2 % розчину перекису водню і поміщали в термостат при 37 та 42 °С. Через 60 хв із системи відбирали проби по 5 мл, змішували з 5 мл 10 % сірчаної кислоти і титрували 0,1 н. розчином KMnO_4 до блідо-рожевого забарвлення. Контрольні визначення проводили аналогічним чином на

наважках пелоїду, прогрітих у термостаті протягом 1,5 год при 160–170 °С для інактивації ферментів.

Пероксидазну активність визначали за методикою Козлова [7].

Експериментальною моделлю запалення було обрано асептичний карагінаніндукований набряк задньої кінцівки щурів. Гостру запальну реакцію викликали субплантарним введенням 0,2 мл 0,2 % розчину карагану [10]. Спостерігали за функціональним станом тварин протягом 12 днів. Після розвитку запалення через 24 год після введення флогогенного агента проводили відповідну обробку кінцівки протягом 20 хв. Усього було 4 групи тварин, яких піддавали різному лікуванню: 1-ша група слугувала контролем (запалення не лікували); щурам 2-ї групи аплюкували нативний пелоїд, фіксуючи зовні поліетиленовою плівкою; в 3-й групі на уражену кінцівку накладали пов'язки, що містили нативний пелоїд Куяльницького лиману (кожна пов'язка в перерахунку та з урахуванням вологості містила 1 г сухого пелоїду); в 4-й групі обробку кінцівки проводили з використанням пов'язок, що містили нативний пелоїд Куяльницького лиману, відмитий від мінеральних солей (кожна пов'язка містила 1 г сухого пелоїду).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для розробки складу лікувальних серветок на основі пелоїду Куяльницького лиману як пластифікатори було використано дозволені в клінічній практиці 1,2-пропіленгліколь (ПГ) та гліцерин. У таблиці 1 наведено співвідношення компонентів у різних зразках лікувальної форми. Основою слугувала марля розміром 10x10 см.

Дослідження для наукового обґрунтування виду і масового вмісту пластифікатора в лікарських формах на основі пелоїду Куяльницького лиману проводили шляхом вивчення біофармацевтичних властивостей розроблених лікарських форм, яке передбачає встановлення сумарного вмісту в них катіонів та аніонів, а також динаміку вивільнення даних іонів з досліджуваних зразків протягом 45 хв за допомогою стандартних аналітичних методів титрування [9].

Насамперед необхідно було визначити максимально можливий вміст солей у досліджуваних зразках. Для цього зразки повністю розчиняли в дистильованій воді, центрифугували, для титрування використовували отриманий віджим. Надалі (при встановленні динаміки вивільнення солей протягом певного часу) дані результати брали за 100 %.

Результати визначення динаміки вивільнення хлоридів та суми катіонів (Mg^{2+} і Ca^{2+}) із зразків серветок протягом 45 хв у відсотках до сумарного їх вмісту в зразках наведено у таблицях 2 та 3. Обраний проміжок часу зумовлений тим, що саме 40–45 хв – це оптимальний час лікувальної процедури пелоїдотерапії [2].

Найкращі результати вивільнення як катіонів, так і аніонів протягом усього експерименту (45 хв) були притаманні зразку № 3, для виготовлення якого брали 1,5 г гліцерину. Вже через 15 хв вивільнення Cl^- , Mg^{2+} та Ca^{2+} складало 70 % від максимально можливого, а на 45 хвилині вихід складав 80 % для хлоридів і 84 % для суми катіонів Mg^{2+} та Ca^{2+} .

Таким чином, серед восьми досліджених зразків пов'язок найкраща динаміка вивільнення хлоридів та суми катіонів (Mg^{2+} і Ca^{2+})

Таблиця 1 – Склад пов'язок на основі пелоїду Куяльницького лиману

№ зразка	ПВС, г	H ₂ O, мл	Пелоїд, г	Пластифікатор, г
1	0,25	1,5	2,5	Гліцерин 0,5
2	0,25	1,5	2,5	Гліцерин 1
3	0,25	1,5	2,5	Гліцерин 1,5
4	0,50	4,0	5,0	Гліцерин 2
5	0,25	1,5	2,5	1,2-ПГ 0,5
6	0,25	1,5	2,5	1,2-ПГ 1
7	0,25	1,5	2,5	1,2-ПГ 1,5
8	0,50	4,0	5,0	1,2-ПГ 2

Таблиця 2 – Вивільнення хлоридів із зразків серветок (у % до максимального вмісту)

Час, хв	Номер зразка							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	8,3±0,6	12,0±1,1	16,3±0,8	0,9±0,01	6,9±0,5	16,3±0,5	17,2±0,7	14,3±1,1
10	28,3±0,9	33,0±2,9	57,1±2,4	18,3±0,4	26,6±1,9	42,0±3,3	44,0±3,9	40,6±0,9
15	32,5±1,5	51,6±3,1	71,4±6,1	31,0±0,9	39,4±3,5	51,7±3,5	55,7±4,2	50,7±4,1
30	44,3±1,5	61,1±0,2	78,0±1,0	53,1±2,4	52,0±1,7	60,0±2,6	68,0±4,1	62,6±5,6
45	51,7±1,2	69,4±6,2	80,3±3,8	60,3±2,9	57,6±3,0	63,1±1,2	72,4±4,6	69,5±1,0

Таблиця 3 – Вивільнення суми катіонів (Mg^{2+} та Ca^{2+}) із зразків серветок (у % до максимального вмісту)

Час, хв	Номер зразка							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	6,4±0,3	7,4±0,01	13,3±0,4	3,8±0,2	8,9±0,03	15,3±1,1	16,7±0,8	19,7±1,6
10	16,0±0,7	25,6±1,0	58,6±4,6	25,2±2,1	22,7±1,9	40,4±3,8	44,8±3,6	34,7±0,05
15	22,7±0,1	39,4±2,9	71,4±5,1	42,4±3,7	40,4±3,6	49,8±4,7	55,2±0,3	48,9±4,4
30	38,0±1,7	56,0±3,0	80,3±5,7	55,5±3,3	55,7±0,9	51,7±0,1	64,5±3,7	61,6±2,6
45	46,7±2,7	67,0±0,07	84,4±3,3	53,8±3,9	60,0±2,5	61,1±5,4	76,0±2,2	68,5±1,7

була властива зразку № 3, для виготовлення якого використано 1,5 г гліцерину. Саме його склад обрано як оптимальний для визначення ферментативної та протизапальної активності лікарських серветок.

З метою вирішення питання щодо впливу мінерального складу пелоїду Куяльницького лиману на протизапальну активність, яку він зумовлює, постала необхідність виготовлення пов'язок на основі пелоїду, який попередньо відмили від мінеральних солей. Демінералізацію пелоїду проводили шляхом його діалізу проти дистильованої води. З отриманого пелоїду виготовили пов'язки за зразком № 3. Отримані зразки пов'язок також титрували протягом 45 хв, щоб визначити вміст та динаміку вивільнення іонів Cl^- , Mg^{2+} і Ca^{2+} .

З огляду на результати титрування, встановлено, що кількість хлоридів складає близько 17 %, а сума Mg^{2+} та Ca^{2+} – 5,6 % від максимально можливого вмісту. Отримана кількість солей є дуже незначною і нею можна знехтувати, вивчаючи протизапальну активність серветок, адже в такій кількості вони не будуть особливо впливати на розвиток процесу запалення.

Раніше ми вивчили вміст важких металів у пелоїді Куяльницького лиману методом атомно-емісійної спектроскопії на багатоканальному атомно-емісійному спектрометрі. Встановлено, що жоден з елементів не перевищує показників фонового вмісту [6], тобто перебуває в межах допустимих концентрацій. На основі цього можна зробити висновок, що пелоїд Куяльницького лиману є нетоксичним.

Ферменти – це біологічні каталізатори, які прискорюють хімічні реакції в живих організмах у сотні й тисячі разів. Різноманітні ферменти накопичуються в пелоїді в результаті життєдіяльності мікроорганізмів. Вони беруть участь у важливих біохімічних процесах.

В обміні речовин та енергії в пелоїді, й у ґрунтах взагалі, важливе місце належить окисно-відновним ферментам – оксидоредуктазам, з яких найбільш поширені в ґрунтах дегідрогенази, фенолоксидази, пероксидази,

каталази, що виконують певні функції в ґрунтовій біодинаміці.

Активність окисно-відновних ферментів перебуває в кореляційній залежності з основними фізико-хімічними властивостями, мікробіологічними процесами в ґрунтах, нітрифікацією, сульфофікацією [7].

Каталаза та пероксидаза виконують функцію антиоксидантів.

Каталазну активність досліджуваних зразків серветок на основі нативного та відмитого від солей пелоїду, порівняно з нативним і висушеним пелоїдом, за різних температурних умов інкубації (37 °C, 42 °C) протягом 60 хв показано на рисунку 1.

Як свідчать отримані результати, підвищення температури до 42 °C збільшує приблизно на 10 % активність ферменту. Таку температуру було обрано тому, що саме ці температури рекомендуються при проведенні пелоїдотерапії.

Встановлено, що розроблені нами серветки показують рівень каталазної активності, який достовірно не поступається нативному пелоїду, а в ряді випадків і деякою мірою перевищують його. Активність сухого пелоїду і серветок на основі відмитого пелоїду є дещо нижчою, приблизно на 25 %.

Враховуючи те, що ферментативна активність пелоїду зумовлена життєдіяльністю мікроорганізмів, ми попередньо утримували серветки приблизно при 37 °C у незначній кількості дистильованої води протягом 2 та 5 днів, після чого знову визначали їх каталазну активність.

Як видно з графічного зображення, утримування зразків серветок у воді при температурі 37 °C сприятливо впливало на рівень у них каталазної активності, він зростав у середньому на 20–30 %. Це можна пояснити тим, що мікроорганізми, які перебували в стані цисти, відновили свою життєздатність, продуктами якої є оксидоредуктази.

Враховуючи важливе біологічне значення пероксидази в складі пелоїду, ми встановили її активність у розроблених нами пов'язках на основі пелоїду Куяльницького лиману. Отримані результати наведено в таблиці 4.

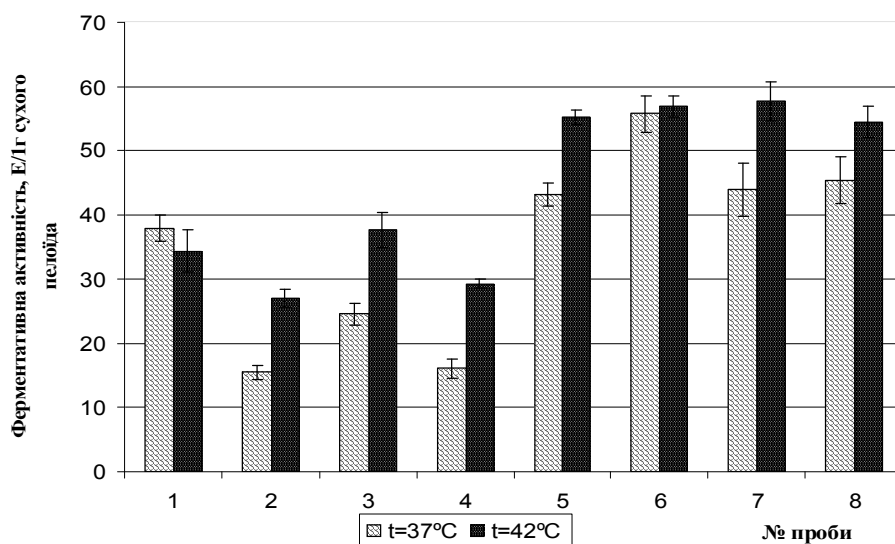


Рис. 1. Каталазна активність пов'язок з пелоїдом (Е/г сухого пелоїду): 1 – пелоїд нативний; 2 – пелоїд сухий; 3 – серветки з нативним пелоїдом; 4 – серветки з відмитим пелоїдом; 5 – серветки з нативним пелоїдом, замочені у воді на 2 дні при $t=37^{\circ}\text{C}$; 6 – серветки з нативним пелоїдом, замочені у воді на 5 днів при $t=37^{\circ}\text{C}$; 7 – серветки з відмитим пелоїдом, замочені у воді на 2 дні при $t=37^{\circ}\text{C}$; 8 – серветки з відмитим пелоїдом, замочені у воді на 5 днів при $t=37^{\circ}\text{C}$.

Таблиця 4 – Пероксидазна активність (Е/г сухого пелоїду) пелоїду в складі пов'язок

Досліджуваний зразок	Е/г сухого пелоїду
Пелоїд нативний	13,49±0,23
Пелоїд сухий	2,71±0,12
Серветки з нативним пелоїдом	12,93±0,16
Серветки з відмитим нативним пелоїдом	9,42±0,15
Серветки з нативним пелоїдом, регенерованим протягом 2 днів	18,59±0,09
Серветки з відмитим нативним пелоїдом, регенерованим протягом 2 днів	12,47±0,10
Серветки з нативним пелоїдом, регенерованим протягом 5 днів	20,61±0,03
Серветки з відмитим нативним пелоїдом, регенерованим протягом 5 днів	20,00±0,06

Встановлено, що серветки на основі нативного пелоїду володіли пероксидазною активністю, яка майже відповідала активності нативного пелоїду. А за умови регенерації серветок (замочування у воді при температурі 37°C протягом 2–5 днів) пероксидазна активність зростала на 50 %.

Серветки на основі відмитого пелоїду демонстрували менші показники пероксидазної активності, що, мабуть, зумовлено частковими втратами пероксидази при його відмиванні.

Для дослідження протизапальної активності було вибрано серветки, виготовлені за зразком № 3, оскільки в перерахунку на масу і кількість внесеного пелоїду він показав найкращу динаміку виходу аніонів і катіонів порівняно з максимально можливим виходом.

При вивченні протизапального впливу критерієм оцінки процесу запалення була динаміка зміни об'єму (рис. 2) ураженої кінцівки щурів.

З літературних джерел відомо, що апікації нативного пелоїду сприятливо впливають на

динаміку процесу запалення [2]. Метою ж даного дослідження було встановити рівень протизапальної активності розроблених серветок на основі пелоїду.

Протизапальну активність серветок, виготовлених із відмитого від солей пелоїду, визначали з метою встановлення внеску мінеральних солей в зумовлення протизапального ефекту.

З огляду на отримані результати, слід зазначити, що показники об'єму ураженої кінцівки щурів усіх дослідних груп сягнули свого піку через 24 год після введення флогеного агента, після чого поступово почали зменшуватися.

Найкраща динаміка повернення об'єму кінцівки до інтактних показників була характерна для групи тварин, яких лікували розробленими серветками на основі нативного пелоїду (рис. 2).

Дана перевага протягом перших 6 діб експерименту складала 50–60 % від контролю, 15–20 % – від нативного пелоїду та 30–35 % –

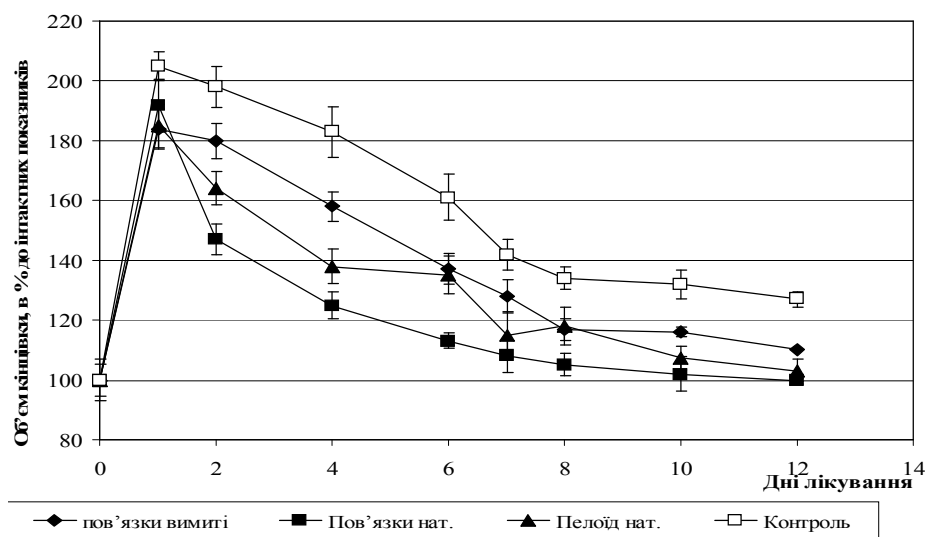


Рис. 2. Вплив експериментальної пелоїдотерапії на об'єм набряку ураженої кінцівки щурів.

від серветок на основі пелоїду, відмитого від солей. На 7–8 день експерименту об'єм кінцівок тварин, яких лікували розробленими серветками, досягнув інтактних показників, тоді як інші дослідні групи досягли подібного результату приблизно на 10–12 дні, а контроль станом на 12 день усе ще перевищував інтактні показники на 25 %.

Таким чином, встановлено, що розроблені нами серветки володіють протизапальною активністю на рівні нативного пелоїду або ж навіть перевищують його. Крім того, доведено, що вагомий внесок у рівень протизапальної активності робить мінеральний склад нативного пелоїду.

ВИСНОВКИ. 1. Серед 8 запропонованих зразків лікувальних серветок на основі пелоїду Куяльницького лиману за допомогою аналітичних методів дослідження було обрано оптимальний, для якого вивчили ферментативну та протизапальну активність.

2. Встановлено, що розроблена нами лікарська форма не поступається нативному пелоїду як за ферментативною, так і за протизапальною активністю. А серед її переваг – зручність використання, а в подальшому і доступність придбання в аптеках свого регіону.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Будко Я. А. Фармакокоррекция раневого процесса / Я. А. Будко // Провизор. – 2007. – № 15. – С. 26–32.
2. Лещинский А. Ф. Пелоидо- и фармакотерапия при воспалительных заболеваниях / А. Ф. Лещинский, З. И. Зуза. – К. : Здоровье, 1985. – 184 с.
3. Нечипуренко О. Н. Грязи – природные биогенные стимуляторы, механизмы целебного действия / О. Н. Нечипуренко // Провизор. – 1998. – № 6. – С. 54–57.
4. Низкодубова С. В. Экспериментальное обоснование и клиническое применение экстрактов лечебной грязи / С. В. Низкодубова // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. – 1986. – № 5. – С. 15–18.
5. Самутин Н. М. Актуальные проблемы пелоидотерапии / Н. М. Самутин, Н. Г. Кривобоков // Вопр. курортол. – 1997. – № 3. – С. 33–35.

6. Сравнительная характеристика физико-химических свойств и противовоспалительного действия восстановленной и нативной лечебной грязи / И. А. Кравченко, В. Б. Ларионов, Н. В. Овчаренко [и др.] // Актуал. пробл. транспорт. медицины. – 2011. – № 1 (23). – С. 87–93.
7. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв / Ф. Х. Хазиев. – М. : Наука, 1976. – 173 с.
8. Царфис П. Г. Лечебные грязи и другие природные теплоносители / П. Г. Царфис, В. Б. Киселев. – М. : Наука, 1990. – 127 с.
9. Цитович И. К. Курс аналитической химии / И. К. Цитович. – М. : Высшая школа, 1994. – 495 с.
10. Morris C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / C. J. Morris Morris // Methods Mol. Biol. – 2003. – **225**. – P. 115–121.

А. А. Коберник¹, И. А. Кравченко^{1,2}
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА¹
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ПЕЛОИДА КУЯЛЬНИЦКОГО ЛИМАНА И ЕЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Резюме

На основании проведенных биофармацевтических исследований установлено, что пелоид при регенерации после высушивания сохраняет свои противовоспалительные свойства. Поэтому нами была разработана самовосстанавливающаяся лекарственная форма длительного хранения. На модели каррагинанового отека установлено, что данная лекарственная форма по противовоспалительной активности не уступает аппликациям из нативного пелоида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **противовоспалительная активность, пелоид, каррагинановый отек.**

A. O. Kobernik¹, I. A. Kravchenko^{1,2}
I. I. MECHNYKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY
O. V. BOHATSKYI PHYSICAL AND CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

MEDICINAL FORM OF KUYALINIK ESTUARY PELOID AND ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Summary

It was shown that peloid retains its anti-inflammatory properties after drying. We developed a medicinal form as dressing with the native peloids. It was found that the medicinal form and native peloid are equal by anti-inflammatory effects on the model of carrageenan edema.

KEY WORDS: **anti-inflammatory activity, peloid, model of carrageenan edema.**

Отримано 10.10.11

Адреса для листування: А. О. Кобернік, Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Довженко, 9а, Одеса, Україна.

**КОРИГУВАЛЬНИЙ ВПЛИВ МІЛДРОНАТУ НА ПОКАЗНИКИ
ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ
НА ТЛІ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ДОКСОРУБІЦИНУ**

Досліджено вплив мілдронату на показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в тканинах органів щурів на тлі оксидативного стресу, викликаного протипухлинним антибіотиком доксорубіцином (5 мг/кг, 4 рази на місяць). Мілдронат (50 мг/кг, упродовж 4-х тижнів) запобігає і частково відновлює порушену доксорубіцином оксидантно-антиоксидантну рівновагу, зменшуючи вміст у тканинах органів продуктів ліпопероксидації, окисномодифікованих білків, та активує ферменти антирадикального захисту (каталаза, церулоплазмін).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мілдронат, доксорубіцин, оксидантно-антиоксидантний гомеостаз.

ВСТУП. Мілдронат-3-(2,-2,-2-триметилгідразинію) пропіонат, відомий цитопротектор, з успіхом використовують у клініці внутрішніх хвороб при патологічних станах, які супроводжуються гіпоксією, зокрема в комплексній терапії стенокардії, хронічної серцевої недостатності, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда тощо [7, 9, 12]. Мілдронат блокує синтез карнітину шляхом інгібування активності ферменту γ -бутиробетаїнгідроксилази, значна кількість якого міститься в печінці та нирках [2, 7]. При зменшенні в клітинах карнітину й ацилкарнітину пригнічується β -окиснення вищих жирних кислот, що сприяє ефективному окисненню глюкози [2, 3]. Мілдронат пригнічує також активність карнітинпальмітоїл-трансферази-1 і функціонування транспортних білків карнітину та збільшує концентрацію й активність гексокінази та Ca^{2+} -АТФ-ази [2, 3, 7]. Зменшення концентрації карнітину в організмі відбувається завдяки не лише пригніченню синтезу, а й прискореному виведенню з організму, оскільки зменшується його реабсорбція в ниркових канальцях [2]. Активація аеробного окиснення глюкози забезпечує економію кисню, оптимізує енергетичний метаболізм у клітинах за умов ішемії та реперфузії. Позитивний вплив мілдронату на енергетичний обмін зумовлений також зростанням виходу АТФ із мітохондрій і збільшенням утворення креатинфосфату в цитозолі [2]. Така корекція метаболічних процесів при застосуванні мілдронату доцільна при різних гіпоксичних

станах, при яких порушуються функції життєво важливих органів (серце, нирки, печінка та ін.).

Відомо, що серйозною побічною реакцією при застосуванні протипухлинного антибіотика антраценового походження доксорубіцину є кардіотоксичність [1], в основі патогенезу якої лежать порушення оксидантно-антиоксидантного гомеостазу [6, 17]. Доксорубіцин має також нефротоксичну дію, створюючи, таким чином, ознаки інтоксикації організму [14]. В останні роки ведуться пошуки способів зменшення токсичної дії препарату на організм завдяки як застосуванню лікарських засобів “прикриття” (препарати з антиоксидантною, мембранопротекторною, антитоксичною діями), так і створенню ліпосомальних форм доксорубіцину, більш ефективних і менш токсичних для організму онкохворих [5, 13].

Метою даної роботи було дослідити вплив мілдронату на показники оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі тварин за дії доксорубіцину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 150–170 г, поділених на 3 групи: в 1-й – модель доксорубіцинової інтоксикації (раз на тиждень, 4 рази), вводили доксорубіцин (“Київ-медпрепарат”, 5 мг/кг, внутрішньом’язово); у 2-й – за аналогічного режиму введення доксорубіцину тваринам щоденно вводили мілдронат (“Grindex”, 50 мг/кг, внутрішньочеревно). Контролем слугували щури (3-тя група), яким замість лікарських засобів вводили

© Ж. М. Гаїна, Р. Б. Косуба, І. М. Яремій, 2012.

розчинник (воду для ін'єкцій). На 28 добу від початку експерименту тварин умертвляли шляхом декапітації під легкою ефірною анестезією. Органи (серце, нирки, печінка) виділяли, промивали у 0,9 % розчині NaCl, ретельно висушували фільтрувальним папером, подрібнювали ножицями на льодовій бані й готували 5 % гомогенати на трис-HCL-буфері (рН 7,4). У супернатантах визначали вміст основних показників оксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом ТБК-активних початкових (дієнові кон'югати, ДК) [16], кінцевих (малоновий діальдегід, МДА) [15] продуктів та окисномодифікованих білків (ОМБ) [11]. Стан основних компонентів антиоксидантної системи захисту (АОЗ) оцінювали за активністю каталази [10] та вмістом церулоплазміну [8].

При роботі з тваринами дотримувалися вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України [4]. Отриманий цифровий матеріал обробляли методами статистичного аналізу. Вірогідність різниці середніх арифметичних (Р) визначали параметричним методом з визначенням t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані нами результати свідчать про те, що багаторазове введення доксорубіцину порушує оксидантно-антиоксидантну рівновагу в гомогенатах серця щурів (табл. 1). Вміст ДК збільшився на 65,8 %, МДА – на 75 %, ОМБ – на 44,7 % порівняно з показниками контрольних тварин, що узгоджується з результатами досліджень інших авторів і призводить до пошкодження мембранного апарату кардіоміцитів та розвитку кардіоміопатії [1, 6, 13, 18]. На оксидативний стрес зреагувала АОЗ організму – активність каталази в серцевому м'язі зросла майже вдвічі (на 86,3 %), вміст церулоплазміну не змінився.

Під впливом мілдронату вміст ДК у серцевому м'язі інтоксикованих доксорубіцином щурів зменшився на 30,8 %, МДА – на 46,8 %, ОМБ – на 21,8 %. Активність каталази, знизившись на 42,2 %, вірогідно не відрізнялася від показника контрольних тварин, вміст церулоплазміну при цьому мав тенденцію до збільшення. Отже, мілдронат зменшив прояви оксидативного стресу за умов доксорубіцинової кардіоміопатії.

За дії доксорубіцину в гомогенатах нирок інтенсивність процесів ПОЛ, ОМБ та активність ферментів АОЗ також зазнали змін (табл. 2).

Таблиця 1 – Вплив мілдронату на показники ПОЛ, ОМБ та ферменти АОЗ у серці щурів на тлі доксорубіцинової кардіоміопатії (M±m)

Показник	Контроль (n=6)	Доксорубіцин (n=6)	Доксорубіцин+мілдронат (n=6)
ДК, нмоль/мг білка	0,79±0,009	1,31±0,017* (+65,8 %)	0,92±0,026*# (-30,8 %)
МДА, нмоль/мг білка	0,44±0,006	0,77±0,028* (+75 %)	0,41±0,014*# (-46,8 %)
ОМБ, ммоль/г тканини	0,114±0,005	0,165±0,0060* (+44,7 %)	0,129±0,0009*# (-21,8 %)
Каталаза, мкмоль/хв/мг білка	5,26±0,289	9,80±0,451* (+86,3 %)	5,67±0,244*# (-42,2 %)
Церулоплазмін, мг/л	126,87±4,025	130,29±0,981	137,55±5,355

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – вірогідність відносно контрольних тварин; # – вірогідність відносно дії доксорубіцину; % – динаміка зміни показника.

Таблиця 2 – Вплив мілдронату на показники ПОЛ, ОМБ та ферменти АОЗ у нирках щурів на тлі доксорубіцинової інтоксикації (M±m)

Показник	Нирки (мозкова речовина)		
	контроль (n=6)	доксорубіцин (n=6)	доксорубіцин+мілдронат (n=6)
ДК, нмоль/мг білка	0,69±0,022	1,13±0,055* (+63,7 %)	0,81±0,017*# (-28,3 %)
МДА, нмоль/мг білка	0,46±0,011	0,69±0,036* (+50 %)	0,53±0,009*# (-23,2 %)
ОМБ, ммоль/г білка	0,06±0,011	0,07±0,002 (+16,6 %)	0,05±0,003* (-28,6 %)
Каталаза, мкмоль/хв/мг білка	9,55±0,237	12,77±0,316* (+33,7 %)	8,44±0,392*# (-34 %)
Церулоплазмін, мг/л	127,57±3,535	124,83±1,666	122,32±2,73

Вміст ДК та МДА у мозковій речовині нирок зріс в 1,6–1,5 раза ($p < 0,01$), відповідно, кількість ОМБ збільшилася на 16,6 %. Активність каталази при цьому підвищилась в 1,3 раза ($p < 0,001$), що свідчить про участь даного ферменту в запобіганні оксидативному стресу, індукованому доксорубіцином (каталаза знешкоджує ендogenousний перекис водню як одну з найагресивніших активних форм кисню).

У нирках щурів, які на тлі інтоксикації доксорубіцином отримували мілдронат, інтенсивність процесів ліпопероксидації та вільнорадикального окиснення білків зменшилася вдвічі, що супроводжувалося адекватним зниженням активності каталази. Як і в серці, вміст церулоплазміну в нирках не змінився (табл. 2).

У гомогенатах печінки інтоксикованих тварин під впливом мілдронату показники протиантиоксидантних процесів нормалізувалися і вірогідно не відрізнялися від контролю.

Аналіз отриманих нами результатів, хімічна будова мілдронату та дані наукової літератури [2, 3, 7] дозволяють припустити можливість

існування ще одного напрямку в дії мілдронату – антиоксидантного, в основі якого, ймовірно, лежить підвищення активності каталази та інших ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза), для підтвердження участі яких необхідні відповідні додаткові дослідження.

ВИСНОВКИ. 1. Доксорубіцин (5 мг/кг, 4 рази на місяць) викликає оксидативний стрес, який супроводжується підвищенням вмісту в тканинах щурів продуктів пероксидного окиснення ліпідів (дієнові кон'югати, малоновий діальдегід), окисномодифікованих білків та порушенням механізмів антирадикального захисту.

2. Мілдронат (50 мг/кг, упродовж 4 тижнів) запобігає і частково відновлює порушену доксорубіцином оксидантно-антиоксидантну рівновагу, зменшуючи вміст продуктів ліпопероксидації, окисномодифікованих білків, та активує ферменти антирадикального захисту (каталаза, церулоплазмін).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антрациклиновая кардиомиопатия (данные за 2003–2006 гг.) / В. Т. Ватулин, Н. В. Калинин, Т. С. Гончаренко [и др.] // Укр. мед. альманах. – 2006. – 9, № 5. – С. 155–161.
2. Биохимические механизмы действия милдроната в условиях ишемического стресса / М. Дамброва, Д. Дайя, Э. Лиепиньш [и др.] // Врач. дело. – 2004. – № 2. – С. 69–73.
3. Гордеев И. Г. Антиоксидантный эффект кардиопротектора милдроната у пациентов, подвергшихся коронарной реваскуляризации / И. Г. Гордеев, Е. Е. Лучинкина, В. А. Люсов // Рос. кардиол. журн. – 2009. – № 1. – С. 31–37.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
5. Эффективность заостування тіотриазоліну за умов доксорубіцинової кардіоміопатії / І. С. Чекман, Т. С. Трофімова, І. А. Мазур, Н. О. Горчакова // Запорож. мед. журн. – 2010. – 12, № 5. – С. 207–210.
6. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления / М. Г. Матяш, Т. Л. Кравчук, В. В. Высоцкая [и др.] // Сибир. онкол. журн. – 2008. – № 6 (30). – С. 67–74.
7. Калвиньш И. Я. Милдронат – механизм действия и перспективы его применения / И. Я. Калвиньш. – Рига : Изд-во ПАО "Гриндекс", 2001. – 122 с.
8. Колб В. Г. Справочник по клинической биохимии / В. Г. Колб. – Минск : Беларусь, 1982. – 290 с.
9. Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции / И. С. Чекман, Н. А. Горчакова, С. Б. Французова, Е. А. Нагорная. – К., 2009. – 155 с.
10. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
11. Мещишен І. Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
12. Михин В. П. Перспективы применения милдроната у больных сердечно-сосудистой патологией / В. П. Михин, Ф. Е. Хлебодаров // Рос. кардиол. журн. – 2010. – № 4 (84) – С. 158–168.
13. Мохорт М. А. Кардіотоксичні ефекти доксорубіцину і доцільність їх фармакологічної корекції антагоністами кальцію дигідропіридинового ряду та активаторами АТФ-чутливих калієвих каналів гуанідового ряду / М. А. Мохорт, Н. М. Серединська, Л. М. Киричок // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 4 (17). – С. 35–44.
14. Саенко Ю. В. К механизму токсического действия доксорубицина на почки / Ю. В. Саенко, А. М. Шутов, Р. Х. Мусина // Нефрология. – 2006. – 10, № 4. – С. 72–76.
15. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.

16. Стальная И. Д. Методы определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 42–44.

17. Степанюк Г. І. Вплив вінборону на розвиток оксидативного стресу при експериментальній доксорубициновій кардіоміопатії за динамікою біохімічних показників / Г. І. Степанюк, Е. Г. Іванова, Н. І. Іванова //

Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 4 (17). – С. 56–59.

18. The influence of the time interval between monoHER and doxorubicin administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice / A. M. Bruynzeel, P. P. Mul, J. Berkhof [et al.] // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2006. – **58**, № 5. – P. 699–702.

Ж. М. Гаина, Р. Б. Косуба, И. Н. Яремий
БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ

КОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС НА ФОНЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

Резюме

Исследовано влияние милдроната на показатели оксидантно-антиоксидантного гомеостаза в тканях органов крыс на фоне оксидативного стресса, вызванного противоопухолевым антибиотиком доксорубицином (5 мг/кг, 4 раза в месяц). Милдронат (50 мг/кг, в течение 4-х недель) предотвращает и частично восстанавливает нарушенное доксорубицином оксидантно-антиоксидантное равновесие, уменьшая содержание в тканях органов продуктов липопероксидации, окислительномодифицированных белков, и активирует ферменты антирадикальной защиты (каталаза, церулоплазмин).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: милдронат, доксорубин, оксидантно-антиоксидантный гомеостаз.

Zh. M. Hayina, R. B. Kosuba, I. M. Yaremii
BUKOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, CHERNIVTSI

CORRECTIVE EFFECT OF MILDRONATE ON INDICES OF OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN RATS ORGAISMS AGAINST THE BACKGROUND OF THE TOXIC DOXORUBICIN ACTION

Summary

The effect of mildronate on indices of oxidant-antioxidant homeostasis in tissues of rats' organisms against the background of oxidant stress induced by antitumoral antibiotic doxorubicin (5 mg/kg 4 times a month) has been studied. Mildronate (50 mg/kg during 4 weeks) prevents and partially restores the impaired by doxorubicin oxidant-antioxidant balance reducing the content of lipid peroxidation products, oxidatively modified proteins and activates enzymes of antiradical defense (catalase, ceruloplasmin).

KEY WORDS: mildronate, doxorubicin, oxidative-antioxidant homeostasis.

Отримано 12.12.11

Адреса для листування: Р. Б. Косуба, вул. Д. Загули, 6/4, Чернівці, 58001, Україна.

АНАЛІЗ РЕЧОВИН ЛІПОФІЛЬНОЇ ПРИРОДИ В ОРГАНАХ ЛЮБИСТКУ ЛІКАРСЬКОГО (*LEVISTICUM OFFICINALE* KOCH.)

Виділено ліпофільні комплекси з листків, плодів та кореневищ і коренів любистку лікарського. Проведено їх органолептичний, якісний та кількісний аналіз.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпофільна фракція, хлорофіли, каротиноїди, любисток лікарський.

ВСТУП. Ліпофільні екстракти є комплексом біологічно активних сполук – хлорофілів, фітостеролів, жиророзчинних вітамінів, каротиноїдів, жирних кислот, які проявляють різні види біологічної активності [2–4, 6–10]. Хлорофіли мають антимікробну активність та стимулюють кровотворення [3, 8, 9]. Токоферолі та каротиноїди використовують як антиоксидантні речовини, каротиноїди мають мембраностабілізуючі властивості та А-провітамінну активність [3, 9]. Жирні кислоти є обов'язковим компонентом біологічних мембран, вони відіграють важливу роль в енергетиці живої клітини, метаболізмі стероїдних сполук, беруть участь у біосинтезі жирів [6, 10].

Більшість із цих речовин є біологічними ефекторами, медіаторами і регуляторами, які беруть участь у фізіологічних процесах, таких, як розвиток імунітету, регуляція судинного та м'язового тону, передача нейрональної інформації, гомеостаз та запальні процеси, які відбуваються в організмі, а також багатьох біохімічних реакцій, що перебігають у клітинах людського організму [2, 7].

Беручи до уваги високий природний та фармакологічний потенціал ліпофільних сполук [2–4, 6–10] та продовжуючи пошук нових біологічно активних речовин ліпофільної природи, метою роботи було отримати ліпофільні комплекси з листків, плодів та кореневищ і коренів любистку лікарського, дослідити їх хімічний склад та визначити кількісний вміст.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були листки, плоди та кореневища і корені любистку лікарського, заготовлені з дослідних ділянок ботанічного саду “Червона калина” (Тернопільська обл.) у 2009–2010 рр. Виділення ліпофільних комплексів проводили

© Н. В. Челін, С. М. Марчишин, 2012.

шляхом вичерпного екстрагування рослинної сировини хлороформом в апараті Сокслета. З метою стандартизації одержаних ліпофільних фракцій визначали їх органолептичні показники та встановлювали кількісний вміст [7].

Визначення каротиноїдів та хлорофілів проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках “Sorbfil” у системах розчинників: гексан-ацетон (6:2) – I напрямом, гексан-ацетон (6:4) – II напрямом [3, 8, 9].

Для визначення якісного складу ліпофільних фракцій було також застосовано тривимірну флуоресцентну спектроскопію. Визначали якісний склад та кількісний вміст рослинних пігментів, використовуючи 3DF-спектроскопію, яку застосовують для аналізу сумішей, що містять флуоресцюючі компоненти. 3DF-спектри у вигляді “поверхні”, яка характеризується функцією $I=f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}})$, реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах за допомогою флуорометра Hitachi F4010. Вимірювали спектр у діапазонах збудження (λ_{exc}) і випромінювання (λ_{em}) від 220 до 750 нм з кроком 5 нм. Подальшу обробку записів з побудовою тривимірних графіків проводили за допомогою програмного пакета “Spectra Data Lab”, розробленого в НДІ хімії при Харківському національному університеті ім. В. Н. Каразіна [1, 5].

Значну кількість природних ліпофільних комплексів складають жирні кислоти. Тому раніше методом газорідинної хроматографії (ГРХ) нами було проведено визначення компонентного складу та вмісту жирних кислот на хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором “Shimadzu GC-14B” [10].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для одержання ліпофільних фракцій 3,0 г подрібненої сировини (точна наважка) вичерпно екстрагували хлороформом в апараті Сокслета (до

знебарвлення екстракту в зливному патрубку та негативної реакції на жир). Колбу-приймач зважували до і після екстракції. Отримані хлороформні екстракти випарювали до видалення екстрагенту, колбу висушували в сушильній шафі до сталої маси.

Ліпофільна фракція з листків любистку лікарського – густа масляниста однорідна маса брудно-зеленого кольору з приємним специфічним запахом; добре розчиняється у хлороформі, не розчиняється у воді та спирті. Вихід ліпофільних речовин з листків любистку лікарського в перерахунку на абсолютно суху сировину становив $(4,17 \pm 0,23) \%$.

Ліпофільна фракція з кореневищ і коренів любистку лікарського являє собою густу маслянисту однорідну масу жовто-коричневого кольору з приємним своєрідним запахом; добре розчиняється у хлороформі, не розчиняється у воді та спирті. Вміст ліпофільної фракції у підземних органах становить $(3,79 \pm 0,15) \%$ у перерахунку на абсолютно суху сировину.

Вихід ліпофільних речовин з плодів любистку лікарського є найбільшим, порівняно з іншими органами рослини, і становить $(7,99 \pm 0,18) \%$ у перерахунку на абсолютно суху сировину. Ліпофільна фракція з плодів любистку лікарського – густа масляниста однорідна маса темно-коричневого кольору з приємним специфічним запахом; добре розчиняється у хлороформі, не розчиняється у воді та спирті.

Одержані ліпофільні комплекси було використано для подальших досліджень. У результаті проведеного хроматографічного аналізу встановлено наявність каротиноїдів, хлорофілів, токоферолів та кумаринів. Схеми ТШХ наведено на рисунках 1–3.

У результаті хроматографічних досліджень ліпофільних фракцій локалізацію хлорофілів на хроматограмах визначали за характерним

темно-зеленим забарвленням у видимому світлі, а в УФ-світлі – за яскраво-червоною флуоресценцією [3–5, 8, 9]. Наявність каротиноїдів на хроматограмах визначали за жовтим забарвленням плям у видимому світлі та коричневою флуоресценцією плям в УФ-світлі. Для підтвердження наявності каротиноїдів хроматограми обробляли 2 % розчином п-диметиламінобензальдегіду в суміші етанолу та кислоти хлористоводневої з наступним витриманням хроматограм у сушильній шафі при 90°C протягом 5 хв. Плями, які відповідали каротиноїдам, мали рожево-фіолетове забарвлення [3–5, 8, 9]. Токоферолі мали синьо-голубу флуоресценцію в УФ-світлі та характерне синьо-фіолетове забарвлення плям на хроматограмах при обробці парами йоду [3, 9]. На хроматограмах плями мали яскраво-блакитну флуоресценцію, після обробки діазо-реактивом набували червоно-коричневого забарвлення та були віднесені нами до кумаринів [8].

Як видно на схемах хроматограм ліпофільних екстрактів: у ліпофільній фракції з листків любистку лікарського (рис. 1) виявлено 14

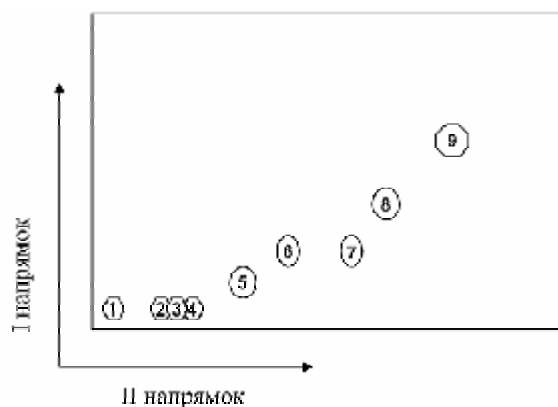


Рис. 2. Схема тонкошарової хроматограми ліпофільного екстракту з плодів любистку лікарського. Система розчинників: I напрямок – гексан-ацетон (6:2); II напрямок – гексан-ацетон (6:4).

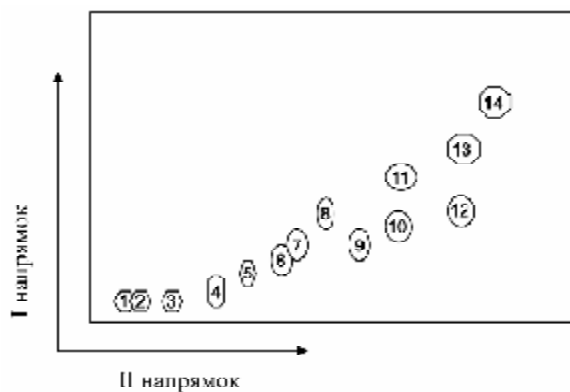


Рис. 1. Схема тонкошарової хроматограми ліпофільного екстракту з листків любистку лікарського. Система розчинників: I напрямок – гексан-ацетон (6:2); II напрямок – гексан-ацетон (6:4).

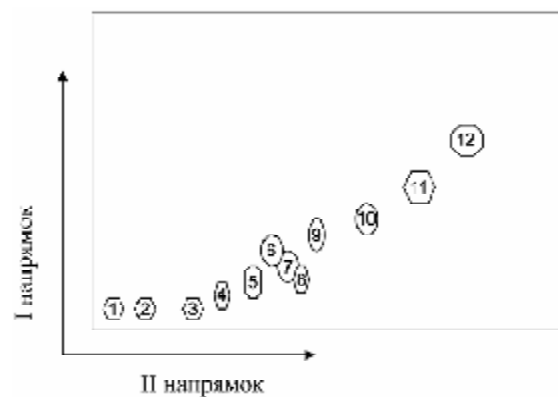


Рис. 3. Схема тонкошарової хроматограми ліпофільного екстракту з кореневищ і коренів любистку лікарського. Система розчинників: I напрямок – гексан-ацетон (6:2); II напрямок – гексан-ацетон (6:4).

речовин. Речовини 1–3, 9, 10, 12 віднесені нами до хлорофілів; 5, 7 – до каротиноїдів; 4, 6, 8, 11, 13 – до токоферолів і 14 – до кумаринів. Ліпофільний екстракт з плодів любистку лікарського (рис. 2) містить 9 речовин, з яких: 1, 2, 5, 7 – каротиноїди; 3, 4, 6, 8 – токоферолі; 9 речовина віднесена до кумаринів. У ліпофільній фракції з кореневищ і коренів любистку лікарського (рис. 3) встановлено 12 речовин, з них: 1, 2, 5, 7, 8, 10 – віднесено до каротиноїдів; 3, 4, 6, 9, 11, – до токоферолів; 12 – кумарин.

Аналіз одержаних і досліджених двовимірних хроматограм свідчить про наявність у ліпофільному екстракті з листків любистку лікарського речовин, здатних до флуоресценції. Для подальшого дослідження нами було отримано тривимірні спектри флуоресценції ліпофільного комплексу з листків любистку лікарського в хлороформі й метанолі та проведено їх аналіз (рис. 4, 5).

Результати досліджень показали, що ліпофільному комплексу з листків любистку лікарського у метанолі властиві піки в ділянках λ_{exc} – 280–370 нм, λ_{emi} – 390–540 нм, що свідчить про наявність простих фенолів, серія

пиків (λ_{exc} – 340–450, 500–580, 600–690 нм і λ_{emi} – 650–700 нм) – ділянка флуоресценції хлорофілів. Аналіз ліпофільного комплексу з листків любистку лікарського в хлороформі показав серію пиків (λ_{exc} – 310–460, 480–560, 560–580 нм і λ_{emi} – 650–720 нм), що характерно для ділянки флуоресценції хлорофілів, піки в ділянках λ_{exc} – 300–360 нм, λ_{emi} – 400–520 нм свідчать про наявність агліконів флавоноїдів.

Визначення кількісного вмісту суми каротиноїдів і хлорофілів у ліпофільній фракції з листків любистку лікарського в метанолі показало, що вміст хлорофілів становить 0,57 мг/г, каротиноїдів – 20,67 мг/г; у хлороформі вміст хлорофілів складає 2,27 мг/г, каротиноїдів – 7,70 мг/г.

Як було встановлено раніше [10], у ліпофільних фракціях з листків, плодів та кореневищ і коренів любистку лікарського методом газорідинної хроматографії встановлено наявність 13, 12 та 14 жирних кислот відповідно. Жирнокислотний склад любистку характеризується мінливістю кількісного вмісту та якісного складу в різних органах рослини, проте характерною ознакою є переважний вміст ненасичених жирних кислот.

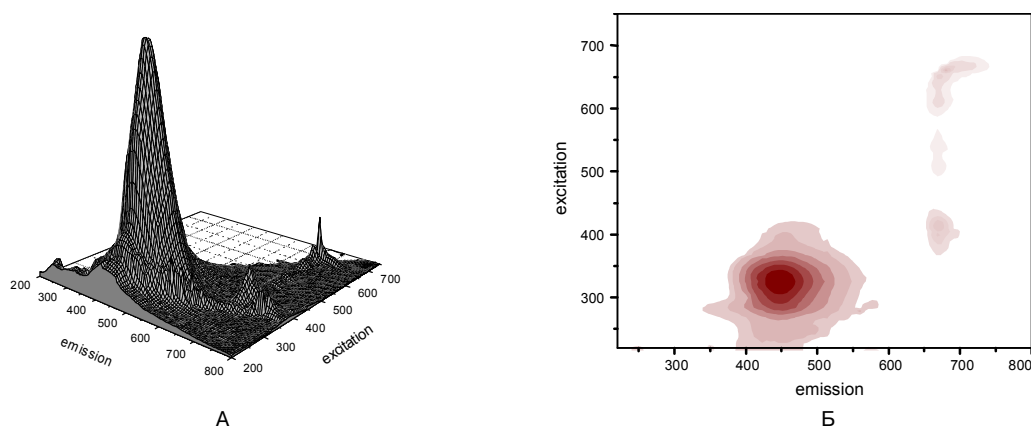


Рис. 4. Тривимірний спектр флуоресценції (А) та його логарифмічна проекція на площину (Б) ліпофільної фракції з листків любистку лікарського в метанолі.

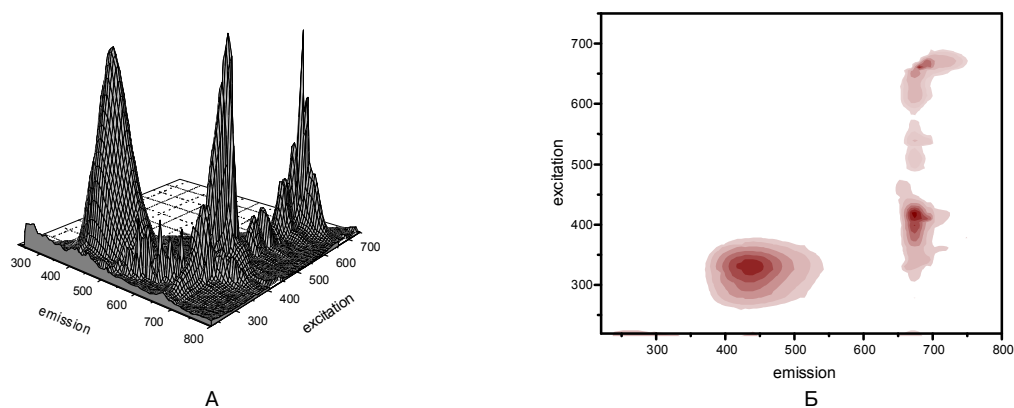


Рис. 5. Тривимірний спектр флуоресценції (А) та його логарифмічна проекція на площину (Б) ліпофільної фракції з листків любистку лікарського в хлороформі.

ВИСНОВКИ. 1. Виділено речовини ліпофільної природи з листків, плодів та кореневищ і коренів любистку лікарського та проведено їх комплексний аналіз. Здійснено органолептичний аналіз та визначено кількісний вміст отриманих ліпофільних фракцій.

2. Методом двовимірної тонкошарової хроматографії проведено якісний аналіз ліпофільних екстрактів з листків, плодів та коре-

невищ і коренів любистку лікарського. Виявлено наявність у досліджуваних органах каротиноїдів, хлорофілів, токоферолів та кумаринів.

3. Отримано тривимірні спектри флуоресціюючих компонентів ліпофільної фракції з листків любистку лікарського у двох розчинниках; визначено кількісний вміст суми хлорофілів та каротиноїдів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення видового походження рослинних олій / В. А. Параніч, А. О. Дорошенко, О. Д. Рошаль [та ін.] // Фармац. журн. – 2000. – № 5. – С. 86–90.

2. Гонський Я. І. Біохімія людини : підруч. / Я. І. Гонський. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.

3. Затильнікова О. О. Хімічне вивчення ліпофільної фракції з кореневищ півників болотяних / О. О. Затильнікова, С. В. Ковальов, Т. П. Осолодченко // Вісник фармації. – 2008. – № 3. – С. 9–12.

4. Ковальова А. М. Хімічне дослідження ліпофільних фракцій плодів видів роду *Crataegus* L. / А. М. Ковальова, Н. В. Сидора // Вісник фармації. – 2006. – № 4. – С. 8–12.

5. Ковальов С. В. Дослідження ліпофільних фракцій трави ледвенця українського та польового / С. В. Ковальов // Вісник фармації. – 2010. – № 1. – С. 27–31.

6. Мамедова С. О. Дослідження складу токоферолів та жирних кислот *Rubus idaeus* / С. О. Маме-

дова, І. О. Журавель, О. І. Павлій // Вісник фармації. – 2009. – № 2. – С. 31–34.

7. Солодовниченко Н. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати : посіб. з фармакогнозії з основами біохім. лікар. рослин / Н. М. Солодовниченко, М. С. Журавльов, В. М. Ковальов. – Харків : Вид-во НФАУ “Золоті сторінки”, 2001. – 480 с.

8. Тернинко І. І. Вивчення ліпофільних комплексів трави та зерна вівса посівного (*Avena sativa* L.) / І. І. Тернинко, О. В. Бурцева // Фармац. журн. – 2010. – № 1. – С. 89–95.

9. Хімічне вивчення ліпофільної фракції з шишок хмелю звичайного / С. І. Берестова, В. М. Ковальов, С. В. Ковальов [та ін.] // Вісник фармації. – 2006. – № 1. – С. 22–25.

10. Челін Н. В. Жирнокислотний склад любистку лікарського (*Levisticum officinale* Koch.) / Н. В. Челін, С. М. Марчишин // Укр. журн. клін. та лаб. мед. – 2011. – № 1. – С. 33–36.

Н. В. Челін, С. М. Марчишин

ТЕРНОПОЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

АНАЛИЗ ВЕЩЕСТВ ЛИПОФИЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ОРГАНАХ ЛЮБИСТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*LEVISTICUM OFFICINALE* KOCH.)

Резюме

Выделены липофильные комплексы из листьев, плодов, корневых и корневищ любистка лекарственного. Проведено их органолептический, качественный и количественный анализ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липофильная фракция, хлорофиллы, каротиноиды, любисток лекарственный.

N. V. Chelin, S. M. Marchyshyn

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

ANALYSIS OF SUBSTANCES OF LIPOPHILIC NATURE IN ORGANS OF LOVAGE (*LEVISTICUM OFFICINALE* KOCH.)

Summary

Lipophilic complexes were isolated from the leaves, fruits, rhizomes and roots of lovage (*Levisticum officinale*). There was made their organoleptic, qualitative and quantitative analysis.

KEY WORDS: the lipophilic fraction, chlorophylls, carotenoids, lovage (*Levisticum officinale*).

Отримано 01.02.12

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

Л. І. Петрух, О. І. Михалик, М. М. Коваленко, О. В. Павленко, О. П. Панич¹
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ І КОРМОВИХ ДОБАВОК¹, ЛЬВІВ

ДІЯ ДЕЯКИХ АНТИБІОТИКІВ НА ОСНОВНІ КОМПОНЕНТИ МОЛОКА

Досліджено in vitro взаємодію деяких антибіотиків з основними компонентами молока коров'ячого. Встановлено залежність вмісту жиру, білків, сухого молочного залишку, густини та доданої води від концентрації антибіотиків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бензилпеніциліну натрійна сіль, амікацину сульфат, гентаміцину сульфат, еритроміцин, основні компоненти молока коров'ячого.

ВСТУП. Антибактерійні препарати характеризуються особливою хімічною структурою, фізико-хімічними властивостями, індивідуальним спектром дії на мікроорганізми. Першочергове значення для ветеринарної медичної практики мають антибіотики β-лактамного ряду, аміноглікозиди, тетрацикліни і макроліди [1]. Антибіотики є інгібіторами синтезу білків. Вони діють на різні штами грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, деякі актиноміцети і гриби. Механізм дії препаратів β-лактамного ряду полягає у порушенні біосинтезу стінок бактерійної клітини. Тетрацикліни діють на рибосоми бактерій, блокуючи синтез білків. Тетрациклін гальмує стадію елонгації, блокуючи зв'язування аміноацил-тРНК в А-центрі рибосом. Аміноглікозиди блокують біосинтез білків у клітинах бактерій. Вони діють на 30S-субодиницю рибосоми, порушують її структуру і зумовлюють помилки при розпізнаванні кодону антикодоном. Еритроміцин пригнічує ріст і розмноження бактерій через блокування синтезу білків. Він зв'язується з 50S-субчастинкою рибосом і блокує стадію транслокації [4].

Бензилпеніциліну натрію сіль, гентаміцину сульфат, амікацину сульфат, еритроміцин часто застосовують у ветеринарній медицині при лікуванні різних інфекційних захворювань [1, 3, 7, 8].

Метою даної роботи було дослідити *in vitro* вплив деяких антибіотиків на основні компоненти молока коров'ячого сирого.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Використано фармакотехнологічні методи досліджень мо-

© Л. І. Петрух, О. І. Михалик, М. М. Коваленко, О. В. Павленко, О. П. Панич, 2012.

лока коров'ячого сирого за допомогою аналізатора якості молока "Lactan 1-4 В" (свідоцтво про атестацію МВИ № 2420/230-00 від 21.08.00). Методика визначення масових часток жиру, білків, сухого знежиреного молочного залишку (СЗМЗ), густини і доданої води відповідає державному стандарту [7]. Межа допущеної основної абсолютної похибки, згідно з технічними характеристиками, становить: для густини – 0,5 кг/м³; жиру – 0,1 %; білків – 0,15 %; СЗМЗ – 0,15 %; доданої води – 1 %; температури – 1 %. Зразки молока отримано з приватних господарств.

Субстанція бензилпеніциліну натрію солі гігроскопічна; дуже легко розчиняється у воді й молоці; використано в дозах 120, 240 і 360 мг. Гентаміцину сульфат легко розчиняється у воді й молоці; застосовано в дозах 60, 120, 240 і 360 мг. Амікацину сульфат гігроскопічний; легко розчиняється у воді й молоці; використано в дозах 125, 250, 375 і 500 мг. Еритроміцин гігроскопічний; малорозчинний у воді й молоці; застосовано в дозах 120, 240 і 360 мг. Для розчинення еритроміцину використано димексид виробництва АТ "Галичфарм". ДМСО є універсальним розчинником для нерозчинних у воді хіміотерапевтичних засобів, прискорює перенесення розчинених у ньому субстанцій через біологічні мембрани, підсилює дію ліків, впливає на тканинну енергетику [5, 6]. Полікомпонентні модельні біосистеми (25,0 мл молока+دوزи антибіотиків) готували безпосередньо перед вимірюванням основних показників молока.

Досліди проведено у літній період з дотриманням вимог Інструкції до експлуатації "Lactan 1-4 В" та Державної Фармакопеї України (розділ 2.2).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено зміну стандартизованих показників якості молока коров'ячого (жиру, білків, СЗМЗ, густини і доданої води) під дією зростаючих об'ємів антибіотиків, представників β -лактамового ряду, аміноглікозидів і макролідів.

Вплив антибіотиків на вміст жиру в молоці. Жир – найважливіша складова частина молока, представлений здебільшого тригліцеридами (98,0–99,0 %). До його складу входять також лецитин, кефалін, сфінгомелін, холестерин, ергостерин, цереброзиди, вільні жирні кислоти, жиророзчинні вітаміни, каротиноїди та інші сполуки [2].

Встановлено, що бензилпеніциліну натрійна сіль, гентаміцину сульфат, амікацину сульфат та еритроміцин по-різному впливали на вміст молочного жиру. В досліджуваних зразках молока вміст жиру становив у середньому 2,51; 2,56; 2,43; 2,48 % для різних полікомпонентних модельних біосистем (I.2–I.4; II.2–II.5; III.2–III.5; IV.2–IV.4).

За нормальних умов *in vitro* бензилпеніциліну натрійна сіль у зростаючих дозах підвищувала вміст жиру в молоці, а саме: 120 мг – на 0,08 %; 240 мг – на 0,14 %; 360 мг – на 0,32 % (I.2–I.4; табл. 1).

Використані в експерименті дози аміноглікозидів знижували вміст жиру в молоці. Гентаміцину сульфат у дозах 60, 120, 240, 360 мг зменшував, відповідно, на -0,05; -0,23; -0,25; -0,41 %; амікацину сульфат у дозах 125, 250, 375, 500 мг – на -0,36; -0,44; -0,67; -0,36 % (II.2–II.5; III.2–III.5; табл. 1).

У ветеринарній медичній практиці існує застереження щодо молока від корів, яким вводили аміноглікозиди: його не дозволено використовувати для харчування в період лікування і протягом 72 год після припинення введення. Таким молоком годують тварин [8].

Дані експериментальних досліджень підтверджують, що еритроміцин у дозі 120 мг внаслідок малої розчинності не впливав на вміст жиру в молоці. Однак при розчиненні 240 мг еритроміцину в 2,0 мл ДМСО, а 360 мг препарату – в 5,0 мл ДМСО зафіксовано збільшення вмісту жиру, відповідно, на 1,09 і 7,43 % (IV.2–IV.4; табл. 1). Вагому роль у даному явищі синергізму відігравав димексид. На підставі експериментальних досліджень впливу різних об'ємів димексиду на молоко встановлено, що 0,1 мл ДМСО давав приріст відносно молока на 0,42 %; 1,0 мл ДМСО – на 1,53 %.

Вплив антибіотиків на білки молока.

Білки молока – найцінніші поживні речовини, які добре засвоюються і задовольняють усі потреби організму людини і тварин. Вони містять казеїн (фосфопротейд, 75–80 %), лактоальбуміни і лактоглобуліни. Альбуміни характеризуються високою абсорбційною здатністю, транспортують іони металів, ліки, жирні кислоти та ін. До складу білків молока входять усі амінокислоти, які містяться у білках різних тканин тварин.

Встановлено, що досліджувані антибіотики впливали на вміст білків у молоці. У досліджуваних зразках молока вміст білків становив

Таблиця 1 – Динаміка зміни вмісту жиру в молоці під дією антибіотиків

№ з/п	Полікомпонентні модельні біосистеми	Жир, %	A, %	B, рази
I.1.	Молоко	2,51		
I.2.	Молоко+120 мг бензилпеніциліну натрійної солі	2,59	0,08	
I.3.	Молоко+240 мг бензилпеніциліну натрійної солі	2,65	0,14	1,0
I.4.	Молоко+360 мг бензилпеніциліну натрійної солі	2,83	0,32	2,3
II.1.	Молоко	2,56		
II.2.	Молоко+60 мг гентаміцину сульфату	2,51	-0,05	
II.3.	Молоко+120 мг гентаміцину сульфату	2,28	-0,23	
II.4.	Молоко+240 мг гентаміцину сульфату	2,31	-0,25	1,0
II.5.	Молоко+360 мг гентаміцину сульфату	2,15	-0,41	1,6
III.1.	Молоко	2,43		
III.2.	Молоко+125 мг амікацину сульфату	2,07	-0,36	1,0
III.3.	Молоко+250 мг амікацину сульфату	1,99	-0,44	1,2
III.4.	Молоко+375 мг амікацину сульфату	1,76	-0,67	1,9
III.5.	Молоко+500 мг амікацину сульфату	2,07	-0,36	1,0
IV.1.	Молоко	2,48		
IV.2.	Молоко+120 мг еритроміцину	2,49		
IV.3.	Молоко+240 мг еритроміцину+2,0 мл ДМСО	3,57	1,09	1,0
IV.4.	Молоко+360 мг еритроміцину+5,0 мл ДМСО	9,91	7,43	6,8

Примітка. Тут і в таблицях 2, 4: наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; A – різниця [модельна біосистема мінус молоко]; B – відношення між величинами A в полікомпонентних модельних біосистемах [напр., 3:2; 4:2; 5:2], рази.

у середньому 2,85; 2,91; 2,85; 2,83 для різних полікомпонентних модельних біосистем (I.2–I.4; II.2–II.5; III.2–III.5; IV.2–IV.4; табл. 2).

Бензилпеніциліну натрійна сіль активно реагує з білками молока. Антибіотик належить до нестійких сполук через наявність у молекулі β -лактамного циклу. Він легко інактивує з утворенням простих речовин, здатних взаємодіяти з білковими біомолекулами. Відповідно до дози антибіотика 120, 240, 360 мг, маса новоутворених білкових аддуктів у молоці збільшувалась на 0,21; 0,44; 0,71 % (I.2–I.4; табл. 2).

Взаємодія аміноглікозидів з білками молока яскраво відображає характер впливу фармакофорів і відмінність фізико-хімічних властивостей препаратів. Гентаміцину сульфат має у своїй основі N-метил- α -L-глюкозамідо- β -2-стрептозидострептідин і являє собою суміш гентаміцинів C₁, C₂, C_{1a}. Дози гентаміцину сульфату 60 і 120 мг рівносильно слабкі. При вищих концентраціях 240 і 360 мг зафіксовано зростання вмісту білків, відповідно, на 0,35 і 0,57 % (II.2–II.5; табл. 2).

Амікацин у хімічному відношенні являє собою N'-[4-аміно-2-(S)-гідроксибутирил]-O-[6-аміно-6-дезоксид- α -D-глюкопіранозил (1 $\rightarrow$ 4)]-O-[3-аміно-3-дезоксид- α -D-глюкопіранозил (1 $\rightarrow$ 6)]-2-дезоксид-D-стрептаміну дисульфат.

У молекулі амікацину сульфату наявний аліфатичний радикал N'-[4-аміно-2-(S)-гідроксибутирил], який зумовлює вищу хімічну здатність, основну фармакокінетичну і фармакологічну перевагу над гентаміцину сульфатом. Зі збільшенням дози амікацину сульфату 125, 250, 375 і 500 мг зростала маса білкових комплексів у молоці, відповідно, на 0,60; 1,11; 1,49; 1,91 % (III.2–III.5; табл. 2). Амікацин на-

лежить до найактивніших антибіотиків-аміноглікозидів, і наші дослідження підтверджують цю тезу.

Молекула еритроміцину характеризується 14-членним лактонним циклом, який зв'язаний з двома цукрами – дезозаміном і кладинозою. За звичайних умов експерименту внаслідок малої розчинності у воді його взаємодія з білками молока незначна. У дозі 120 мг зафіксовано середній приріст 0,16 %. При розчиненні 240 мг препарату в 2,0 мл ДМСО вміст білків збільшувався на 1,43 %. Однак доза еритроміцину 360 мг у 5,0 мл ДМСО була критичною та спричиняла перерозподіл заряду нових комплексів і різке зменшення маси білків на -2,25 %. У даному випадку очевидна роль димексиду як розчинника і сольванта (IV.2–IV.5; табл. 2).

Вплив антибіотиків на вміст СЗМЗ у молоці. Склад сухого залишку в молоці становить 11–17 % (молочний цукор – 4,0–5,5 %; жир – 2,8–6,0 %; білкові сполуки – 2,5–4,0 %; мінеральні речовини – 0,6–0,8 %; цитратна кислота – 0,1–0,2 % та інші компоненти) [6].

Встановлено, що бензилпеніциліну натрійна сіль, гентаміцину сульфат, амікацину сульфат та еритроміцин збільшували вміст СЗМЗ. У досліджуваних зразках молока вміст СЗМЗ становив у середньому 8,51; 8,68; 8,46; 8,41 % для різних полікомпонентних модельних біосистем (I.2–I.4; II.2–II.5; III.2–III.5; IV.2–IV.4; табл. 3).

За нормальних умов *in vitro* бензилпеніциліну натрійна сіль у зростаючих дозах активно підвищувала вміст СЗМЗ, а саме: 120 мг – на 0,65 %; 240 мг – на 1,31 %; 360 мг – на 2,16 % (I.2–I.4; табл. 3).

Таблиця 2 – Динаміка зміни вмісту білків у молоці під дією антибіотиків

№ з/п	Полікомпонентні модельні біосистеми	Білки, %	A, %	B, рази
I.1.	Молоко	2,85		
I.2.	Молоко+120 мг бензилпеніциліну натрійної солі	3,06	0,21	1,0
I.3.	Молоко+240 мг бензилпеніциліну натрійної солі	3,29	0,44	2,1
I.4.	Молоко+360 мг бензилпеніциліну натрійної солі	3,56	0,71	3,4
II.1.	Молоко	2,91		
II.2.	Молоко+60 мг гентаміцину сульфату	2,97	0,06	
II.3.	Молоко+120 мг гентаміцину сульфату	2,96	0,05	
II.4.	Молоко+240 мг гентаміцину сульфату	3,26	0,35	1,0
II.5.	Молоко+360 мг гентаміцину сульфату	3,48	0,57	1,6
III.1.	Молоко	2,85		
III.2.	Молоко+125 мг амікацину сульфату	3,45	0,60	1,0
III.3.	Молоко+250 мг амікацину сульфату	3,96	1,11	1,9
III.4.	Молоко+375 мг амікацину сульфату	4,34	1,49	2,5
III.5.	Молоко+500 мг амікацину сульфату	4,76	1,91	3,2
IV.1.	Молоко	2,82		
IV.2.	Молоко+120 мг еритроміцину	2,98	0,16	
IV.3.	Молоко+240 мг еритроміцину+2,0 мл ДМСО	4,25	1,43	1,0
IV.4.	Молоко+360 мг еритроміцину+5,0 мл ДМСО	0,57		

Вплив аміноглікозидів на сухий залишок також залежав від дози. Гентаміцину сульфат у дозах 60 і 120 мг збільшував СЗМЗ незначно, а саме: на 0,17 і 0,07 % відповідно; у дозах 240 і 360 мг – на 0,93 і 1,49 %.

Амікацину сульфат у дозах 125, 250, 375, 500 мг збільшував СЗМЗ, відповідно, на 1,65; 3,12; 4,19; 5,51 %. В однакових умовах досліді амікацину сульфат за дією на СЗМЗ значно переважав гентаміцину сульфат (II.2–II.5; III.2–III.5; табл. 3).

Еритроміцин у дозі 120 мг збільшував СЗМЗ на 0,38 %. При розчиненні 240 мг еритроміцину в 2,0 мл ДМСО, а 360 мг препарату – в 5,0 мл ДМСО зафіксовано збільшення СЗМЗ,

відповідно, на 4,32 і 24,6 %. Димексид підсилював реакційну здатність макроліду (IV.2–IV.5; табл. 3).

Вплив антибіотиків на густину молока. Густина є стандартизованим показником якості молока [1]. Встановлено, що досліджувані антибіотики згущують молоко. У зразках молока для різних полікомпонентних модельних біосистем встановлено такі середні значення густини: 29,95; 30,55; 29,83; 29,60 кг/м³ (I.2–I.4; II.2–II.5; III.2–III.5; IV.2–IV.4; табл. 4).

Бензилпеніциліну натрійна сіль активно згущувала молоко. Показники густини зростали зі збільшенням дози антибіотика: 120 мг – на 2,35 кг/м³; 240 мг – на 4,80 кг/м³; 360 мг –

Таблиця 3 – Динаміка зміни вмісту СЗМЗ у молоці під дією антибіотиків

№ з/п	Полікомпонентні модельні біосистеми	СЗМЗ, %	А, %	В, рази
I.1.	Молоко	8,51		
I.2.	Молоко+120 мг бензилпеніциліну натрійної солі	9,16	0,65	1,0
I.3.	Молоко+240 мг бензилпеніциліну натрійної солі	9,82	1,31	2,0
I.4.	Молоко+360 мг бензилпеніциліну натрійної солі	10,67	2,16	3,3
II.1.	Молоко	8,68		
II.2.	Молоко+60 мг гентаміцину сульфату	8,85	0,17	
II.3.	Молоко+120 мг гентаміцину сульфату	8,75	0,07	
II.4.	Молоко+240 мг гентаміцину сульфату	9,61	0,93	1,0
II.5.	Молоко+360 мг гентаміцину сульфату	10,17	1,49	1,6
III.1.	Молоко	8,46		
III.2.	Молоко+125 мг амікацину сульфату	10,11	1,65	1,0
III.3.	Молоко+250 мг амікацину сульфату	11,58	3,12	1,9
III.4.	Молоко+375 мг амікацину сульфату	12,65	4,19	2,5
III.5.	Молоко+500 мг амікацину сульфату	13,97	5,51	3,3
IV.1.	Молоко	8,41		
IV.2.	Молоко+120 мг еритроміцину	8,79	0,38	
IV.3.	Молоко+240 мг еритроміцину+2,0 мл ДМСО	12,73	4,32	1,0
IV.4.	Молоко+360 мг еритроміцину+5,0 мл ДМСО	33,01	24,60	5,7

Примітка. Наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; А – різниця [модельна біосистема мінус молоко]; В – відношення між величинами А в полікомпонентних модельних біосистемах [напр., 3:2; 4:2; 5:2 або 4:3; 5:4], рази.

Таблиця 4 – Динаміка зміни густини молока під дією антибіотиків

№ з/п	Полікомпонентні модельні біосистеми	Густина кг/м ³	А, кг/м ³	В, рази
I.1.	Молоко	29,95		
I.2.	Молоко+120 мг бензилпеніциліну натрійної солі	32,30	2,35	1,0
I.3.	Молоко+240 мг бензилпеніциліну натрійної солі	34,75	4,80	2,0
I.4.	Молоко+360 мг бензилпеніциліну натрійної солі	37,75	7,80	3,3
II.1.	Молоко	30,55		
II.2.	Молоко+60 мг гентаміцину сульфату	31,20	0,65	
II.3.	Молоко+120 мг гентаміцину сульфату	31,05	0,50	
II.4.	Молоко+240 мг гентаміцину сульфату	34,25	3,70	1,0
II.5.	Молоко+360 мг гентаміцину сульфату	36,53	5,98	1,6
III.1.	Молоко	29,83		
III.2.	Молоко+125 мг амікацину сульфату	36,30	6,47	1,0
III.3.	Молоко+250 мг амікацину сульфату	41,95	12,12	1,9
III.4.	Молоко+375 мг амікацину сульфату	46,15	16,32	2,5
III.5.	Молоко+500 мг амікацину сульфату	50,85	21,02	3,2
IV.1.	Молоко	29,60		
IV.2.	Молоко+120 мг еритроміцину	31,05	1,45	1,0
IV.3.	Молоко+240 мг еритроміцину+2,0 мл ДМСО	44,90	15,30	10,6
IV.4.	Молоко+360 мг еритроміцину+5,0 мл ДМСО	15,25	14,35	9,9

на 7,80 кг/м³ (I.2–I.4; табл. 4). Вплив аміноглікозидів на густину також залежав від дози. Гентаміцину сульфат у дозах 60 і 120 мг майже однаково впливав на густину, а саме: на 0,65 і 0,50 кг/м³ відповідно. У дозах 240 і 360 мг гентаміцину сульфат збільшував густину, відповідно, на 3,70 і 5,98 кг/м³.

Амікацину сульфат у дозах 1251, 250, 375 і 500 мг збільшував густину молока, відповідно, на 6,47; 12,12; 16,32; 21,02 кг/м³. В однакових умовах досліду амікацину сульфат сильно згущував молоко, його активність перевищувала активність гентаміцину сульфату (II.2–II.5; III.2–III.5; табл. 4).

Еритроміцин у дозі 120 мг збільшував густину на 1,45 кг/м³. При розчиненні 240 мг препарату в 2,0 мл ДМСО зафіксовано збільшення густини в 10,6 раза (на 15,30 кг/м³). У дозі 360 мг еритроміцин в 5,0 мл ДМСО спричиняв руйнування надбудови білкових структур і, як наслідок, зменшення густини до 15,25 кг/м³. Димексид підсилював реакційну здатність макроліду і його вплив на густину молока (IV.2–IV.5; табл. 4).

Вплив антибіотиків на вміст води, доданої до молока. Антибіотики бензилпеніциліну натрійна сіль, гентаміцину сульфат, амікацину сульфат і еритроміцин здатні легко поглинати вологу.

У зразках молока встановлено такі середні значення води: 5,0; 4,15; 3,73; 3,9 % для різних

полікомпонентних модельних біосистем (I.2–I.4; II.2–II.5; III.2–III.5; IV.2–IV.4; табл. 5).

Бензилпеніциліну натрійна сіль активно зв'язувала воду, додану до молока. Доза 120 мг поглинала 2,65 % води; 240 мг – решту 2,35 % (I.2–I.4; табл. 5).

Гентаміцину сульфат у дозі 60 мг зв'язував 2,0 % води, доданої до молока; доза 120 мг повністю поглинала решту доданої води.

Амікацину сульфат у дозі 125 мг зв'язував 3,73 % води, доданої до молока (II.2–II.5; III.2–III.5; табл. 5).

Еритроміцин у дозі 120 мг зв'язував 3,9 % води, доданої до молока (IV.2–IV.5; табл. 5).

ВИСНОВКИ. 1. Антибіотики взаємодіють *in vitro* за нормальних умов з біомолекулами молока, збільшуючи вміст білків, СЗМЗ і густину залежно від дози.

2. Антибіотики β-лактамного ряду (бензилпеніциліну натрійна сіль) і макроліди-лактони (еритроміцин) підвищують вміст жиру в молоці, аміноглікозиди (гентаміцину сульфат, амікацину сульфат) – знижують його.

3. Димексид підсилює вплив еритроміцину на основні компоненти молока. У дозі 360 мг еритроміцин у 5,0 мл ДМСО спричиняє руйнування надбудови білкових структур, наслідком чого є різка зміна густини молока.

4. Антибіотики поглинають воду, додану до молока, залежно від дози.

Таблиця 5 – Динаміка зміни вмісту доданої води в молоці під дією антибіотиків

№ з/п	Полікомпонентні модельні біосистеми	Додана вода, %	А, %
I.1.	Молоко	5,00	
I.2.	Молоко+120 мг бензилпеніциліну натрійної солі	2,65	2,35
I.3.	Молоко+240 мг бензилпеніциліну натрійної солі	0	
I.4.	Молоко+360 мг бензилпеніциліну натрійної солі	0	
II.1.	Молоко	4,15	
II.2.	Молоко+60 мг гентаміцину сульфату	2,00	2,15
II.3.	Молоко+120 мг гентаміцину сульфату	0	
II.4.	Молоко+240 мг гентаміцину сульфату	0	
II.5.	Молоко+360 мг гентаміцину сульфату	0	
III.1.	Молоко	3,73	
III.2.	Молоко+125 мг амікацину сульфату	0	3,73
III.3.	Молоко+250 мг амікацину сульфату	0	
III.4.	Молоко+375 мг амікацину сульфату	0	
III.5.	Молоко+500 мг амікацину сульфату	0	
IV.1.	Молоко	3,90	
IV.2.	Молоко+120 мг еритроміцину	0	3,90
IV.3.	Молоко+240 мг еритроміцину+2,0 мл ДМСО	0	
IV.4.	Молоко+360 мг еритроміцину+5,0 мл ДМСО	0	

Примітка. Наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; А – різниця [модельна біосистема мінус молоко].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антибактерійні препарати для лікування і профілактики інфекційних хвороб у тварин / Л. І. Петрух, О. І. Михалюк, О. В. Пронюк, М. М. Коваленко // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. – Львів, 2003. – 5, № 3. – Ч. 1. – С. 110–117.
2. Бокун А. А. Физико-химические свойства и состав молока и крови коров красно-степной породы в норме и при маститах : дис. ... канд. биол. наук / Бокун А. А. – Львов, 1979.
3. Вербицкий П. І. Становлення ринку ветеринарних препаратів України / П. І. Вербицкий, І. Я. Коцюмбас, О. Г. Гаврилюк // Наук.-техн. бюлетень. – 2005. – Вип. 6. – № 3, 4. – С. 12–18.
4. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
5. Даниленко М. В. Клиническое применение димексида / М. В. Даниленко, Н. М. Туркевич. – К. : Здоров'я, 1976. – 78 с.
6. Димексид. Dimexidum. Диметилсульфоксид. ФС 42У-11-710-00.
7. Довідник ветеринарних препаратів і кормових добавок зарубіжного виробництва / за ред. М. В. Косенка, П. П. Достоевського. – К. : Ветінформ, 1999. – 352 с.
8. Каталог ветеринарних препаратів // ООО “Зооветеринарный центр”. – Харьков, 2005. – С. 10.
9. Про молоко та молочні продукти : Закон України № 1870-IV. – Київ, 24.06.04.

Л. І. Петрух, О. І. Михалюк, М. М. Коваленко, А. В. Павленко, А. П. Паныч¹
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ КОНТРОЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНЫХ
ПРЕПАРАТОВ И КОРМОВЫХ ДОБАВОК¹, ЛЬВОВ

ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МОЛОКА

Резюме

Исследовано *in vitro* взаимодействие некоторых антибиотиков с основными компонентами молока коровьего. Установлено зависимость содержания жира, белков, сухого молочного остатка, плотности и добавленной воды от концентрации антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бензилпеницилина натриевая соль, амикацина сульфат, гентамицина сульфат, эритромицин, основные компоненты молока коровьего.

L. I. Petrukh, O. I. Myhalyk, M. M. Kovalenko, O. V. Pavlenko, O. P. Panych¹
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY
STATE SCIENTIFIC-RESEARCH CONTROL INSTITUTE OF VETERINARY
PREPARATIONS AND FODDER ADDITIVES¹, LVIV

ACTION OF SOME ANTIBIOTICS ON THE BASIC MILK COMPONENTS

Summary

There was researched *in vitro* interaction of some antibiotics with basic milk components. Dependence composition of basic milk components from antibiotics concentration was determined.

KEY WORDS: benzylpenicillinum natrium, amikacin sulphate, gentamycin sulphate, erythromycin, basic milk components.

Отримано 06.12.11

Адреса для листування: Л. І. Петрух, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Солодова, 10, Львів, 79010, Україна.

ВМІСТ АМІНОКИСЛОТ ТА МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У КРІОЛІОФІЛІЗОВАНІЙ КСЕНОШКІРІ ЯК ПОКАЗНИК ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Наведено характеристику кількісно-якісного складу мікроелементів і амінокислот ксенодермального субстрату кріоліофілізованої шкіри свині як біоактивної субстанції перспективного органопрепарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріоліофілізована шкіра свині, подрібнений ксенодермальний субстрат, амінокислотний і мікроелементний склад.

ВСТУП. В останні роки значного науково-практичного і медико-соціального ефекту досягнуто в результаті інноваційної реалізації сучасних технологій виготовлення і застосування органопрепаратів із тваринної сировини. Особливо широко використовують кріоліофілізовані дермоімпланти зі шкіри свині для місцевого застосування при лікуванні ран [1, 3]. З урахуванням високого вмісту в ксеногенній шкірі колагену (до 70 % без води і жиру), структурних білків (ретикулін, еластин, кератин) та інших біологічно активних сполук, зокрема протеогліканів, поліпептидного епідермального фактора росту тощо постала необхідність проведення різнопланових наукових досліджень подрібненого кріоліофілізованого ксенодермоімпланти як принципово нової форми виробу медичного призначення, який можна використовувати не лише для місцевого лікування ран, але й на системному рівні у вигляді харчової добавки тощо.

Метою даної роботи було дослідити вміст амінокислот і мікроелементів у подрібненому субстраті кріоліофілізованої шкіри свині.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Подрібнений субстрат кріоліофілізованої ксеногенної шкіри свині виготовляли із спеціально обробленої шкіри щойно забитих тварин за технологією кріовакуумного консервування, розробленою проф. В. В. Бігуняком [6, 7]. Останню впроваджено у промислове виробництво ксенодермоімплантів в Україні (свідectво про державну реєстрацію № 1967/2003). Отримані в процесі кріоліофілізації шкірні клапти подрібнювали в ножовому млині, після чого просіювали через систему сит. Хімічний аналіз порош-

коподібної шкіри свині на вміст мікроелементів проводили в Харківському науково-дослідному інституті хімії, відділенні радіохімії і радіоекології. Амінокислоти досліджували в Київському національному аграрному університеті в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Склад амінокислот визначали методом рідинної хроматографії з виготовленням проб шляхом попереднього кислотного гідролізу [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Взятий у дослідження подрібнений і фасований ксенодермальний субстрат у вигляді пухкої гігроскопічної порошкоподібної маси білувато-кремового кольору складався з мікрочасточок розміром від 0,01 до 1,0 мм включно (рис. 1).

Уявлення про особливості хімічного складу кріоконсервованої і ліофілізованої шкіри свині та співвідношення окремих її компонентів можна отримати за наведеними в таблиці даними.

З огляду на особливості якісно-кількісного мікроелементного й амінокислотного складу подрібненого ксенодермального субстрату,



Рис. 1. Подрібнений субстрат кріоліофілізованої шкіри свині.

Таблиця – Мікроелементний і амінокислотний склад кріоліофілізованої шкіри

Мікроелементи		Амінокислоти	
назва	мг/кг	назва	мг/100 г
Залізо	600	Аланін	1473,5
Титан	90	Аргінін	901,5
Калій	250	Аспарагін	1581,4
Кальцій	3300	Валін	678,9
Хром (загальний)	30	Гістидин	496,2
Кадмій	0,1	Гліцин	2632,6
Мідь	10	Глутамін	2291,2
Цинк	90	Ізолейцин	522,7
Нікель	15	Лейцин	1489,1
Барій	3,4	Лізін	1224,7
Срібло	4,0	Пролін	3447,4
Органічний азот	12,1	Серин	1873,5
		Тирозин	1004,1
		Треонін	1436,6
		Фенілаланін	1086,3

можна отримати певне уявлення про біологічну активність його як органопрепарату з поліпотентними можливостями. То ж відома лікувальна ефективність консервованої ксеношкіри не в останню чергу визначається вмістом у ній таких незамінних амінокислот, як аргінін, валін, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізін, треонін та фенілаланін. Тим більше, що з останніми, як відомо, пов'язаний перебіг життєво важливих процесів в організмі, наприклад з участю в біоенергетичному забезпеченні скоротливої функції м'язів (аргінін), утворенням регуляторних ензимів сукциніл-КоА й ацетил-КоА (валін), синтезом сполук регуляторного спрямування, зокрема гістаміну (гістидин), ГАМК і АМФ (глутамін), фосфоліпідів (серин), секрецією гормонів щитоподібної залози (тирозин).

Звертає на себе увагу значний вміст у ксенодермальному субстраті заміної глутамінової кислоти (2291 мг/кг), яка попереджує в організмі ліпопероксидацію біологічних мембран, забезпечує здатність до трансмембранного транспорту амінокислот, підтримання заліза у двовалентному стані (Fe^{2+}) в молекулі гемоглобіну, інактивації ксенобіотиків і токсичної дії похідних метаболітів (лейкотриєнів, простагландинів, естрадіолу тощо).

Високому окисно-відновному потенціалу подрібненого ксенодермального субстрату, пов'язаному із вмістом амінокислот, окисню-

вальних ферментів (пероксидаза, цитохром-оксидаза), інших біологічно активних речовин, зокрема кислих мукополісахаридів (гіалуронова і хондроїтинсірчана кислоти та гепарин), сприяє наявність значної кількості в субстраті мікроелементів. Останнім належить особлива роль у біоенергетичній активації поліпептидних макромолекул, утворених із мікрочасточок ксенодермального субстрату в процесі гідролізу і мобілізації інших природних механізмів біохімічної деградації білкової частини протеогліканів [2, 5, 8, 9]. Саме широкий за спектром вміст мікроелементів, як видно з таблиці, наприклад, таких, як мідь, цинк, срібло, кальцій, залізо та ін., забезпечує багатовекторну біологічну активність новоствореного органопрепарату.

ВИСНОВОК. Наведені дані щодо вмісту мікроелементів і амінокислот у порошкоподібному ксенодермальному субстраті як компонентів, що пов'язані з високим пластичним, метаболічним і окисно-відновним потенціалом та складають головну субстанцію органопрепарату на основі кріоліофілізованої шкіри свині, можуть бути використані для розробки нових методичних схем корекції порушених функцій хворого організму: у вигляді харчової добавки для перорального застосування, для місцевого лікування ран, а також як засіб корекції при лікуванні різних захворювань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бігуняк В. В. Застосування комбінованого генетично неоднорідного субстрату в хірургічній дер-

мопластиці / В. В. Бігуняк, В. В. Дем'яненко, Н. О. Старикова // Шпит. хірургія – 2007. – № 2. – С. 52–56.

2. Войнар А. О. Биологическая роль микро-элементов в организме животных и человека / А. О. Войнар. – М. : Высшая школа, 1960. – 544 с.
3. Использование лиофилизированных ксено-дермотрансплантатов в ожоговых отделениях Укра-и-ны / Т. В. Бигуняк, В. И. Нагайчук, В. В. Демья-ненко, Н. В. Гуда // Актуальные проблемы лечения термических поражений и их последствий : мате-риалы респ. науч.-практ. конф., Минск, 3 октября 2008 г. – Минск : Доктор-Дизайн, 2008. – С. 87–89.
4. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография : в 2 т. / Ю. Кирхнер. – М. : Мир, 1981.
5. Котельникова Л. В. Метаболический статус эритроцитов и его коррекция стабилизаторами кле-точных мембран при нарушении энергетического гомеостаза : дисс. ... канд. биол. наук / Котельнико-ва Л. В. – Курск, 2000. – 145 с.
6. Пат. 27174 U, Україна. Спосіб експеримен-тальної терапії виразки шлунка / Гощинський В. Б., Бойко Т. Я. – № u200704657 ; заявл. 26.04.07, Бюл. № 17.
7. Пат. 36019. A61K 35/00, A61K 39/00, A01N 1/02, G01N 33/53 Спосіб виготовлення субстрату тканин-ного антигену / Дем'яненко В. В., П'ятницький Ю. С., Гуда Н. В., Лучанко П. І., Лоза Л. С. – № u2008 06245 ; заявл. 12.05.08 ; опубл. 10.10.08, Бюл. № 19.
8. Шипицына И. В. Влияние инсулиноподобных факторов роста на репаративный остео- и хонд-рогенез при заживлении переломов вертлужной впадины : дисс. ... канд. вет. наук / Шипицына И. В. – Челябинск, 2001. – 160 с.
9. Horner A. A. Rat heparins. A study of the relative sizes and antithrombin-binding characteristics of heparin proteoglycans, chains and depolymerization products from rat adipose tissue, heart, lungs, peritoneal cavity and skin / A. A. Horner // Biochem. J. – 1986. – **240** (1). – P. 171–179.

Н. В. Гуда, А. В. Цимбалюк

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В КРИОЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ КСЕНОКОЖЕ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЕЁ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Резюме

Представлена характеристика качественно-количественного состава микроэлементов и аминокислот ксенодермального субстрата криолиофилизированной свиной кожи в качестве биоактивной субстанции перспективного органопрепарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криолиофилизированная свиная кожа, измельченный ксенодермальный субстрат, аминокислотный и микроэлементный состав.

N. V. Huda, A. V. Tsymbaliuk

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

CONTENT OF AMINOACIDS AND MICROELEMENTS IN CRIOLIOFILIZED XENOSKIN AS AN INDICATOR OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

Characteristics of qualitative and quantitative microelements and aminoacids composition of xenodermal substrate of crioliofilized (pig's) skin as a bioactive substance of the perspective organoprepate are represented.

KEY WORDS: crioliofilized pig's skin, melled xenograft substrate, microelements and aminoacids composition.

Отримано 20.02.12

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

ВПЛИВ ПИТНОЇ ВОДИ З РІЗНИМИ КОНЦЕНТРАЦІЯМИ МІДІ НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН

У статті наведено дані про вплив питної води з різними концентраціями міді на стан антиоксидантної системи піддослідних щурів. У результаті виконаних досліджень з'ясовано, що тривале споживання піддослідними тваринами питної води з вмістом міді в кількості 1,0 мг/дм³ негативно впливає на організм щурів, призводячи до зниження активності каталази та пероксидази і сприяючи зростанню церулоплазміну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: питна вода, мідь, каталаза, пероксидаза, церулоплазмін.

ВСТУП. Питна вода є важливим чинником здоров'я людини. Але людина своєю згубною діяльністю змінює її хімічний склад. До особливо небезпечних для живих організмів хімічних токсикантів відносять сполуки важких металів, які мають змінну валентність і беруть участь в окисно-відновних процесах. До цієї групи належить і мідь [11, 13, 14]. Вона є одним із життєво необхідних для організму людини елементів і повинна постійно надходити в живі організми для забезпечення нормального проходження метаболічних процесів. Мідь має вагоме біологічне значення через свою здатність легко переносити електрони, перебуваючи в різних ступенях окиснення. Як кофери-мент мідь входить до складу цілої низки життєво важливих ферментів, таких, як гексоксидаза, галактооксидаза, катехолоксидаза, аміноксидаза, СОД, церулоплазмін, цитохром-с-оксидаза та ін. [1]. Проте індивідуальна потреба організмів у важких металах дуже мала, а надходження із зовнішнього середовища надлишкової кількості цих елементів призводить до різних токсичних ефектів [12]. Тому мідь, як і інші важкі метали, навіть у невеликій концентрації може проявляти сильну токсичну дію на живий організм через здатність заміщувати мікроелементи в активних центрах ферментів, змінюючи їх активність, впливає на обмін білків і нуклеїнових кислот та інших біополімерів [7]. Основним джерелом надходження міді в природні води є стічні води підприємств хімічної, металургійної промисловості, шахтні води, альдегідні реагенти, які

© О. В. Лотоцька, 2012.

використовують для знищення водоростей. Мідь може з'являтися в результаті корозії мідних трубопроводів та інших споруд, які застосовують у системах водопостачання. Вміст міді у підземних водах зумовлений взаємодією води з гірськими породами, що її містять (халькопирит, халькозин, ковелін, борніт, малахіт, азурит, хризокол, бротантин). В Україні гранично допустимою концентрацією (ГДК) міді у воді водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового водокористування є 1,0 мг/дм³, у воді рибогосподарських водойм – 0,001 мг/дм³ [5]. Проте, згідно зі стандартами на питну воду в США, ГДК міді дещо вища і становить 1,3 мг/дм³, а за рекомендаціями ВООЗ і ЄС – 2,0 мг/л [15]. Хоча зафіксовано гострі отруєння людей при споживанні з питною водою міді в дозі 0,14 мг/кг [4].

Існує думка, що основним механізмом токсичної дії міді є посилення процесів вільнорадикального окиснення у тканинах [10]. Тому постійне зростання темпів забруднення навколишнього середовища важкими металами, зокрема сполуками міді, може порушити рівновагу процесів переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в організмі та призвести до тяжких захворювань. Інтенсивність вільнорадикального окиснення визначається, з одного боку, швидкістю утворення ініціаторів переокиснення (вільних радикалів), а з іншого – функціональним станом антиоксидантної системи (АОС) [3].

Метою даного дослідження було вивчити вплив питної води з концентрацією міді згідно з вимогами ДСанПіНу 2.2.4-171-10 "Гігієнічні

вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною” [5].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 36 білих безпородних щурах-самцях масою 200–220 г. Тварини перебували на загальному раціоні віварію з вільним доступом до води. Щури 1-ї групи (контрольної) споживали воду з міського водогону, щури 2-ї групи споживали ту ж воду з добавкою міді в кількості $1,0 \text{ мг/дм}^3$, щури 3-ї групи – з вмістом міді $0,1 \text{ мг/дм}^3$. Використовували воду гідрокарбонатно-кальцієвого класу з Тернопільського міського водогону.

Групи відбирали методом рандомізації. Експерименти проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях, та норм біомедичної етики і Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001) [6].

Вплив іонів міді на організм піддослідних тварин оцінювали за ступенем активності ферментів АОС – церулоплазміну (ЦП), каталази (КТ) та пероксидази (ПО), які перешкоджають вільнорадикальному окисненню або нейтралізують вже утворені вільні радикали чи ліпоперекиси. Щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопентал-натрієвим наркозом через 1 і 3 місяці від початку дослідів. Для біохімічного дослідження брали сироватку крові. Активність КТ у сироватці крові визначали за здатністю перекису водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс жовтого кольору [9], наявність ПО в крові – за реакцією окиснення бензидину при наявності перекису водню [2], вміст ЦП у сироватці крові – за здатністю *p*-фенілендіаміну в присутності ЦП окиснювати фермент з утворенням забарвлених сполук рожевого кольору [8]. Експериментальні дані опрацьовували методом варіаційної статистики з визначенням критерію Стюдента і ступеня достовірності з використанням комп’ютерної програми “Excel”.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При оцінці впливу ксенобіотиків на АОС організму піддослідних тварин основна увага належить церулоплазміну, каталазі й пероксидазі, які пригнічують вільнорадикальне окиснення або нейтралізують вже утворені вільні радикали чи ліпоперекиси.

Результати досліджень показали, що при споживанні води з вмістом міді змінювались показники антиоксидантної системи.

Як видно з рисунка 1, у щурів 1-ї дослідної групи через 1 місяць від початку експерименту достовірно ($p < 0,001$) зменшилась кількість каталази в сироватці крові, вона дорівнювала $0,140 \pm 0,008$ при контрольних величинах ($0,186 \pm 0,006$) ум. од. Різниця між інтактними тваринами і дослідною групою становила 25 %. У тварин 2-ї групи хоча і відмічалася тенденція до зниження, зміни були менш вираженими і мали недостовірний характер.

Після споживання води тваринами впродовж 3 місяців відмічали статистично достовірне пригнічення ($p < 0,05$) цього показника в обох дослідних групах. Так, у щурів, які споживали воду з добавкою міді в кількості $1,0 \text{ мг/дм}^3$, активність каталази в крові зменшилася з $0,157 \pm 0,008$ (в контрольній групі) до ($0,129 \pm 0,008$) ум. од. У тварин 2-ї групи зміни були менш вираженими і становили ($0,130 \pm 0,006$) ум. од.

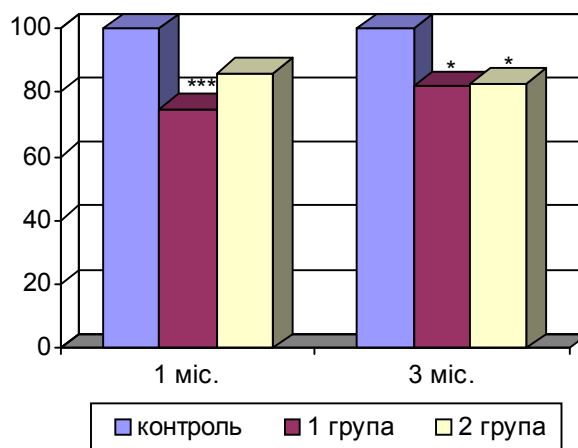


Рис. 1. Динаміка зміни активності каталази (%) в сироватці крові при споживанні питної води з різним вмістом міді.

Примітка. Тут і надалі: * – достовірність відмінностей показників дослідних і контрольної груп (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

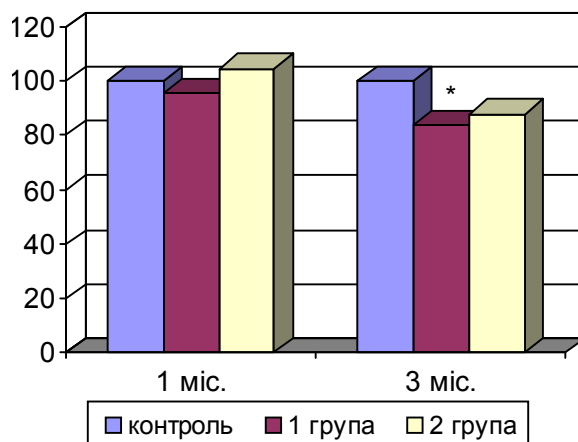


Рис. 2. Динаміка зміни активності пероксидази (%) в сироватці крові при споживанні питної води з різним вмістом міді.

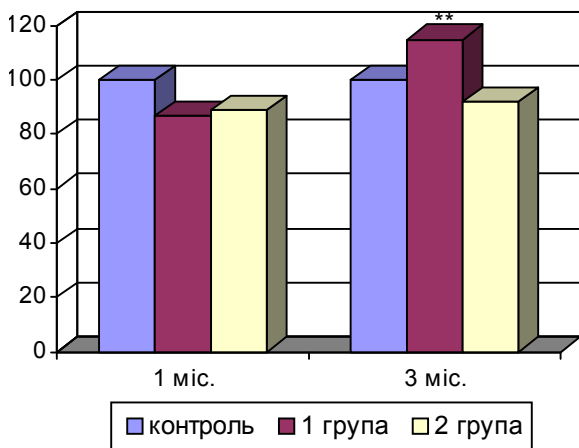


Рис. 3. Показники вмісту ЦП (%) в сироватці крові білих щурів при споживанні питної води з вмістом міді.

У результаті експерименту на щурах встановлено, що споживання питної води з вмістом міді призводить до зміни активності ще одного показника АОС – пероксидази. Як видно з рисунка 2, через 1 міс. від початку дослідження активність ферменту в сироватці крові тварин обох дослідних груп мало відрізнялася від такої в контрольній групі. Проте через 3 міс. у 1-й групі, щури якої споживали воду з добавкою міді в кількості 1,0 мг/дм³, активність пероксидази зменшилася на 16 % ($p < 0,05$).

При оцінці впливу міді на антиоксидантну систему організму піддослідних тварин велику увагу приділяли ЦП, враховуючи його роль у підтримці функціональної активності ретикуло-ендотеліальної та імунної систем в забезпеченні ряду процесів клітинного метаболізму. Як видно з рисунка 3, в перший термін спостереження відмічалася тенденція до зменшення кількості ЦП у сироватці крові піддослідних тварин, причому більш виражене в 1-й дослідній групі.

Через 3 міс. від початку експерименту в щурів цієї групи кількість даного показника достовірно ($p < 0,05$) зросла на 15 %. У 2-й дослідній групі кількість ЦП в обидва терміни спостереження мало відрізнялася від контролю.

ВИСНОВОК. Тривале споживання піддослідними тваринами питної води з вмістом міді в кількості 1,0 мг/дм³ негативно впливає на антиоксидантну систему організму щурів, призводячи до пригнічення активності каталази та пероксидази і сприяючи зростанню церулоплазміну. Це, у свою чергу, може поглиблювати ступінь вираження ендогенної інтоксикації та процесів перекисного окиснення ліпідів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Агафонова Н. А. Контроль тяжелых металлов в объектах окружающей среды / Н. А. Агафонова, С. М. Ближнюк – К., 2001. – 26 с.
- Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы / А. Н. Бояркин // Биохимия. – 1951. – **16**. – С. 352–355.
- Вклад прооксидантного компонента в механизмы токсичности тяжелых металлов и марганца / В. В. Петров, П. П. Подосиновичева, Л. Г. Кубарская [и др.] // Токсикол. вестник. – 2004. – № 1. – С. 12–14.
- Вплив деяких важких металів в питній воді на здоров'я людини [Електронний ресурс]. – Режим доступу до журн. : http://users.kharkiv.com/fipan/Metal_qcontrol.shtml
- Державні санітарні норми та правила “Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною” (ДСанПіН 2.2.4-171-10) за 2010 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до журн. : <http://zakon1.rada.gov.ua/cgi-bin/laws>.
- Етика біомедицинського експерименту / [А. Я. Циганенко, М. В. Кривоносов, Ю. С. Парашук та ін.] ; за ред. Ю. І. Кундієва // Антологія біоетики. – Львів : Бак, 2003. – С. 399–404.

- Забруднення ґрунту хімічними елементами: фактори ризику, негативний вплив на здоров'я / Н. П. Гребняк, В. П. Гребняк, А. Б. Єрмаченко [та ін.] // Довкілля та здоров'я. – 2007. – № 3(42). – С. 22–29.
- Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 911 с.
- Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, А. И. Иванова, И. Т. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
- Приходько О. О. Вплив солей важких металів на біохімічні показники крові щурів різних вікових груп / О. О. Приходько // Вісник СумДУ. – 2010. – № 2. – С. 42–47. – (Серія “Медицина”).
- Середюк А. М. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин : монография / А. М. Середюк, Э. Н. Белицкая, Н. М. Паранько. – Д. : АРТ-ПРЕСС, 2004. – 148 с.
- Стус В. П. Вміст важких металів у нирках мешканців Дніпропетровської області / В. П. Стус // Довкілля та здоров'я. – 2009. – № 2(49). – С. 20–24.
- Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы как хи-

мические загрязнители производственной и окружающей среды / И. М. Трахтенберг // Довкілля та здоров'я. – 1997. – № 2. – С. 48–51.

14. Шевчук Ю. Ф. Якість питної води джерел водопостачання міста Чернівці / Ю. Ф. Шевчук // Наук. праці УкрНДГМІ. – 2006. – Вип. 255. – С. 135–139.

15. Guidelines for Drinking-water Quality. Third Edition. 1st Addendum to vol.1 World Health Organization. – 2006. – 78 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до журн. : <http://www.lenntech.com/applications/drinking/standards/who-s-drinking-water-standards.htm#ixzz1ehtsBk5j>

Е. В. Лотоцкая

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВЛИЯНИЕ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ С РАЗНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ МЕДИ НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В статье приведены данные о влиянии питьевой воды с разными концентрациями меди на состояние антиоксидантной системы подопытных крыс. В результате выполненных исследований выяснено, что длительное употребление подопытными животными питьевой воды с содержанием меди в количестве 1,0 мг/дм³ негативно влияет на организм крыс, приводя к снижению активности каталазы и пероксидазы и способствуя росту церулоплазмينا.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: питьевая вода, медь, каталаза, пероксидаза, церулоплазмин.

O. V. Lototska

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCING OF DRINKING-WATER WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF COPPER ON THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Summary

The article adduces data on the effect of drinking water with different concentrations of copper on the antioxidant system in experimental rats. As a result of the investigations there was found that prolonged use of experimental animals of drinking water containing copper in an amount of 1,0 mg/dm³ negative effect on the body of rats, resulting in reduced activity of catalase and peroxidase and contributing to the growth of ceruloplasmin.

KEY WORDS: drinking water, copper, catalase, peroxidase, ceruloplasmin.

Отримано 29.12.11

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

М. М. Сулейман, С. Г. Ісаєв, В. Д. Яременко,
О. Є. Микитенко, О. В. Кізь, Н. Ю. Шевельова
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

СИНТЕЗ І ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ 9-АМІНО-5-НІТРОАКРИДИНІО 3-ОКСАМОЇЛЗАМІЩЕНИХ N-ФЕНІЛАНТРАНІЛАТІВ

Здійснено синтез 9-аміно-5-нітроакридиніо 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілатів. Будову 8 синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу та ІЧ-спектроскопії. Чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. Встановлено, що синтезовані речовини проявляють бактеріостатичну, фунгістатичну, протизапальну активність та потенціюють активність бензилпеніциліну натрієвої солі в суббактеріальних концентраціях. За класифікацією К. К. Сидорова, синтезовані речовини при внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних сполук ($DL_{50} > 3000$ мг/кг).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, солі 9-аміноакридину, фармакологічна активність.

ВСТУП. Здатність похідних акридину активно знищувати патогенну мікрофлору широко застосовується практичною медициною в хіміотерапії інфекційних захворювань [1, 2, 7–14]. За даними ВООЗ, кожний п'ятий мешканець земної кулі інфікований грибами. Частота інфікованості населення європейських країн становить від 20 до 70 %, у Росії щорічно реєструють 140–150 тис. хворих, в Україні кількість хворих на мікоз стоп складає 25–30 % [7]. Таким чином, особливо актуальним, на наш погляд, є пошук нових синтетичних сполук, які мають комбіновану антибактеріальну, протигрибкову та протизапальну дію. З огляду на вищенаведене, об'єктом досліджень було обрано солі, що містять у своєму складі як катіонну частину – метилзаміщені 9-аміно-5-нітроакридину, так і аніонну – 3-оксамоїлзаміщені N-фенілантранілових кислот.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 9-аміно-5-нітроакридиніо 3-оксамоїлзаміщені N-фенілантранілати (I–VIII) синтезовано шляхом зливання гарячих етанольних розчинів відповідних кислот із заміщеними 9-аміно-5-нітроакридину (рис. 1). Синтезовані солі (I–VIII) – жовті кристалічні речовини, які розчиняються у воді (1:50–1:100), спирті, ДМСО. Будову та індивідуальність підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального та хроматографічного аналізу. Як свідки при хроматографуванні вико-

ристовували вихідні речовини [13]. Дані елементного аналізу відповідають розрахованим. В ІЧ-спектрах солей (табл. 1) спостерігаються смуги поглинання, які підтверджують катіонно-аніонний характер синтезованих сполук: $1642\text{--}1618\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}}$), $1438\text{--}1428\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}}$), $2692\text{--}2642\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{NH}}^{\text{H}}$). ІЧ-спектральні характеристики свідчать на користь солеутворення по азоту гетероциклу, а не аміногрупи, що узгоджується з даними літератури [4, 6, 8].

Дослідження протимікробної активності проводили за загальноприйнятою методикою серійних розведень у рідкому поживному середовищі [3]. Як поживне середовище використовували розчин амінопептиду (рН 7,2). Мікробне навантаження для бактерій становило $2,5 \cdot 10^5$ клітин амінопептидної 18-годинної культури в 1 мл середовища. Для вирощування грибів використовували середовище Сабуро (рН 6,5–6,7). Навантаження становило 500 000 репродуктивних тілець в 1 мл.

Гостру токсичність синтезованих солей 9-аміно-5-нітроакридиніо (I–VIII) вивчали при внутрішньошлунковому введенні білим мишам

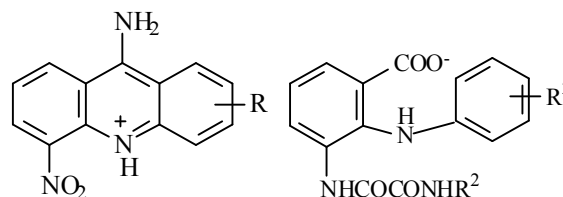


Рис. 1. 9-аміно-5-нітроакридиніо 3-оксамоїлзаміщені N-фенілантранілати (I–VIII).

Сполука	R	R ¹	R ²	Вихід, %	Т. пл. °C	Rf*	Частота поглинання, см ⁻¹ в ІЧ-спектрах				
							ν_{NH,NH_2}	$\nu_{NH} \leq$	$\nu_s^{as} COO^-$	δ_{NH}	$\nu_s^{as} NO_2$
I	1-CH ₃	CH ₃	2'-CH ₃	92	162–164	0,39	3350 3310	2662	1624 1432	1678 1527 1320	
II	2-CH ₃	CH ₃	2'-CH ₃	89	206–209	0,42	3470 3342	2688	1620 1430	1658 1532 1318	
III	3-CH ₃	CH ₃	2'-CH ₃	93	222–224	0,40	3358	2684	1633 1430	1670 1536 1322	
IV	4-CH ₃	CH ₃	2'-CH ₃	90	170–174 розкл.	0,41	3362	2692	1642 1436	1685 1507 1314	
V	2-CH ₃	(CH ₂) ₂ OH	3'-CH ₃	90	183–185 розкл.	0,34	3298	2642	1625 1438	1688 1512 1306	
VI	2,3-(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ OH	3'-CH ₃	88	169–171 розкл.	0,32	3344 3290	2658	1618 1430	1675 1520 1318	
VII	2-CH ₃	C ₄ H ₉ -H	3',4'-(CH ₃) ₂	94	240–242	0,29	3334	2674	1634 1428	1678 1522 1324	
VIII	4-CH ₃	C ₄ H ₉ -H	3',4'-(CH ₃) ₂	94	196–198 розкл.	0,30	3350	2670	1628 1434	1678 1505 1320	

Примітка. * – значення Rf наведено в системі ацетон–етанол–хлороформ–гексан (2:1:0,5:2).

Таблиця 2 – Бактеріостатична активність 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілатів

[illegible]

[3]. Протизапальну активність досліджували на моделі карагенінового набряку в мишей у дозі 10 мг/кг. Препаратом порівняння обрано диклофенак натрію.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати мікробіологічного скринінгу (табл. 1) показали, що 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамойлзаміщених N-фенілантранілатів (I–VIII) відносно золотистого стафілокока, кишкової, сінної та синьогнійної паличок інгібують ріст мікроорганізмів у концентрації 3,9–250 мкг/мл. Наявність високої бактеріостатичної дії на кишкову паличку в синтезованих солей став поштовхом до дослідження сполук (I–VIII) на кишкову групу патогенних мікроорганізмів. Для цього було використано чотири штами роду *Salmonella* (*Salmonella dublin*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*). Результати досліджень свідчать про те, що солі (I, V, VII) інгібують ріст сальмонел у концентрації 7,8–31,2 мкг/мл і перевищують за дією етакридину лактат у 4–16 разів (табл. 2).

Загальновідомо, що деякі види дріжджоподібних грибів (*Candida albicans*, *C. tropicalis* та ін.) викликають у людини кандидоз. Зокрема, і це найбільш актуально, сильні грибкові ураження спостерігаються як наслідок нераціональної антибіотикотерапії та зловживання

сульфаніламідними препаратами. Пошук сполук з протигрибковою дією проводили і раніше серед похідних акридину [4, 6, 10–13]. Результати досліджень (табл. 3) свідчать про те, що вперше синтезована група сполук проявляє фунгістатичну активність у концентрації 7,8–500 мкг/мл. Найбільш активними сполуками відносно штаму *Candida albicans*, *C. tropicalis* є солі (I, V, VII); відносно *C. triadis*, *C. catenulata* – сполуки (I, VII); відносно *C. pseudotropicalis*, *C. mycotritoides* активність варіює від 31,2–250 мкг/мл. Для солей (I–III) характерна фунгістатична дія відносно *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton gypsum*, *Microsporum canis*, *Philophora spissum* у концентрації 7,8–500 мкг/мл (табл. 3).

Фармакологічний скринінг на протизапальну активність у дозі 10 мг/кг виявив три сполуки (I, V, VII) з антиексудативною дією на рівні мефенамінової кислоти (табл. 2).

У дослідях *in vitro* встановлено, що бактеріостатичні концентрації солей (I, V, VII, VIII) збільшують активність бензилпеніциліну натрієвої солі в 1,03–2,2 рази відносно золотистого стафілокока та в 2,69–4,46 рази відносно синьогнійної палички (табл. 4). Таким чином, проведені дослідження підтверджують можливість використання похідних акридину для підвищення специфічної активності дії антибіотиків [4, 6, 10].

Таблиця 3 – Фунгістатична активність 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамойлзаміщених N-фенілантранілатів

Сполука	Фунгістатична, мкг/мл									
	Candida						Trichophyton rubrum	Trichophyton gypsum	Microsporum canis	Philophora spissum
	albicans	triadis	catenulata	tropicalis	pseudotropicalis	mycotritoides				
I	7,8	15,6	31,2	31,2	62,5	31,2	125	250	125	500
II	62,5	125	125	250	125	250	250	125	62,5	250
III	125	125	125	62,5	62,5	125	125	125	62,5	125
IV	125	62,5	62,5	62,5	125	125	125	250	62,5	125
V	7,8	125	125	31,2	62,5	31,9	125	250	7,8	125
VI	125	125	125	500	125	250	500	500	125	250
VII	7,8	15,6	15,6	31,2	62,5	62,5	15,6	62,5	7,8	62,5
VIII	250	125	62,5	125	125	125	125	125	125	125

Таблиця 4 – Результати вивчення потенціувальної дії 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамойлзаміщених N-фенілантранілатів на бактеріостатичний ефект бензилпеніциліну натрієвої солі (БПNa)

Сполука	Штами мікроорганізмів	
	золотистий стафілокок, ПК, мкг/мл	синьогнійна паличка, ПК, мкг/мл
БПNa	0,90	15,6
БПNa+I	0,80	5,0
БПNa+V	0,87	5,8
БПNa+VII	0,41	3,6
БПNa+VIII	0,59	3,5

За класифікацією К. К. Сидорова, 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамоїлзаміщені N-фенілантранілати при внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних речовин, їх $DL_{50} > 3000$ мг/кг (табл. 2).

ВИСНОВКИ. 1. З метою пошуку нових біологічно активних речовин здійснено синтез солей на основі метилзаміщених 9-аміно-5-нітроакридинів та 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот і встановлено їх будо-

ву за допомогою комплексу сучасних методів дослідження.

2. Фармакологічний скринінг виявив сполуки з високою бактеріостатичною, фунгістатичною та помірно протизапальною активністю.

3. Солі 9-аміно-5-нітроакридинію 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілатів можуть бути використані як мікродобавки до бензилпеніциліну натрієвої солі для потенціювання специфічної дії антибіотиків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бражко О. А. Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук / О. А. Бражко. – К., 2005. – 42 с.

2. Волянський Ю. Л. Перспективи створення протимікробних препаратів на основі акридину і фенантридину / Ю. Л. Волянський, С. Л. Крестецько // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 3. – С. 92–98.

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

4. Ісаєв С. Г. Синтез, реакційна здатність і біологічна активність похідних орто-галогенбензойних, ароматичних амінокислот та акридину : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра фармац. наук / С. Г. Ісаєв. – Х., 2008. – 36 с.

5. Ісаєв С. Г. Фармакологічна активність заміщених 5-нітро-9-[2'окси-2'-п-(нітрофеніл)-етил]аміноакридину / С. Г. Ісаєв // Ліки. – 2001. – № 3/4. – С. 72–74.

6. Кобзар Н. П. Синтез і біологічні властивості солей на основі заміщених 9-аміноакридину та 5-бром-3-сульфамойл-N-фенілантранілових кислот / Н. П. Кобзар, С. Г. Ісаєв, Н. Ю. Шевельова // Фармац. журн. – 2005. – № 3. – С. 76–80.

7. “Круглый стол” по проблемам эпидемиологии, клиники и лечения микозов кожи и ее придатков // Дерматология та венерология. – 2001. – № 4 (14). – С. 64–79.

8. Куцук Р. В. Мікробіологічне обґрунтування нових підходів до лікування та профілактики

стафілококових інфекцій на основі дослідження протимікробних властивостей похідних тіазолідину, фурану, хіноліну, акридину і біологічно активних речовин природного походження : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук / Р. В. Куцук. – Х., 2008. – 40 с.

9. Ляхова О. А. Синтез та біологічна активність гідразинівмісних похідних акридину, антрацену та флуорену : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. хім. наук / О. А. Ляхова. – Одеса, 2005. – 21 с.

10. Оптимізація пошуку ефективних лікарських засобів на основі акридину : інформ. лист № 289-2009 / С. Г. Ісаєв, Н. Ю. Шевельова, М. М. Сулейман [та ін.]. – К., 2009. – Вип. № 36 з проблеми “Фармація”. – 6 с.

11. Поєднання фарбування та антимікотичної обробки трикотажних матеріалів / Н. П. Кругленко, С. Г. Ісаєв, О. П. Сумська [та ін.] // Східно-європейський журн. передових технологій. – 2009. – № 2/4 (38). – С. 23–25.

12. Синтез і дослідження біологічної активності 5-бром-3-сульфамойл-2-хлорбензоатів заміщених 5-нітро-9-аміноакридинію / С. Г. Ісаєв, Н. П. Кобзар, Л. В. Брунь [та ін.] // Мед. хімія. – 2008. – 10, № 3. – С. 54–58.

13. Синтез та біологічна активність 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот / С. Г. Ісаєв, М. М. Сулейман, Л. В. Брунь [та ін.] // Фармац. часопис. – 2010. – № 1 (10). – С. 6–9.

14. Choulga I. S. Les antipaludiques de synthese / I. S. Choulga, S. G. Issaev. – Kharkov, 1994. – 20 s.

М. М. Сулейман, С. Г. Исаев, В. Д. Яременко, Е. Е. Микитенко,
О. В. Кизь, Н. Е. Шевелева
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 9-АМИНО-5-НИТРОАКРИДИНА 3-ОКСАМОИЛЗАМЕЩЕННЫХ N-ФЕНИЛАНТРАНИЛАТОВ

Резюме

Осуществлен синтез 9-амино-5-нитроакридина 3-оксамоилзамещенных N-фенилантранилатов. Строение 8-синтезированных веществ подтверждено данными элементного анализа и ИК-спектроскопии. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. Установлено, что синтезированные вещества проявляют бактериостатическую, фунгистатическую, противовоспалительную активность и потенцируют активность бензилпенициллина натриевой соли в суббактериостатической концентрации. По классификации К. К. Сидорова, синтезированные вещества при внутривнутреннем введении относят к классу малотоксичных веществ ($DL_{50} > 3000$ мг/кг).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, соли 9-аминоакридина, фармакологическая активность.

M. M. Suleyman, S. H. Isayev, V. D. Yaremenko, O. Ye. Mykytenko,
O. V. Kiz, N. Yu. Shevelyova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF 9-AMINO-5-NITROACRIDINE OF 3-OXAMOILSUBSTITUTED OF N-PHENYLANTRANILATE

Summary

The synthesis of 9-amino-5-nitroacridine of 3-oxamoilsubstituted of N-phenylantranilates was conducted. The composition of 8 synthesized compounds was proved by the data of element analysis and their IR-spectra. The purity was controlled by the method of thin-layer chromatography. It was established that the synthesized substances have bacteriostatic, fungistatic, antiinflammatory activity and rise activity of sodium salt benzylpenicilline in subbacteriostatic concentration. According to the classification by K. K. Sydorov synthesized compounds at intrastomach entering belong to low toxic compounds ($DL_{50} > 3000$ mg/kg).

KEY WORDS: synthesis, salts of 9-aminoacridines, pharmacological activity.

Отримано 11.07.11

Адреса для листування: С. Г. Исаев, вул. Гарібальді, 11-а, кв. 21, Харків-121, 61121, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ Й ЕКГ У ТВАРИН З ГІПО- ТА ГІПЕРЕРГІЧНИМ ЗАПАЛЬНИМ ПРОЦЕСОМ У ПАРОДОНТІ

Зміни реактивності організму, крім розвитку запального процесу в пародонті, викликали збільшення рівня дієвих кон'югатів, церулоплазміну. Підвищення активності каталази спостерігалось у гіпоергічній групі, зниження – в гіперергічній. Аналіз електрокардіограм (ЕКГ) свідчив про розвиток дистрофічних процесів у міокарді, його електричну нестабільність і, як наслідок, зменшення скоротливої здатності. Деполяризація передсердь у гіпоергічній групі відбувалася швидше, а в гіперергічній – повільніше, ніж у контрольній групі; деполяризація шлуночків серця, навпаки, при гіпоергії подовжена в часі, при гіперергії – зменшена.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, ЕКГ, щури, нормергічний, гіпоергічний, гіперергічний перебіг запальної реакції, тканини пародонта.

ВСТУП. Ураження пародонта різного ступеня тяжкості є досить поширеною патологією, в людей, старших 35 років, запалення тканин пародонта відмічають уже в трьох із чотирьох обстежених, що свідчить про зростаючий характер перебігу [9–11]. Виникнення пародонтиту пов'язане не тільки з місцевими факторами (наявність зубних відкладень, нераціональне протезування), але і загальними (зниження резистентності організму, супутня патологія внутрішніх органів і систем, дисбіотичні явища) [1, 3, 7, 8].

Разом із ретельним виконанням правил гігієни порожнини рота, усуненням факторів ризику (зняття зубних відкладень, нормалізація оклюзійних контактів, протезування зубів), важливим у лікуванні пародонтиту повинно бути відновлення зрушень реактивності організму. З метою розробки методів діагностики для визначення змін реактивності організму при пародонтиті було проведено біохімічні дослідження сироватки крові й аналіз електрокардіограм (ЕКГ) експериментальних тварин з гіпо- та гіперергічним запальним процесом у пародонті.

Метою даного дослідження було провести аналіз стану перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної системи (АОС) та ЕКГ у тварин з гіпо- і гіперергічним запальним процесом у пародонті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 30 білих нелінійних щурах-самцях

© О. В. Авдеев, 2012.

масою 180–200 г, віком 5–6 місяців, яких поділили на три групи: 1-ша група – 10 білих щурів із гіпоергічною реакцією; 2-га – 10 білих щурів із гіперергічною реакцією; 3-тя (контрольна) – 10 білих щурів із нормергічною реакцією, яким внутрішньом'язово вводили 1 мл фізіологічного розчину. Моделювання гіпоергічної реакції проводили шляхом внутрішньом'язового введення алкілюючого цитостатика циклофосфану (BAT "Київмедпрепарат", Україна) протягом 7 днів щоденно з розрахунку 10 мг/кг [12], моделювання гіперергічної реакції – шляхом внутрішньом'язового введення імуномодулятора полісахаридної природи пірогеналу (НДІЕМ ім. М. Ф. Гамалєї РАМН, Росія) протягом 7 днів щоденно з розрахунку 10 мкг/кг на одну тварину на фізіологічному розчині на основі високовуглеводної дієти [13].

На 8-му добу проводили забір крові з хвостової вени тварин та запис ЕКГ з використанням електрокардіографа ЕКІТ 03М у другому стандартному відведенні з наступним математичним аналізом 100 послідовних інтервалів [4]. Підготовка щурів до електрокардіографії передбачала наркотизування за допомогою 1 % розчину барбіталу, який вводили внутрішньочеревно в дозі 0,8 мл/100 маси тіла тварин. На ЕКГ визначали частоту серцевих скорочень (ЧСС, уд./хв), тривалість інтервалів R-R (с), P-Q (с), QRS (с), Q-T (с), амплітуду зубців R, P і T (мВ), систолічний показник $SP = (Q-T)/(R-R) \cdot 100, \%$. Величина останнього перебувала в оберненій залежності від скоротливої здатності міокарда. Збільшення його

свідчить про утруднення проходження імпульсів по провідній системі [15]. У сироватці крові визначали вміст первинних і вторинних продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів (ДК), тіобарбітурово-кислих активних продуктів (ТБК-АП). Згадані метаболіти послідовно утворюються на шляхах вільнорадикального перетворення ненасичених жирних кислот мембранних фосфоліпідів, і їх одночасне визначення дає уявлення про вираження мембранної деструкції. Використані у дослідженнях методи визначення вмісту ДК ґрунтуються на здатності кон'югованих дієнових ацилів до інтенсивного поглинання в ділянці $\lambda=233$ нм [5, 16]. Вміст ТБК-АП у сироватці крові визначали колориметричним методом, який базується на утворенні забарвленого триметинового комплексу ТБК-АП з тіобарбітуровою кислотою, що має максимум поглинання при $\lambda=532$ нм [16]. Усі втручання та забій щурів проводили з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики [6].

Результати дослідження піддавали математичній обробці з використанням параметричних методів статистичного аналізу [14, 17]. Визначали основні статистичні величини: середнє арифметичне, стандартну похибку середнього арифметичного, критерій Стюдента, показник достовірності p .

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Через 7 діб в експериментальних тварин розвивалися певні зміни, що проявлялися зменшенням маси тіла щурів [2], виникненням гіперемії, набряку, кровоточивості, ерозій ясен, зменшенням висоти ясенного сосочка, руйнуванням кругової зв'язки, оголенням кореня зуба і, як показали наші попередні дослідження [1, 13], крім розвитку гінгівіту, появою пародонтальних кишень.

Проведені дослідження стану ПОЛ та АОС показали (табл. 1), що відбувалися зміни, які вказували на розвиток деструктивних проце-

сів у клітинах із пошкодженням мембран, водночас збільшувався вміст церулоплазміну (ЦП) в обох групах, у гіпоергічній групі спостерігали підвищення активності каталази, в гіперергічній – зниження.

Так, кількість ДК в гіпоергічній групі достовірно збільшувалась у 2,6 раза, в гіперергічній – у 5,6 раза. Водночас спостерігали зменшення ТБК-АП на 37,5 % в гіпоергічній групі та на 41,7 % – в гіперергічній, що, можливо, пов'язано зі значною активацією детоксикуючих систем організму. Це показують і наші попередні дослідження, коли підвищувалася сорбційна здатність еритроцитів і знижувався рівень середньомолекулярних пептидів [3].

Зміни показників АОС вказували на активацію ферментативного антиоксидантного захисту: кількість ЦП в гіпоергічній групі недостовірно зростала на 5,6 %, в гіперергічній – на 22,2 %; в гіпоергічній групі підвищувалась активність каталази на 1,4 %. В гіперергічній групі спостерігали достовірне зменшення на 12,5 %, тобто відбувалося виснаження даної ланки АОС.

Поряд із тим виникали певні розлади у функціонуванні системи кровообігу організму щурів. Так, оцінюючи спектр показників ЕКГ експериментальних тварин з пародонтитом, переконуємося в тому, що практично абсолютна їх більшість значно відрізнялася від контролю. Цифрові значення аналізу ЕКГ експериментальних тварин подано в таблиці 2.

Аналіз отриманих результатів свідчив про порушення функціональної активності міокарда щурів. Якщо ЧСС у гіпоергічній групі практично не змінилася (зменшення на 1,1 %), то в гіперергічній вона достовірно зменшилася на 15,2 %.

Враховуючи те, що збільшення величини систолічного показника пов'язане з утрудненням проходження імпульсів по провідній системі та перебувало в оберненій залежності від скоротливої здатності міокарда, можна говорити про її зменшення в обох дослідних групах тварин на 21 %.

Таблиця 1 – **Зміни інтенсивності ПОЛ та стану АОС у сироватці крові експериментальних тварин ($M \pm m$, $n=10$)**

Показник	Дослідна група тварин		
	інтактний контроль	гіпоергічна група	гіперергічна група
ДК, мкмоль/л	$0,07 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,03^*$	$0,39 \pm 0,06^*$
ТБК-АП, мкмоль/л	$0,24 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,02^*$
ЦП, г/л	$0,18 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,015$
Каталаза, мкат/л	$4,87 \pm 0,04$	$4,94 \pm 0,05$	$4,26 \pm 0,10^*$

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – відхилення показника достовірно відносно контрольної групи, $p \leq 0,05$.

Таблиця 2 – Зміни ЕКГ у групах експериментальних тварин ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Дослідна група тварин		
	інтактний контроль	гіпоергічна група	гіперергічна група
ЧСС, уд./хв	402,15±10,93	397,92±29,33	340,99±5,43*
СП, %	36,91±1,75	44,79±2,58*	44,73±0,85*
R-R, с	0,150±0,004	0,163±0,003*	0,176±0,003*
P-Q, с	0,051±0,003	0,044±0,003*	0,054±0,002
QRS, с	0,018±0,001	0,031±0,018	0,011±0,001
Q-T, с	0,055±0,002	0,073±0,003*	0,079±0,001*
R, мВ	0,744±0,078	0,700±0,033	0,700±0,033
P, мВ	0,100±0,009	0,123±0,015	0,176±0,003*
T, мВ	0,181±0,009	0,269±0,054	0,313±0,035*

Збільшення тривалості серцевого циклу (R-R) на 8,7 та 17,3 % в гіпо- і гіперергічній групах також свідчило про порушення скоротливої здатності міокарда.

Тривалість інтервалу P-Q зменшилася в гіпоергічній групі на 13,7 %, водночас в гіперергічній групі цей показник збільшився на 5,9 %. Дані зміни свідчили про різнонаправлені порушення процесів деполяризації передсердь.

Найбільш яскраві зміни відбувалися з тривалістю інтервалу QRS. Так, в гіпоергічній групі спостерігалось його подовження в 1,7 раза, в гіперергічній – зменшення у 1,6 раза. Тобто можна констатувати, що при гіпоергічному запаленні пародонта процес деполяризації шлуночків серця подовжений у часі, при гіперергічному – зменшений.

Збільшення довжини інтервалу Q-T на 32,7 % в гіпоергічній групі та на 43,6 % – в гіперергічній може вказувати на дефіцит іонів Са в міокарді цих щурів, порушення процесу внутрішньошлуночкової провідності та електричну нестабільність міокарда, що викликає зменшення фракції викиду лівого шлуночка (послаблення роботи серця чи зменшення потреби в кисні). Також можна зробити висновок про значне збільшення періоду повного охоплення збудженням шлуночків серця в гіперергічній групі тварин.

Вимірювання амплітуди зубця R виявило його тенденцію до зниження (на 5,9 % в обох групах), що свідчить про зменшення потенціалу деполяризації шлуночків на основі дифузних змін міокарда щурів зі зміненою реактивністю.

Збільшення амплітуди зубця Р в 1,2 та 1,8 раза у гіпо- і гіперергічній групах вказувало на порушення деполяризації передсердь та атріовентрикулярної провідності.

Аналіз цифрових даних ЕКГ виявив збільшення амплітуди зубця Т у 1,5 раза в гіпоергічній групі та в 1,7 раза – в гіперергічній, що свідчило про ішемію міокарда.

Отже, вищевикладене демонструє, що за розвитку гіперергічного та гіпоергічного пародонтиту відбуваються інтенсифікація процесів ПОЛ, активація АОС, порушення електричних явищ у серці. У даному напрямку перспективним буде дослідити біохімічні зміни при розвитку запального процесу в пародонті за умов зміни реактивності організму в клініці.

ВИСНОВКИ. 1. При моделюванні гіпо- і гіперергічного пародонтиту відбувається активація ліпопероксидації зі збільшенням початкових її продуктів. Зменшення ТБК-АП, можливо, пояснюється активацією детоксуючих систем організму. Активність АОС достовірно знижується при гіперергічному пародонтиті. При гіпоергічному пародонтиті спостерігали тенденцію до підвищення активності АОС.

2. При експериментальному пародонтиті виникали зміни ЕКГ: зменшення ЧСС, амплітуди зубця R, збільшення СП, інтервалів R-R, Q-T, амплітуди зубців Р і Т свідчили про розвиток дистрофічних процесів у міокарді, його електричну нестабільність і, як наслідок, зменшення скоротливої здатності. Зміни тривалості інтервалу P-Q вказували на те, що деполяризація передсердь у гіпоергічній групі відбувалася швидше, а в гіперергічній – повільніше, ніж у контрольній групі. За змінами інтервалу QRS можна констатувати, що при гіпоергічному запаленні пародонта процес деполяризації шлуночків серця подовжений у часі в 1,7 раза, при гіперергічному – зменшений в 1,6 раза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдеев О. В. Морфологічні зміни пародонта в щурів при розвитку гіпореактивності / О. В. Авдеев // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2010. – № 2 (13). – С. 16–18.
2. Авдеев О. В. Порівняльна оцінка загальнофізіологічних змін у тварин із запаленням у пародонті за зміненої реактивності / О. В. Авдеев // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2011. – 11, вип. 2 (34). – С. 4–6.
3. Авдеев О. В. Стан ендогенної інтоксикації у тварин із запаленням у пародонті за зміненої реактивності / О. В. Авдеев // Мед. хімія. – 2011. – 13, № 1. – С. 126–129.
4. Баевский Р. М. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе / Р. М. Баевский, О. И. Кириллов, С. З. Клецкин. – М.: Наука, 1984. – 221 с.
5. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
6. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – 8, № 1. – С. 142–145.
7. Зв'язок захворювань пародонту з загальносоматичною патологією (огляд літератури) / О. М. Немеш, З. М. Гонга, І. В. Шилівський, А. П. Скалат // Новини стоматології. – 2006. – № 2 (47). – С. 34–37.
8. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса, 2005. – 74 с.
9. Леонтьев В. К. Здоровые зубы и качество жизни / В. К. Леонтьев // Стоматология. – 2000. – № 5. – С. 10–13.
10. Максименко П. Т. Медикаментозная патология в стоматологии / П. Т. Максименко. – Полтава, 2001. – 138 с.
11. Машенко И. С. Болезни пародонта / И. С. Машенко. – Днепропетровск: КОЛО, 2003. – 272 с.
12. Пат. 57189 Україна, МПК (2011.01) А61К 31/00 G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання пародонтиту / Авдеев О. В.; Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № u201010071; заявл. 16.08.10; опубл. 10.02.11, Бюл. № 3.
13. Пат. 66298 Україна, МПК А61К 39/104 (2006.01); G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання пародонтиту / Авдеев О. В.; Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – № u201108090; заявл. 29.06.11; опубл. 26.12.11, Бюл. № 24.
14. Поляков И. В. Практическое пособие по медицинской статистике / И. В. Поляков, Н. С. Соколова. – Л.: Медицина, 1975. – 151 с.
15. Продолжительность и дисперсия интервала Q-T в зависимости от показателей внутрисердечной гемодинамики у больных ишемической болезнью сердца / О. В. Сычев, О. А. Епанчинцева, Т. В. Гетьман [и др.] // Укр. кардіол. журн. – 2004. – № 4. – С. 72–76.
16. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 42–44, 66–68.
17. Шевченко И. Т. Элементы вариационной статистики для медиков / И. Т. Шевченко, О. П. Богатов, Ф. П. Хрипта. – К.: Здоров'я, 1970. – 107 с.

А. В. Авдеев

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ЭКГ У ЖИВОТНЫХ С ГИПО- И ГИПЕРЭРГИЧЕСКИМ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОЦЕССОМ В ПАРОДОНТЕ

Резюме

Изменения реактивности организма, кроме развития воспалительного процесса в пародонте, вызывали увеличение уровня диеновых конъюгатов, церулоплазмينا. Повышение активности каталазы наблюдалось в гипоэргической группе, снижение – в гиперэргической. Анализ электрокардиограмм (ЭКГ) свидетельствовал о развитии дистрофических процессов в миокарде, его электрической нестабильности и, как следствие, уменьшении сократительной способности. Деполяризация предсердий в гипоэргической группе происходила быстрее, а в гиперэргической – медленнее, чем в контрольной группе; деполяризация желудочков сердца, наоборот, при гипозергии продлена по времени, при гиперэргии – уменьшена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, ЭКГ, крысы, нормэргическое, гипоэргическое, гиперэргическое течение воспалительной реакции, ткани пародонта.

ANALYSIS OF BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD SERUM AND ECG IN ANIMALS WITH HYPO- AND HYPERERGIC INFLAMMATORY PROCESS IN PARODONTIUM

Summary

Changes reactivity of organism except the development of inflammatory process in a parodontium caused the increase of level of diene conjugates, hepatocuprein. An increase of activity of catalase was in a hypoergic group, diminishing – in hyperergic group. The analysis of ECG testified to development of dystrophic processes in myocardium, its electric instability and, as a result, diminishing of retractive ability. Depolarization of auricle in a hypoergic group took a place quick, in a hyperergic group – slower, than in a control group; depolarization of ventricles of heart vice versa – at hypoergy prolonged at times, at hyperergy – diminished.

KEY WORDS: ECG, rats, normergic, hypoergic, hyperergic ran across inflammatory reaction, fabrics of parodontium.

Отримано 08.12.11

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

**ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ
ПЕГІЛЬОВАНОЇ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ПРИ ПАРОДОНТИТІ**

Метою роботи було дослідити ефективність супероксиддисмутази, іммобілізованої на поліетиленгліколі, у формі апікацій на ясна при ліпополісахаридному запаленні тканин пародонта на фоні супутнього інсулінозалежного цукрового діабету. Дослідження проведено на білих щурах, яким у слизову оболонку ясен вводили ліпополісахарид. Цукровий діабет викликали стрептозотоцином. Корекцію проводили шляхом апікацій на ясна розчину пегільованої супероксиддисмутази. Ліпополісахаридний пародонтит на фоні цукрового діабету супроводжувався значним зростанням у тканинах пародонта і крові вмісту NO_x , ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих білків, пригніченням активності супероксиддисмутази, каталази, зниженням вмісту відновленого глутатіону, церулоплазміну і загальної антиоксидантної активності. Апікації на ясна пегільованої супероксиддисмутази значно зменшували явища оксидативного і нітрооксидативного стресу в пародонті й крові щурів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пародонтит, цукровий діабет, оксидативний та нітрооксидативний стрес, пегільована супероксиддисмутаза.

ВСТУП. За даними епідеміологічних досліджень, в останні роки спостерігається тенденція до зростання частоти захворювань пародонта серед населення різних регіонів світу. Поширеність пародонтиту в Україні становить 80 %, а в близько 100 % осіб віком понад 40 років виявляють патологічні зміни в тканинах ясен. Така висока поширеність пародонтитів, відсутність ефективних методів діагностики, профілактики та лікування, а також їх тісний взаємозв'язок із соматичною патологією загострюють актуальність цієї проблеми. Обширні дані підтверджують, що важливим фактором ризику запальних захворювань ротової порожнини є цукровий діабет [13–15]. Раніше нами було показано, що важливу роль у патогенезі викликаного ендотоксином грамнегативної мікрофлори пародонтиту, який розвивається на фоні інсулінозалежного цукрового діабету, відіграє оксидативний та нітрооксидативний стрес [3]. Тому для корекції доцільно застосовувати засоби, які були б здатні ефективно гальмувати реакції гіперпероксидації. Особливої уваги в цьому відношенні заслуговує фермент супероксиддисмутаза, яка здатна блокувати реакції вільнорадикального окиснення ще на стадії ініціації. Одним із шляхів підвищення ефективності лікарських препаратів білкової структури є хімічна модифікація їх молекули, що полягає у фізико-хімічній трансформації, яка досягається з'єднанням нативної молекули з поліетиленгліколем (ПЕГ). Даний процес з'єднання нативної

молекули лікарської форми з ПЕГ отримав назву "пегілювання". Подібна хімічна модифікація фармакологічних препаратів пептидної структури адресно направлена на поліпшення їх переносимості, зниження імуногенності, збільшення періоду їх напівжиття і, як наслідок, на значне підвищення якості проведеного лікування. Можна передбачити, що місцеве використання пегільованої форми супероксиддисмутази при пародонтиті мало б дати виражений позитивний ефект, проте даних про таку форму терапії запальних захворювань пародонта в літературі не виявлено.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті ефективність місцевого застосування пегільованої форми супероксиддисмутази (ПЕГ-СОД) у вигляді апікацій при ліпополісахаридному пародонтиті, що розвивався на фоні цукрового діабету.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 40 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Усіх тварин поділили на 5 груп: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – тварини, в яких викликали запалення тканин ясен (щоденно протягом 7 днів вводили в слизову оболонку ясен по 20 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду *E. Coli* (ЛПС)); 3-тя – щури, в яких викликали інсулінозалежний цукровий діабет шляхом одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотину в дозі 45 мг/кг; 4-та – тварини, в яких моделювали пародонтит і цукровий діабет;

5-та – щури з пародонтитом на фоні цукрового діабету, яким щодня протягом 7 днів проводили 10-хвилинну аплікацію на ясна пегільованої супероксиддисмутази (10 мг/мл). Для підтвердження цукрового діабету в крові щурів у динаміці визначали вміст глюкози за допомогою портативного глюкометра. На 8-му добу від початку введення ЛПС і на 31-шу добу з моменту введення стрептозотоцину щурів, рівень глюкози в яких був у межах 12–18 ммоль/л, декапітували під тіопенталовим наркозом. Після евтаназії щурів відокремлювали м'які тканини пародонта, з яких виготовляли гомогенати на 0,05 трис-буфері (pH=7,4). Усі маніпуляції з тканинами проводили на холоді. У гомогенаті тканин пародонта і крові визначали рівень нітратів та нітритів (NO_x) [10], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисно-модифікованих білків (ОМБ) [6], активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) [9] і каталази (КТ) [5] та вміст відновленого глутатіону (ГSH) [12]. У плазмі крові також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидантну активність (ЗАА) [11].

Експерименти проведено з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

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

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать дані, наведені в таблиці, ендотоксин грамнегативної мікрофлори ліпополісахарид викликав явища оксидативного і нітрооксидативного стресу в експериментальних тварин (вміст ТБК-активних продуктів як у плазмі крові, так і в тканині пародонта достовірно зріс, відповідно, в 1,2 і 1,4 раза; вміст у тканинах пародонта 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніпохідних нейтрального характеру), підвищився в 1,7 раза порівняно зі здоровими тваринами, а таких, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетоніпохідні основного характеру), зріс в 2,1 раза; рівень нітритів і нітратів у крові й тканинах пародонта збільшився в 1,4 раза). Ураження пародонта ЛПС також супроводжувалося порушеннями функціонального стану антиоксидантної системи (активність СОД зменшилася в тканинах ясен більше ніж в 1,5 раза, вміст ГSH знизився в 1,6 раза).

Особливо активізувалися вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта за умов, коли

токсична дія ліпополісахариду відбувалася на фоні цукрового діабету. В цієї групи тварин, порівняно з інтактними щурами, активність процесів ліпопероксидації зросла в 1,5 раза в крові та в 1,7 раза у тканинах пародонта. Концентрація модифікованих вільними радикалами білків під впливом ЛПС і стрептозотоцину підвищилася більше як у 3 рази в крові й понад 2,5 раза в яснах щурів. Вміст нітритів і нітратів у крові зріс в 1,6 раза, а в тканинах ясен – в 1,9 раза. Вміст ГSH і ЦП у плазмі крові зменшився в 1,4 раза, а загальна антиоксидантна активність плазми – більше ніж в 1,5 раза. Різко знизилась активність СОД (у 2,3 раза) і вміст ГSH у пародонті (в 1,8 раза).

Отже, можемо стверджувати, що оксидативний і нітрооксидативний стрес є тими фундаментальними механізмами, що відіграють провідну роль у патогенезі пародонтиту, викликаного ліпополісахаридом. До такого висновку дійшли й інші автори, які показали, що при пародонтиті відбуваються виражені порушення функціонального стану системи антиоксидантного захисту в біологічних рідинях ротової порожнини [4, 7]. Явища гіперактивності окиснювальних процесів у пародонті особливо посилюються, коли токсини грамнегативної мікрофлори діють на фоні інсулінозалежного цукрового діабету.

Зважаючи на вищенаведені факти, логічно припустити, що застосування середників, здатних гальмувати вільнорадикальні процеси, могло б бути патогенетично обґрунтованим і ефективним методом лікування пародонтитів. Одним із найпотужніших антиоксидантних ферментів в організмі є супероксиддисмутаза. З таблиці видно, що використання аплікацій пегільованої форми СОД протягом 7-ми днів призвело до достовірного (в 1,4 раза) зниження активності реакцій ліпопероксидації в пародонті порівняно з групою тварин з пародонтитом на фоні діабету, а також до пригнічення в 1,6–1,7 раза окисної модифікації білків у тканинах ясен. Дещо меншою мірою (в 1,3 раза) застосування ПЕГ-СОД викликало зменшення вмісту продуктів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у плазмі крові. Законірно, що під впливом проведеної корекції активність ендогенної СОД у тканинах пародонта підвищилася в 1,6 раза. Спостерігалось також деяке покращення інших показників антиоксидантної системи. Так, достовірно (в 1,4 раза) зросли вміст відновленого глутатіону й активність каталази у пародонті тварин 5-ї групи порівняно з відповідними показниками в щурів 4-ї групи. У плазмі крові під впливом ПЕГ-СОД також достовірно збільшувався вміст відновленого глутатіону.

Таблиця – Вплив місцевого застосування пегільованої супероксиддисмутази на вираження оксидативного і нітрооксидативного стресу при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні цукрового діабету ($M \pm m$; $n=8$)

Показник	Група тварин				
	Показник				
	контроль	ЛПС	стрептозо-тоцин	ЛПС+стреп-тозотоцин	ЛПС+стрептозо-тоцин+ПЕГ-СОД
Плазма крові					
NO _x , ммоль/л	2,64±0,12	3,60±0,15*	2,45±0,15	4,27±0,20**	3,59±0,14*§
ТБК-АП, мкмоль/л	46,78±2,24	56,90±2,45*	59,70±3,20*	72,39± 5,02**	55,06± 2,05§
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	0,80±0,05	0,88±0,06	1,80±0,12*	2,35± 0,18**	2,20± 0,15**
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,55±0,03	0,80±0,07*	1,30±0,09*	2,08±0,15**	1,56±0,10**§
КТ, мкат/л	0,47±0,02	0,60±0,03*	0,52±0,03	0,67±0,04*	0,58±0,04
ЦП, г/л	0,28±0,01	0,20±0,04	0,24±0,03	0,20±0,02*	0,25±0,01
GSH, ммоль/л	2,90±0,10	2,75±0,25	2,02±0,14*	2,12±0,17*	2,70±0,10§
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	54,30±3,12	45,30±2,10	47,35±3,18	35,32± 2,15**	42,20± 2,16*
Тканини пародонта					
NO _x , ммоль/кг	0,92±0,07	1,28±0,08*	0,98±0,06	1,74±0,11**	1,34±0,09*§
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,63±0,16	3,80±0,15*	2,81±0,25	4,54±0,21**	3,30±0,20§
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	3,70±0,22	6,35± 0,42*	4,10±0,35	9,40±0,50**	5,45±0,40*§
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	2,85±0,19	5,84±0,45*	2,95±0,18	8,35±0,62**	5,20±0,42*§
СОД, од.	0,23±0,01	0,15±0,01*	0,20±0,009	0,10±0,008**	0,16±0,009*§
КТ, мкат/мг білка	1,07±0,08	1,25±0,15	0,95±0,06	0,59±0,02**	0,85±0,06§
GSH, ммоль/кг	175,27±9,58	110,70±8,18*	150,20±8,50	97,73±5,18*	135,70±8,10*§

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контрольною групою тварин; # – зміни достовірні порівняно з групою тварин з пародонтитом; § – зміни достовірні порівняно з групою тварин з пародонтитом і цукровим діабетом.

При запальному процесі у тканинах ясен спостерігається постійний вміст високоактивної індукцибельної синтази оксиду азоту, що сприяє збільшенню синтезу NO в пародонті [8]. До активації індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) можуть призвести різні фактори, в тому числі й збільшення кількості вільних радикалів кисню в клітині. Очевидно, саме цим фактом можна пояснити отриманий нами ефект зниження загального вмісту нітритів і нітратів у пародонті й крові під впливом ПЕГ-СОД. СОД, перехоплюючи супероксиданіон-радикали, запобігає ініціації ланцюга ліпопероксидації, тим самим попереджуючи гіперактивацію iNOS і надмірну продукцію NO в тканинах пародонта. Таким чином, можемо стверджувати, що використання пегільованої СОД у формі апікацій на ясна щурів, яким

вводили ЛПС на фоні цукрового діабету, призводить до зменшення явищ нітрооксидативного стресу в тканинах пародонта.

ВИСНОВКИ. 1. Токсин грамнегативної мікрофлори ліпополісахарид викликає оксидативний і нітрооксидативний стрес у тканинах пародонта. Інтенсивність продукції радикалів кисню та азоту суттєво підвищується на фоні інсулінозалежного цукрового діабету.

2. Застосування апікацій пегільованої форми супероксиддисмутази на ясна призводить до часткової нормалізації ліпопероксидних процесів, реакцій утворення оксиду азоту і функціонального стану антиоксидної системи у тканинах пародонта тварин з ліпополісахаридним пародонтитом і цукровим діабетом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
3. Колодницька Г. Б. Перебіг ліпополісахаридного запалення ясен при інсулінозалежному цукровому діабеті / Г. Б. Колодницька, М. М. Корда // Мед. хімія. – 2011. – 13, № 3. – С. 91–96.

4. Косенко К. Н. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в ротовой жидкости больных генерализованным пародонтитом разных возрастных групп / К. Н. Косенко, Б. Б. Седлецкая, Т. П. Терешина // Вісн. стоматол. – 2004. – № 4. – С. 27–30.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
6. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові /

І. Ф. Мешишен // Буковинський мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.

7. Плотникова В. Г. Влияние лизоцимсодержащих препаратов на прооксидантно-антиоксидантный статус крыс при экспериментальном пародонтите / В. Г. Плотникова, О. А. Макаренко // Вісн. стоматол. – 2006. – № 2. – С. 20–25.

8. Чайковська І. В. Роль порушень метаболізму оксиду азоту в патогенезі генералізованого пародонтиту / І. В. Чайковська // Арх. клін. експерим. мед. – 2008. – 17(2). – С. 226–228.

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

10. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward [et al.] // Anal. Biochem. – 2000. – 281. – P. 223–229.

11. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – 47. – P. 215–222.

12. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Biochem. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.

13. Pathogenic aspects of the periodontal disease associated to diabetes mellitus / C. Alves, J. Andion, M. Brandao, R. Menezes // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. – 2007. – 51(7). – P. 1050–1057.

14. Relationship diabetes mellitus-periodontal disease: etiology and risk factors / L. Foia, V. Toma, D. Ungureanu [et al.] // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. – 2007. – 111(3). – P. 748–753.

15. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis / N. G. Chavarry, M. V. Vettore, C. Sansone, A. Sheiham // Oral. Health. Prev. Dent. – 2009. – 7(2). – P. 107–127.

Г. Б. Колодницкая, М. М. Корда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЕГИЛИРОВАННОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Резюме

Целью работы было исследовать эффективность пегилированной формы супероксиддисмутазы в форме аппликаций на десна при липополисахаридном воспалении тканей пародонта на фоне сопутствующего инсулинозависимого сахарного диабета. Исследование проведено на белых крысах, которым в слизистую оболочку десен вводили липополисахарид. Сахарный диабет вызывали стрептозотоцином. Коррекцию проводили путем аппликаций на десна раствора супероксиддисмутазы, иммобилизованной на полиэтиленгликоле. Липополисахаридный пародонтит на фоне сахарного диабета сопровождался значительным ростом в тканях пародонта и крови содержания NO_x , ТБК-активных продуктов и окислительномодифицированных белков, угнетением активности супероксиддисмутазы, каталазы, снижением содержания восстановленного глутатиона, церулоплазмينا и общей антиоксидантной активности. Аппликации на десна пегилированной супероксиддисмутазы значительно уменьшали явления оксидативного и нитрооксидативного стресса в пародонте и крови крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, сахарный диабет, оксидативный и нитрооксидативный стресс, пегилированная супероксиддисмутаза.

Н. В. Kolodnytska, M. M. Korda

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

PATHOGENETIC SUBSTANTIATION OF LOCAL ADMINISTRATION OF PEGYLATED SUPEROXIDE DISMUTASE AT PARODONTITIS

Summary

The aim of the study was to investigate the efficiency of superoxide dismutase, immobilized on polyethylene glycol, in the form of applications to gums in lipopolysaccharide inflammation of periodontal tissue with concomitant insulin dependent diabetes mellitus. Lipopolysaccharide was injected into the mucous of the gums of white rats. Diabetes was caused by streptozotocin. Correction was achieved by application of pegylated superoxide dismutase to the gums. Lipopolysaccharide parodontitis with concomitant diabetes was accompanied with significant increase of NO_x , TBA-active products and oxidation-modified proteins levels, inhibition of superoxide dismutase and catalase activities, decrease of the content of reduced glutathione, ceruloplasmin and total antioxidant activity in the periodontal tissues and blood. Applications to gums of the pegylated superoxide dismutase markedly reduced the oxidative and nitrooxidative stress in periodontium tissues and blood of rats.

KEY WORDS: parodontitis, diabetes, oxidative and nitrooxidative stress, pegylated superoxide dismutase.

Отримано 10.02.12

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

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИЧНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ КВЕРЦЕТИНУ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМУ ЗАСТОСУВАННІ
З МОДИФІКАТОРАМИ РОЗЧИННОСТІ**

У статті наведено результати вивчення фармакокінетичних властивостей кверцетину при його пероральному застосуванні у вигляді субстанції та комбінації з модифікатором розчинності пектином.

Результати дослідження свідчать про те, що при комбінуванні кверцетину з пектином посилюється гастроінтестинальна адсорбція даного флавоноїду, що зумовлює підвищення максимальної концентрації у 10 разів, а також показників відносної біодоступності у 10 разів порівняно з чистою субстанцією.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що застосування модифікаторів розчинності кверцетину в комбінованих пероральних лікарських формах значно покращує ФК-параметри цього флавоноїду, збільшуючи його біодоступність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кверцетин, пектин, фармакокінетика, біодоступність.

ВСТУП. Флавоноїди являють собою групу поліфенольних сполук, які володіють численними фармакологічними ефектами, такими, як протизапальний, гепатопротекторний, противиразковий, протиалергійний, противірусний. Важливими є і антиоксидантні властивості флавоноїдів [1, 9, 10, 14].

У зв'язку з великою кількістю захворювань, у лікуванні яких можлива реалізація терапевтичної дії кверцетину, необхідні розробка та впровадження в клінічну практику нових препаратів на його основі. Незважаючи на значний прогрес у створенні різних лікарських форм кверцетину, розробка нових препаратів на основі даного флавоноїду з поліпшеними фармакокінетичними властивостями залишається актуальним питанням. Внаслідок низької розчинності всмоктування кверцетину в незмінній формі у шлунково-кишковому тракті обмежене, однак саме пероральний шлях введення є найбільш зручним при проведенні тривалої терапії [6–8, 12, 13].

Актуальність дослідження визначається ще й тим, що доклінічне вивчення фармакокінетики та біотрансформації кверцетину є необхідним етапом на шляху впровадження нових препаратів у клінічну практику [5].

Продовжуючи пошук способів поліпшення всмоктування кверцетину з шлунково-кишкового тракту, на підприємстві ЗАТ НВЦ “Борща-

ківський хіміко-фармацевтичний завод” було розроблено препарат “Квертин”. Він являє собою кверцетин у вигляді таблеток для розжовування, у складі якого як модифікатор розчинності використано пектин. Приємні органолептичні властивості даної лікарської форми дозволяють зручно застосовувати препарат у будь-яких умовах, розжовуючи його без використання рідини для запивання.

Метою роботи стало порівняльне дослідження фармакокінетичних властивостей субстанції кверцетину та комбінації його з пектином.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вивчення фармакокінетичних параметрів кверцетину та комбінованої лікарської форми проводили на 8 безпородних кролях обох статей масою 2500–3000 г. Усі дослідження виконували за директивою Ради ЄС 86/609 ЄЕС від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [11].

Усіх кролів було поділено на 2 дослідні групи по 4 тварини у кожній: 1-ша група – кролі, які отримували перорально субстанцію кверцетину; 2-га група – кролі, які отримували перорально комбінацію кверцетину з пектином.

У дослідних групах тварин субстанцію кверцетину і його комбінацію з пектином застосо-

ували в дозі 10 мг/кг у перерахунку на чистий кверцетин. Досліджувані об'єкти вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда, одночасово у вигляді суспензій, які виготовляли з попереднім подрібненням речовин у ступці й використанням необхідної кількості фізіологічного розчину.

Відомо, що при пероральному застосуванні кверцетин всмоктується протягом першої години та утримується в плазмі до 8–12 год [2, 5, 8]. У зв'язку з цим, забір крові з вухної вени проводили через 0,25; 0,5; 1; 2; 4 та 8 год після введення препаратів, а також за 10 хв до введення кверцетину одночасно у всіх тварин. Після підготовки проб проводили визначення концентрації кверцетину та його основного метаболіту ізорамнетину в біофрагментах методом ультраефективної рідинної хроматографії з мас-селективним детектором. Загальну концентрацію кверцетину та ізорамнетину в плазмі крові відображали у перерахунку на чистий кверцетин і визначали за допомогою рівняння:

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

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

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

0,95567 – коефіцієнт перерахунку ізорамнетину в кверцетин.

За даними графіка “концентрація–час”, за допомогою загальноприйнятих розрахунків та комп'ютерних програм визначали такі фармакокінетичні параметри: максимальну концентрацію препарату (C_{max}), час її досягнення (T_{max}), період напіввиведення ($T_{1/2}$), площу під фармакокінетичною кривою в межах тривалості спостереження за концентрацією лікарської речовини (AUC_{0-8}) і від 0 до ∞ ($AUC_{0-\infty}$), константу елімінації (K_{el}).

Для оцінки ступеня впливу модифікатора розчинності пектину на біодоступність кверцетину з досліджуваної пероральної форми розраховували відносну біодоступність (F) за субстанцією кверцетину за допомогою рівняння:

$$F = AUC_{0-8}(A) / AUC_{0-8}(B) \cdot 100 \%,$$

де A – дослідна комбінація кверцетину з пектином;

B – субстанція кверцетину.

Як програмний інструментальний засіб застосовували ліцензійне програмне забезпечення: MassLynx® 4.0 – TargetLynx® (Waters®), Microsoft Office Excel® 2003, WinNonLin Professional 5.2 (Pharsight Corporation). Оцінку ФК-параметрів проведено з використанням моделі розрахунків “NCA Model 201” WinNonLin Professional 5.2.

Загальну статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента та непараметричних методів статистичного аналізу [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Внутрішньошлункове застосування кверцетину сприяло появі та коливанню концентрації діючої речовини в крові піддослідних тварин обох груп. У міру надходження кверцетину в системний кровообіг він піддавався активним метаболічним перетворенням в організмі кролів, про що свідчить визначення певного вмісту ряду метаболітів, переважно ізорамнетину.

Зміни концентрації кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у перерахунку на кверцетин залежно від часу наведено в таблиці 1.

З наведених даних видно, що при застосуванні субстанції кверцетину значущу концентрацію діючої речовини в плазмі крові більшості тварин цієї групи було зареєстровано через 0,25–2 год після введення. У всіх випадках концентрація кверцетину перевищувала вміст ізорамнетину в 2–3 рази, та зміни в концентраціях даних флавоноїдів у плазмі крові кролів були прямо пропорційними й мали однакову інтенсивність. В середньому по групі концентрація кверцетину та його метаболітів у плазмі крові тварин протягом 1 год після введення препарату утримувалась у межах 340–440 нг/мл.

Таблиця 1 – Середні значення вмісту кверцетину (Q) та ізорамнетину (Ir) у плазмі крові піддослідних тварин, нг/мл (n=8)

Об'єкт дослідження		Час забору крові, год						
		0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Кверцетин (субстанція)	Q	<25,0	324,3	279,3	257,8	176,9	121,1	104,3
	Ir	<25,0	122,8	103,4	92,2	85,1	66,8	36,6
	Сума	<25,0	441,7	378,1	345,9	258,3	184,9	139,3
Кверцетин з пектином	Q	84,1	3778,9	3238,0	2428,8	1783,7	1778,1	490,0
	Ir	6,9	946,3	1326,9	904,2	539,1	608,6	62,0
	Сума	90,7	4683,2	4506,1	3292,9	2298,8	2359,7	549,2

У тварин, які отримували перорально кверцетин з пектином, спостерігались значно вищі концентрації загального кверцетину та ізорамнетину в плазмі крові, ніж при використанні субстанції. У більшості кролів кверцетин всмоктувався інтенсивніше з утворенням максимальної концентрації вже через 15–30 хв після введення. При аналізі середніх значень було виявлено, що пікові концентрації кверцетину та його метаболітів утворювались у плазмі тварин протягом перших 15 хв, досягаючи при цьому значень 4700 нг/мл, і далі поступово зменшувались. Тобто порівняно з чистою субстанцією кверцетину спостерігалось значне підвищення всмоктування діючої речовини, але без пролонгації даного процесу.

За розрахунками середніх значень концентрації кверцетину було побудовано фармакокінетичні криві, що відображають залежність загального вмісту кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у сироватці крові піддослідних тварин від часу (рис.).

З графіків виходить, що фармакокінетична крива (ФК-крива) кверцетину при введенні саме чистої субстанції характеризується стрімким, але незначним, підвищенням концентрації. Максимальний вміст діючої речовини 441,7 нг/мл спостерігався вже через 15 хв від дозування. На стадії елімінації ФК-крива по-

казувала полого зниження концентрації кверцетину та його метаболітів без наявності виражених піків. При цьому концентрації діючої речовини у крові мали нижчі значення відносно препарату порівняння.

При порівняльному аналізі ФК-кривих спостерігалась суттєва зміна графіка при комбінуванні кверцетину з пектином. На стадії всмоктування відбувалось таке ж стрімке підвищення концентрації кверцетину та його метаболітів з досягненням піку протягом перших 15 хв після введення препарату. Завдяки поліпшенню всмоктування максимальна концентрація діючої речовини зросла до 4683,2 нг/мл, що значно перевищувало аналогічний показник іншої піддослідної групи. Протягом наступної години вміст флавоноїдів у крові доволі швидко знижувався, але в інтервалі часу від 2 до 4 год крива формувала чітко виражене "плато" на рівні 2300–2400 нг/мл. Надалі ФК-крива поволи знижувалась.

Відповідні фармакокінетичні параметри, розраховані за даними ФК-кривих, наведено в таблиці 2.

При порівнянні фармакокінетичних параметрів особливого значення заслуговують показники площі під кривою $AUC_{0-\infty}$ та AUC_{0-8} , оскільки вони відображають кількість діючої речовини, що досягла системного кровообігу тварини взагалі та за досліджуваний період

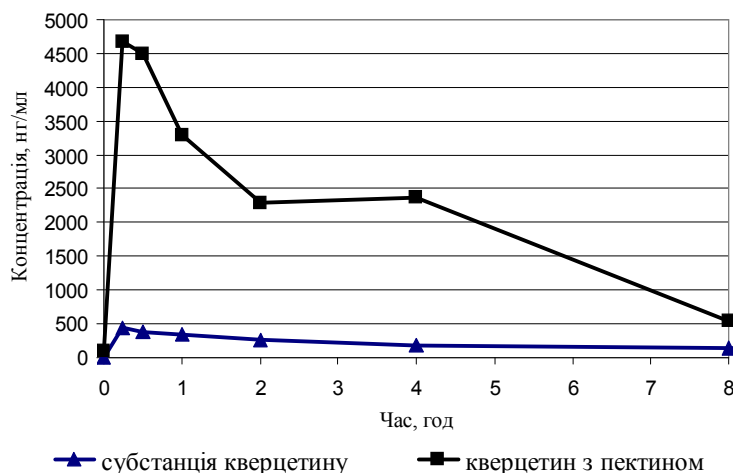


Рис. Графіки залежності середніх значень суми концентрацій кверцетину та ізорамнетину в плазмі крові кролів від часу.

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

Об'єкт дослідження	C_{max} , нг/мл	T_{max} , год	AUC_{0-8} , год·нг/мл	$AUC_{0-\infty}$, год·нг/мл	AUC_{0-t} , %	K_{el} , год ⁻¹	$T_{1/2}$, год	F, %
Кверцетин (субстанція)	441,7	0,25	1731,8	2694,4	64,3	0,14	4,8	100,0
Кверцетин з пектином	4683,2	0,25	16968,1	19092,0	88,8	0,26	2,7	978,0

часу. Показник AUC_{0-8} при застосуванні кверцетину з пектином досягав 16 968,1 нг·год/мл, а значення $AUC_{0-\infty}$ – 19092,0 нг·год/мл, що в 10 та 7 разів відповідно перевищувало рівень даного показника у кролів, які отримували чисту субстанцію кверцетину, та непрямо свідчило про значне збільшення біодоступності флавоноїду.

Розрахунок процентного співвідношення двох показників площі під ФК-кривою виявив, що при комбінуванні з пектином діюча речовина затримувалась в організмі тварин менше (88,9 %), ніж чиста субстанція кверцетину (64,3 %).

Підтвердженням даного факту можна вважати значення показників коефіцієнтів елімінації, що свідчать про інтенсивність виведення кверцетину з організму тварин. Так, значення K_{el} при введенні кверцетину з пектином знижувалось, порівняно із субстанцією, в 1,6 раза (0,26 та 0,14 год⁻¹ відповідно).

У кореляції з показниками K_{el} перебували результати розрахунків періоду напіввиведення ($T_{1/2}$). При пероральному застосуванні флавоноїду у вигляді чистої субстанції показник $T_{1/2}$ дорівнював 4,8 год. У разі комбінування кверцетину з модифікатором розчинності пектином період напіввиведення зменшувався в 1,8 (2,7 год) раза порівняно з чистою субстанцією.

Для наглядного розуміння поліпшення всмоктування кверцетину за допомогою пектину було розраховано показник відносної біодоступності за субстанцією кверцетину (F, %). Показник F при застосуванні пектину як мо-

дифікатора розчинності кверцетину перевищив рівень субстанції у 10 разів (978,0 %). Це дозволяє зробити висновок, що при поєднанні кверцетину з пектином значно більша доза флавоноїду досягає системного кровообігу тварин, ніж при використанні чистої субстанції.

Таким чином, застосування пектину як модифікатора розчинності кверцетину в комбінованих пероральних лікарських формах сприяє поліпшенню всмоктування даного флавоноїду зі шлунково-кишкового тракту, збільшуючи його біодоступність. Це буде зумовлювати не тільки спрощення використання кверцетину, а й підвищення його терапевтичної ефективності.

ВИСНОВКИ. 1. При пероральному застосуванні у кролів чиста субстанція кверцетину повільно всмоктується та піддається процесам біотрансформації з утворенням активних метаболітів, переважно ізорамнетину. Концентрація кверцетину перевищує вміст ізорамнетину в середньому в 2,0–3,0 рази при прямо пропорційній зміні з часом.

2. При комбінуванні кверцетину з пектином посилюється гастроінтестинальна адсорбція даного флавоноїду, що зумовлює підвищення максимальної концентрації в 11 разів, а також показника відносної біодоступності у 10 разів порівняно з чистою субстанцією.

3. Комбінування кверцетину з модифікатором розчинності пектином у лікарській формі для перорального застосування дозволяє значно покращити розчинні властивості даного флавоноїду та скоректувати його ФК-параметри відповідно до терапевтичної мети.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Компендиум 2008 – лекарственные препараты : в 2 т. / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Морион, 2008. – 2270 с.
3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К. : Морион, 2000. – 320 с.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – 3-е изд. – М. : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ОАО Медицина, 2005. – 832 с.
6. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig / P. Ader, A. Wessmann, S. Wolfram [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – **28**. – P. 1056–1067.
7. Bioavailability and Metabolic Pharmacokinetics of Rutin and Quercetin in Rats / Y. Chi-Yu, H. Su-Lan, W. Kuo-Ching [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2005. – **13**. – P. 244–250.
8. Chow Pharmacokinetics and Modeling of Quercetin and Metabolites / Ch. Xiao, Q. P. Ophelia, Zh. Z. Yin, S. S. Moses // Pharmaceutical Research. – 2005. – **22**, № 6. – P. 892–901.
9. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats / A. I. Morales, C. Vicente-Sanchez, M. Jerkic [et al.] // Toxicology And Applied Pharmacology. – 2006. – **210**, № 1–2. – P. 128–135.

10. Effects of chronic quercetin treatment on anti-oxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats / M. Galisteo, M. F. Garcia-Saura, R. Jimenez [et al.] // Molecular And Cellular Biochemistry. – 2004. – **259**, № 1–2. – P. 91–99.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.

12. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides

in human plasma / E. J. Oliveira, D. G. Watson, M. H. Grant [et al.] // Xenobiotica. – 2002. – **32**. – P. 279–287.

13. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans / E. U. Graefe, H. Derendorf, M. Veit [et al.] // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 1999. – **37**. – P. 219–233.

14. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats / P. S. Satyanarayana, D. Singh, K. Chopra [et al.] // Methods And Findings In Experimental And Clinical Pharmacology. – 2001. – **23**, № 4. – P. 175–181.

В. Ф. Усенко, И. А. Зупанец, О. А. Тарасенко, С. К. Шебеко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КВЕРЦЕТИНА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ С МОДИФИКАТОРАМИ РАСТВОРИМОСТИ

Резюме

В статье приведены результаты изучения фармакокинетических свойств кверцетина при его пероральном применении в виде субстанции и комбинации с модификатором растворимости пектином.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что при комбинировании кверцетина с пектином усиливается гастроинтестинальная адсорбция данного флавоноида, что обуславливает повышение максимальной концентрации в 11 раз, а также показателей относительной биодоступности в 10 раз по сравнению с чистой субстанцией.

Полученные данные позволяют заключить, что применение модификаторов растворимости кверцетина в комбинированных пероральных лекарственных формах значительно улучшает ФК-параметры этого флавоноида, увеличивая его биодоступность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кверцетин, пектин, фармакокинетика, биодоступность.

V. F. Usenko, I. A. Zupanets, O. O. Tarasenko, S. K. Shebeko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

EXPERIMENTAL STUDY OF PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF QUERCETIN AT ORAL APPLICATION WITH MODIFIERS OF SOLUBILITY

Summary

The article presents the results of a study of pharmacokinetic properties of quercetin in its oral administration in the form of a substance and a combination of modifier solubility of pectin.

The findings suggest that quercetin combined with pectin increased gastrointestinal adsorption of flavonoid, which causes increase in the maximum concentration in 11 times, as well as indicators of relative bioavailability in 10 times compared to pure substance.

The data obtained suggest that the use of modifier solubility of quercetin in combined oral formulations greatly improves the PhC parameters of this flavonoid, increasing its bioavailability.

KEY WORDS: quercetin, pectin, pharmacokinetics, bioavailability.

Отримано 30.06.11

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

І. П. Банний¹, Н. І. Банна¹, О. С. Криськів¹, В. М. Савченко²
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА²

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ КАРБОКСИМЕТИЛАМІДІВ R-БЕНЗОЛСУЛЬФОГІДРАЗИДІВ ЩАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ

З метою пошуку речовин з діуретичною, протизапальною та анальгетичною активністю здійснено синтез нової групи хімічних сполук – карбоксиметиламідів R-бензолсульфогідразидів щавлевої кислоти. Структуру синтезованих сполук доведено методами елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії. Фармакологічні дослідження показали, що більшість сполук проявляє діуретичну, протизапальну та анальгетичну активність при низькій токсичності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карбоксиметиламиди R-бензолсульфогідразидів щавлевої кислоти, фармакологічна активність, токсичність.

ВСТУП. Велика кількість препаратів діуретичної, анальгетичної та протизапальної дій, які використовують у сучасній медичній практиці, мають небажані побічні ефекти [5, 8]. Серед заміщених амідів аренсульфоніл-оксамінової та аренсульфогідразидів щавлевої кислот виявлено речовини з різноманітною біологічною активністю [6, 7]. Ацильні похідні амінокислот також мають різнобічну активність [1]. Цікавим було поєднати в одній молекулі фрагменти зазначених вище структур і вивчити біологічну активність синтезованих сполук.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. УФ-спектри синтезованих сполук зареєстровано на приладі SPECORD 200 (фірма "Analytikjena") в етанолі. ІЧ-спектри виміряно на спектрофотометрі TENSOR 27 (фірма "Bruker") у таблетках калію броміду (концентрація речовини – 0,5 %). Спектри ПМР записано у DMSO-D₆ на спектрометрі Varian Mercury VX-200, внутрішній стандарт – TMS.

Карбоксиметиламід 2-метилбензолсульфогідразиду щавлевої кислоти (IIIa, табл. 1).

До розчину 1,12 г (0,02 моль) калію гідроксиду в 10 мл метанолу додають 1,5 г (0,02 моль) амінооцтової кислоти. Одержаний розчин додають до розчину 2,86 г (0,01 моль) етилового естеру 2-метилбензолсульфогідразиду щавлевої кислоти у 10 мл діоксану та залишають стояти до зникнення лужного сере-

довища. Осад, що випав, відфільтровують, розчиняють у 10 мл води. Розчин підкислюють HCl (1:1) до pH 3. Осад, що випав, відфільтровують, сушать і кристалізують з пропанолу-2. Т. пл. – 254–256 °С. Вихід – 2,46 г.

Аналогічно одержують сполуки IIIб-ж.

Гостру токсичність синтезованих сполук вивчали при внутрішньошлунковому їх введенні білим мишам [4]. Середні смертельні дози (ЛД₅₀) визначали методом Кьорбера [3].

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

Протизапальну активність нових сполук вивчали на моделі гістамінового набряку [4]. Досліди проводили на білих безпородних щурах обох статей масою 210–220 г (табл. 3).

Анальгетичну активність досліджували на моделі "ацетатних судом" у дослідах на білих щурах масою 210–220 г [4] (табл. 3).

Увесь експериментальний матеріал було оброблено методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стюдента [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як реагенти для синтезу карбоксиметиламідів R-бензолсульфогідразидів щавлевої кислоти IIIa-ж було використано аренсульфогідразиди (I, схема).

Етилові естери аренсульфогідразидів щавлевої кислоти II одержано за реакцією ацилювання аренсульфогідразидів I етоксалілхлоридом у піридині при зниженій температурі.

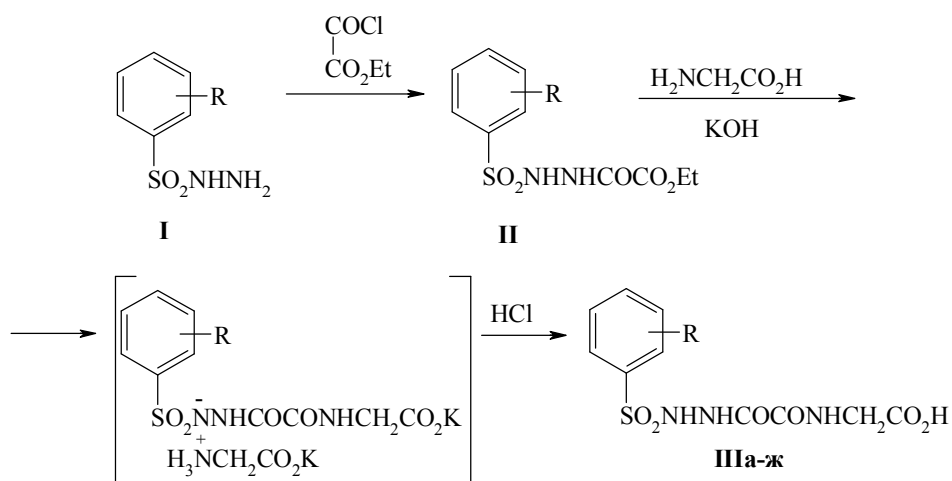


Схема.

Значення R наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Характеристики карбоксиметиламідів R-бензолсульфогідразидів щавлевої кислоти

Сполука	R	Вихід, %	Т. пл. *, °C	Знайдено, %		Брутто-формула	Вирахувано, %		R _f **
				N	S		N	S	
IIIa	2-CH ₃	78	254–256	13,51	10,22	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₆ S	13,33	10,17	0,72
б	3-CH ₃	66	246–248	13,48	10,28	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₆ S	13,33	10,17	0,54
в	2-NO ₂	70	230–232	16,26	9,42	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₈ S	16,18	9,26	0,62
г	3-NO ₂	77	250–252	16,32	9,32	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₈ S	16,18	9,26	0,48
д	2-Br	69	234–236	11,24	8,55	C ₁₀ H ₁₀ BrN ₂ O ₆ S	11,05	8,43	0,52
е	3-Br	72	227–229	11,18	8,52	C ₁₀ H ₁₀ BrN ₂ O ₆ S	11,05	8,43	0,68
ж	3-CO ₂ Et	64	216–218	11,37	9,14	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₈ S	11,25	8,59	0,46

Примітка. * – кристалізують з пропанолу-2; ** – константи R_f визначено методом ТШХ у системі розчинників: бутанол–оцтова кислота–вода (35:16:4) на пластинках “Silufol UV-254”, проявлення парами йоду.

Карбоксиметилами́ди аренсульфогідразидів щавлевої кислоти IIIa-ж отримано за реакцією амідування естерів II амінооцтовою кислотою у присутності калію гідроксиду за кімнатної температури, з наступним підкисленням реакційної маси.

Сполуки IIIa-ж (табл. 1) – безбарвні кристалічні речовини, легкокорозивні у водних лугах, а при нагріванні – у ДМФА, спирті, діоксані.

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

В УФ-спектрах найбільш інтенсивним є поглинання основного структурного фрагмента молекули, що містить бензольний цикл. УФ-спектри синтезованих сполук мають одну смугу поглинання при значеннях λ 203–218 нм, ϵ 6214–10 124 л·см⁻¹·моль⁻¹.

В ІЧ-спектрах сполук IIIa-ж (табл. 2) виявлено смуги поглинання у ділянці 1695–1685 см⁻¹, які відповідають валентним коливанням карбонільної групи (I амідна смуга). Смуги поглинання у ділянці 1585–1530 см⁻¹ належать до деформаційних коливань NH-групи (II амідна

смуга), а при 3372–3315 та 3292–2992 см⁻¹ – до валентних коливань NH-групи. Валентні коливання у ділянці 3168–2972 см⁻¹ відповідають гідроксильній групі. В ІЧ-спектрах сполук також присутній дублет смуги асиметричних (1375–1360 см⁻¹) та симетричних (1172–1160 см⁻¹) коливань SO₂-групи. Валентні коливання зв'язків C–Br спостерігаються при 542–538 см⁻¹.

У ПМР-спектрах сполук IIIa-ж (табл. 2) присутня група сигналів при 7,90–7,42 м.ч., яка відповідає протонам ароматичної системи. Дублет сигналів метиленової групи спостерігається при 3,83–3,76 м.ч. У слабкому полі з хімічним зсувом 10,92–10,64, 10,12–9,84 та 9,72–8,68 м.ч. перебувають сигнали NH-груп, а в більш слабкому полі з хімічним зсувом 12,02–11,80 м.ч. виявляють протони карбоксильної групи у вигляді широкого синглету.

У результаті проведених досліджень встановлено, що гостра токсичність групи сполук, які вивчали, перебувала у діапазоні 1985–2610 мг/кг (табл. 3). Найменш токсичним виявився карбоксиметиламід 3-нітробензолсульфогідразиду щавлевої кислоти IIIг, ЛД₅₀ якого становить 2610 мг/кг. Найтоксичнішою

Таблиця 2 – ІЧ- та ПМР-спектри карбоксиметиламідів R-бензолсульфогідрозидів щавлевої кислоти

Сполука	ІЧ-спектр, см ⁻¹		ПМР-спектр, δ, м.ч.				
	νC=O (амід І)	νSO ₂	H аром.	NH	-CH ₂ -	-OH	Інші протони
IIIa	1687	1361, 1175	7,44 (2H, д) 7,82 (2H, д)	10,72; 9,84; 8,76	3,82 (2H, д)	11,84	2,35 (3H, д, CH ₃)
б	1695	1359, 1177	7,44 (3H, д) 7,90 (1H, д)	10,92; 10,00; 9,05	3,83 (2H, д)	11,90	2,34 (3H, д, CH ₃)
в	1691	1357, 1173	7,46 (2H, д) 7,84 (2H, д)	10,86; 10,12; 8,75	3,78 (2H, д)	11,80	–
г	1687	1362, 1175	7,46 (3H, д) 7,88 (1H, д)	10,64; 10,06; 8,68	3,82 (2H, д)	12,02	–
д	1685	1357, 1175	7,44 (2H, д) 7,82 (2H, д)	10,66; 10,02; 9,72	3,76 (2H, д)	11,90	–
е	1692	1361, 1177	7,48 (3H, д) 7,88 (1H, д)	10,70; 9,89; 8,74	3,78 (2H, д)	11,86	–
ж	1695	1360, 1177	7,42 (3H, д) 7,90 (1H, д)	10,72; 9,88; 8,74	3,82 (2H, д)	11,80	1,30 (3H, т, CH ₂ CH ₃) 4,24 (2H, к, CH ₂ CH ₃)

Таблиця 3 – Діуретична, протизапальна, анальгетична активність та гостра токсичність карбоксиметиламідів R-бензолсульфогідрозидів щавлевої кислоти

Сполука	Активність				ЛД ₅₀ , мг/кг
	діуретична, % у дозі 0,01 ЛД ₅₀		протизапальна, % у дозі 10 мг/кг	анальгетична, % у дозі 50 мг/кг	
	через 2 год	через 4 год			
IIIa	127,8	148,9	49,4	38,6	2155
б	132,2	150,6	50,6	48,2	2270
в	128,1	134,6	18,8	19,2	2050
г	105,8	110,7	52,5	50,6	2610
д	195,8	210,3	12,4	10,7	1985
е	159,4	176,6	5,8	8,6	2140
ж	105,7	114,2	49,7	38,9	2320
Гіпотіазид	158,6	167,6			
Фуросемід	320,3	404,2			
Адіурекрин	55,2	57,4			
Анальгін			50,4	47,8	
Диклофенак			55,6	52,1	

була сполука IIIд, яка містить у положенні 2 бензольного кільця атом бром, ЛД₅₀ її становить 1985 мг/кг.

Аналіз результатів вивчення діуретичної активності показав, що всі синтезовані сполуки за умов водного навантаження викликали збільшення видільної функції нирок у середньому на 10,7–110,3 % (табл. 3). Виражену діуретичну активність, яка перевищувала дію гіпотіазиду, проявляли сполуки, що містять у бензольному циклі в положеннях 2 і 3 атоми бром (IIIд та IIIе). Вказані сполуки за 2 год збільшували діурез у середньому на 98,5 та 59,4 % відповідно, а за 4 год – на 110,3 та 76,6 % відповідно. Заміна вказаних радикалів на інші зменшує діуретичний ефект.

Дослідження показали, що більшість досліджених сполук зменшувала розвиток експериментального набряку в середньому на 5,8–

52,6 % (табл. 3). Найбільш виражений антиексудативний ефект виявлено у сполук IIIг та IIIб, які містять у положенні 3 бензольного ядра групу NO₂ або CH₃ відповідно. Вказані сполуки пригнічували розвиток набряку на 52,6 та 50,6 % відповідно, що практично дорівнює дії анальгину та не досягає дії диклофенаку. Заміна вказаних радикалів на інші зменшує антиексудативний ефект.

Більшість вивчених сполук (табл. 3) проявляє анальгетичну активність на рівні 8,6–50,6 %. Найактивнішими були сполуки IIIг та IIIб, які містять у положенні 3 бензольного ядра групу NO₂ або CH₃ відповідно. Вказані сполуки зменшували больову чутливість на хімічний подразник на 50,6 та 48,2 %, що практично дорівнює дії анальгину. Заміна вказаних радикалів на інші призводить до зниження активності.

ВИСНОВКИ. 1. Синтезовано нову групу хімічних сполук – карбоксиметилами́ди R-бензолсульфогідразидів щавлевої кислоти, структуру яких підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектрів.

2. У результаті фармакологічного скринінгу виявлено речовини, які діють на рівні препаратів порівняння або їх перевищують.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Альрахабі Х. Синтез та біологічна активність аренсульфонілоксамойл- та аренсульфогідразидоксаліламінокислот та їх солей з 2-етокси-6,9-діаміноакридином / Х. Альрахабі, Г. П. Петюнін, І. Л. Дикий // Фармац. журн. – 2008. – № 5. – С. 62–67.

2. Бельський М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Бельский – 2-е изд. – Л. : Медицина, 1963. – С. 99–107.

3. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – М. : Медицина, 1977. – 131 с.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

5. Машковский М. Д. Лекарственные средства : в 2 т. / М. Д. Машковский. – 14-е изд. – М. : Новая волна, 2003. – Т. 1. – 540 с., Т. 2. – 608 с.

6. Синтез и биологическая активность 4-(N-Р-оксамидосульфонил)-бензолметилоксаминовых кислот / И. П. Банний, Б. А. Самура, В. Е. Литаров [и др.] // Фізіологічно активні речовини. – 1999. – № 2 (28). – С. 47–49.

7. Синтез і біологічна активність гідразиду та ацилгідразидів 4-сульфамілбензілоксамінової кислоти / І. П. Банний, В. П. Черних, Б. А. Самура [та ін.] // Вісник фармації. – 2001. – № 4 (28). – С. 9–12.

8. Чекман И. С. Осложнения фармакотерапии / И. С. Чекман. – К. : Здоров'я, 1980. – 236 с.

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

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ КАРБОКСИМЕТИЛАМИДОВ R-БЕНЗОЛСУЛЬФОГИДРАЗИДОВ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

С целью поиска веществ с диуретической, противовоспалительной и анальгетической активностью осуществлен синтез новой группы химических соединений – карбоксиметилами́дов R-бензолсульфогидразидов щавелевой кислоты. Структура синтезированных соединений доказана методами элементного анализа, УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии. Фармакологические исследования показали, что большинство соединений проявляет диуретическую, противовоспалительную и анальгетическую активность при низкой токсичности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбоксиметилами́ды R-бензолсульфогидразидов щавелевой кислоты, фармакологическая активность, токсичность.

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

SYNTHESIS, PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITY OF THE CARBOXYMETHYLAMIDES R-PHENYLSULFOHYDRAZIDES OF OXALIC ACID

Summary

With the purpose of search of substances with diuretic, anti-inflammatory and analgesic activity the synthesis of a new group of chemical compounds carboxymethylamides R-phenylsulfohydrazides of oxalic acid was carried out. The structure of synthesized compounds was proved by methods of elemental analysis, UV-, IR and NMR-spectroscopy. The pharmacologic researches showed that the majority of compounds synthesized displays diuretic, anti-inflammatory and analgesic activity when the toxicity is low.

KEY WORDS: carboxymethylamides R-phenylsulfohydrazides of oxalic acid, pharmacological activity, toxicity.

Отримано 04.07.11

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

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ НА БІЛКОВИЙ ОБМІН У СИСТЕМІ КРОВІ ЗА УМОВ ДОКСОРУБІЦИНОВОЇ ГІПОПРОТЕЇНЕМІЇ

Наведено результати дослідження з визначення впливу екстракту з трави люцерни посівної (ЕТЛП) на білковий обмін у системі крові за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії. Установлено, що ЕТЛП у дозі 25 мг/кг підвищує відносно контрольної патології на 24 % вміст загального білка в сироватці крові, на 21 % – кількість альбумінів, на 18 % – кількість глобулінів, на 55 % – кількість високомолекулярних білків та знижує на 70 % кількість низькомолекулярних білків у плазмі крові. Ці дані свідчать про те, що ЕТЛП за рахунок вмісту в своєму складі білка та амінокислот здатний не тільки відновлювати, але й стимулювати білковий обмін у системі крові та відновлювати життєзабезпечувальні функції крові.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: білковий обмін, білки крові, екстракт з трави люцерни посівної, доксорубіцинова гіпопротеїнемія, корекція білкового обміну, індукція синтезу білка.

ВСТУП. Кров є рідкою тканиною організму людини і тварин, яка забезпечує зв'язок та інтеграцію обміну речовин, у тому числі й білкового обміну, різних органів і тканин. Основну масу розчинних речовин крові утворюють білки. Плазма крові містить складну суміш декількох сотень різних білків, що мають різноманітні фізико-хімічні властивості, молекулярну масу та функціональні властивості: транспортні білки, ферменти, проферменти, інгібітори ферментів, гормони, антитіла, антитоксини, фактори коагуляції та антикоагулянти тощо. Загальна концентрація білків плазми крові в нормі складає 60–85 г/л. Із них на альбуміни припадає 40–50 г/л, на глобуліни – 20–30 г/л. Альбуміни та глобуліни належать до глобулярних білків і відрізняються між собою за молекулярною масою, розчинністю та функціями. Молекулярна маса альбумінів складає 15–70 кДа, глобулінів – перевищує 150 кДа. Альбуміни на 80 % забезпечують колоїдно-осмотичний тиск крові та є транспортною системою багатьох гідрофобних речовин – вони можуть приєднувати і транспортувати жирні кислоти, холестерин, жовчні пігменти, вітаміни, гормони, деякі амінокислоти, фенол та інші токсичні й лікарські сполуки. Глобуліни – гетерогенна фракція білків крові, яка містить α_1 -глобуліни: здійснюють транспорт ліпідів, тироксину, кортикостероїдних гормонів;

α_2 -глобуліни: здійснюють транспорт ліпідів, іонів міді, заліза; β -глобуліни: здійснюють транспорт ліпідів, вільного та гемового заліза, беруть участь в імунних реакціях як антитоксини; γ -глобуліни: фракція імунoglobulinів IgA, IgG, IgE, IgM, що виконують функцію антитіл, основних ефektorів гуморального імунітету. Також плазма містить фракції білків, які забезпечують гемостаз: фібриноген, протромбін [7].

Отже, вищевикладене свідчить про життєво важливу роль білкового обміну крові для підтримки гомеостазу та життя взагалі. Але під час різноманітних станів організму можливі зміни вмісту загального білка в крові та складу його фракцій у бік зменшення, тобто розвиток гіпопротеїнемії. Гіпопротеїнемія може виникати внаслідок активації процесів старіння, пригнічення білкового синтезу та активації розпаду тканинних білків: голодування, виснажливих інфекційних захворювань, захворювань печінки, нирок, міокарда тощо.

Для фармакокорекції таких станів у комплексі необхідно використовувати лікарські засоби-коректори білкового обміну, що сприятимуть відновленню рівня білка в організмі, зокрема в системі крові. Таким засобом може стати препарат, створений на основі екстракту з трави люцерни посівної (ЕТЛП) (*Medicago sativa*) з роду бобових (*Fabaceae*), який містить білки, 17 амінокислот, у тому числі 8 незамінних, 8 ферментів, що розщеплюють білки та

© Р. Ф. Єрмоєнко, 2012.

сприяють їх засвоєнню, зокрема бетаїн; дубильні речовини, сапоніни, кумарини, фітоестрогени, вітаміни A, D, B₁, B₁₂, C, E, K; мікро- та макроелементи Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, K, Si, Na, F; хлорофіл; ізофлавоноїди геністеїн, дайдзеїн, куместрол; флавоноїди апігенін, лютеолін, кверцетин, рутин та ін.; органічні кислоти (кофейну, галову, ферулову, метоксикумарову, уронову); алкалоїди; аспарагін; антоціани; карбогідрати; моноцукри та полісахариди; пігменти; крохмаль [2].

Наявність у складі ЕТЛП великої кількості білка, амінокислот, у тому числі незамінних, забезпечує його здатність індукувати синтез білка в організмі здорових тварин [3], що, разом з органопротекторними властивостями, зможе сприяти відновленню нормальної концентрації білків та функцій крові, які ці білки забезпечують, загальній стабілізації білкового обміну в системі крові за умов експериментальної гіпопротеїнемії.

Метою даного дослідження було експериментальне визначення впливу екстракту з трави люцерни посівної на білковий обмін у системі крові за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Відома здатність доксорубіцину порушувати пластичні процеси в організмі, що призводить до пригнічення синтетичних процесів, зокрема білка, порушення білкового обміну, що супроводжується утворенням токсичних продуктів розпаду білка та гіпопротеїнемією, яка загрожує життю [1]. Однією з перших на це повинна реагувати кров – рідка тканина організму людини і тварин, що забезпечує зв'язок та інтеграцію обміну речовин різних органів і тканин. Для перевірки цього ми в щурів груп контрольної патології (КП) та дослідної (ЕТЛП, 25 мг/кг) моделювали гіпопротеїнемію шляхом внутрішньочеревного введення доксорубіцину в дозі 4 мг/кг один раз на добу за такою схемою: 1, 2, 4 та 6 доби досліді. Тваринам дослідної групи у превентивно-лікувальному режимі щоденно протягом 2-х тижнів до та одного тижня після маніфестації гіпопротеїнемії вводили внутрішньошлунково ЕТЛП у дозі 25 мг/кг. Після

закінчення експерименту проводили евтаназію щурів трьох груп по 8 тварин у групі: інтактного контролю (ІК) (1), контрольної патології (2) та дослідної, яка отримувала ЕТЛП (3) відповідно до норм та правил біоетики. Щурів декапітували під ефірним наркозом та забирали кров для отримання сироватки і плазми крові. В сироватці крові визначали рівень загального білка в організмі тварин усіх груп, а плазму використовували для хроматографічного дослідження з метою визначення білкового складу для оцінки білкового обміну в системі крові.

Взагалі експеримент виконували відповідно до вимог комісії з біоетики НФаУ та Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Київ, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [1].

Концентрацію білкових фракцій з молекулярною масою від 5 до 750 кДа в плазмі крові щурів визначали на базі лабораторії клінічної біохімії Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків) методом гель-хроматографії з використанням хроматографічної колонки 1x27 см із сефадексом G-200 та спектрофотометра "Pye Unicam SP8000" (Англія) [5, 6, 8].

Отримані експериментальні дані статистично обробляли методом варіаційної статистики. Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм "Statistica 6,0" [4].

Результати експерименту наведено в таблицях 1 та 2.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що доксорубіцин викликав розвиток вираженої гіпопротеїнемії в групі тварин КП, на що вказують достовірне відносно групи ІК зниження на 31,2 % рівня загального білка в сироватці крові (табл. 1) та суттєві зміни білкових фракцій, а саме зменшення відносно ІК на 22 % кількості білків альбумінової фракції, на 14 % – кількості білків глобулінової фракції, на 41 % –

Таблиця 1 – Вплив екстракту з трави люцерни посівної на рівень загального білка в сироватці крові щурів з доксорубіциновою гіпопротеїнемією

Показник	Умови досліді		
	інтактний контроль	контрольна патологія	КП+ЕТЛП, 25 мг/кг
Загальний білок, г/л	83,11±4,77	57,21±2,10*	74,91±1,87**

Примітка. * – відхилення показника достовірне щодо інтактного контролю, $p \leq 0,05$; ** – відхилення показника достовірне щодо контрольної патології, $p \leq 0,05$.

Таблиця 2 – Вплив екстракту з трави люцерни посівної на білковий обмін у системі крові за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії

Вид білкової фракції	Розмір білків, кДа	Концентрація білків, %		
		інтактний контроль	контрольна патологія	КП+ЕТЛП, 25 мг/кг
Низькомолекулярні білки	5	1,11	2,57	0,7
	12	3,33	5,37	1,7
Альбумінова фракція	30	11,06	8,72	9,26
	65	12,51	9,69	14,08
Глобулінова фракція	230	7,97	6,89	8,44
Високомолекулярна фракція	500	5,08	3,31	6,24
	750	3,25	1,59	4,64

кількості білків високомолекулярної фракції, що свідчить про деструктивні процеси в організмі та розпад білкових молекул з утворенням низькомолекулярних фрагментів, що проявилось зростанням відносно ІК на 44 % кількості білків низькомолекулярної фракції (табл. 2).

Застосування при доксорубіцинової гіпопротеїнемії в превентивно-лікувальному режимі ЕТЛП у дозі 25 мг/кг за рахунок стимуляції білоксинтетичних процесів привело до нормалізації білкового обміну в системі крові, про що свідчать достовірне відносно групи КП зростання на 24 % вмісту загального білка в сироватці крові (табл. 1) та, відповідно, зміни в концентрації фракційних білків у плазмі крові (табл. 2). Так, під впливом ЕТЛП у дозі 25 мг/кг зростала на 21 % відносно групи КП кількість білків альбумінової фракції, а кількість білків глобулінової фракції збільшувалась, порівняно з групою КП, на 18 %, порівняно з групою ІК – на 6 % (табл. 2). Найбільше зростала кількість білків високомолекулярної фракції: порівняно з групою КП – на 55 %, порівняно з групою ІК – на 23 % (табл. 2). Кількість білків низькомолекулярної фракції значно зменшувалась:

відносно групи КП – на 70 %, групи ІК – на 46 % (табл. 2). Ці дані свідчать про те, що ЕТЛП за рахунок вмісту в своєму складі білка та амінокислот здатний не тільки відновлювати, але й стимулювати білковий обмін у системі крові та відновлювати такі функції крові, як транспортна, детоксикувальна та осмотична, які забезпечують альбуміни, захисна, яку забезпечують різні види глобулінів, та згортальна, яку забезпечують білки високомолекулярної фракції.

ВИСНОВОК. ЕТЛП у дозі 25 мг/кг при превентивно-лікувальному введенні за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії сприяє не тільки відновленню кількості білків, але й стимулюванню білоксинтетичних процесів, та здатний коректувати порушення білкового обміну в системі крові та відновлювати життєзабезпечувальні функції крові.

Перспективи подальших досліджень. Отримані експериментальні дані обґрунтовують доцільність подальших досліджень ЕТЛП з метою його впровадження у широку медичну практику як коректора порушень білкового обміну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко [та ін.] // Фармац. часопис. – 2008. – № 2(6). – С. 27–30.
3. Єрьоменко Р. Ф. Вивчення впливу екстрактів з трави люцерни посівної та сої щитиністої на білковий обмін в організмі здорових щурів / Р. Ф. Єрьоменко // Запороз. мед. журн. – 2011. – **13**, № 4. – С. 20–22.
4. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – 2001. – 320 с.
5. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1985. – 536 с.
6. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спирин // Биохимия. – 1958. – **23**, вып. 5. – С. 657–661.
7. Шугалей И. В. Химия белка : учебное пособие /

И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджю, И. В. Целинский. – СПб. : Проспект Науки, 2010. – 200 с.

8. Harris D. A. Spectrophotometric assays in: spectrophotometry & spectrofluorimetry / D. A. Harris. – Washington : IRL Press, 1987. – P. 49–90.

Р. Ф. Еременко

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА С ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН В СИСТЕМЕ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ДОКСОРУБИЦИНОВОЙ ГИПОПРОТЕИНЕМИИ

Резюме

Приведены результаты исследования по определению влияния экстракта с травы люцерны посевной (ЭТЛП) на белковый обмен в системе крови в условиях доксорубициновой гипопроотеинемии. Установлено, что ЭТЛП в дозе 25 мг/кг повышает относительно контрольной патологии на 24 % содержание общего белка в сыворотке крови, на 21 % – количество альбуминов, на 18 % – количество глобулинов, на 55 % – количество высокомолекулярных белков в плазме крови. Эти данные свидетельствуют о том, что ЭТЛП за счет содержания в своем составе белка и аминокислот способен не только восстанавливать, но и стимулировать белковый обмен в системе крови и восстанавливать жизнеобеспечивающие функции крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белковый обмен, белки крови, экстракт с травы люцерны посевной, доксорубициновая гипопроотеинемия, коррекция белкового обмена, индукция синтеза белка.

R. F. Yeriomenko

NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

RESEARCH OF EXTRACT MEDICAGO SATIVA SOWING GRASS INFLUENCE ON PROTEIN METABOLISM IN BLOOD SYSTEM UNDER EXPERIMENTAL DOXORUBICIN OF HIPOPROTEINEMIA

Summary

Results of extract *Medicago sativa* sowing grass (EGMS) influence on protein metabolism in blood system under experimental doxorubicin of hipoproteinemia was described in this article. It was shown that administration of EGMS in dose 25 mg per kg leads to increasing of general proteins (24 %), albumins (21 %), globulins (18 %) and higher molecular proteins (55 %), decreasing of low-molecular proteins (70 %) in blood serum. It is an evidence that EGMS capable of restoration and promotion of protein metabolism in blood system and restoration vital function of blood due to presence of protein and amino acids in its composition.

KEY WORDS: protein metabolism, proteins of blood, extract *Medicago sativa* sowing grass, correction of protein metabolism, induction of synthesis of protein.

Отримано 26.01.12

Адреса для листування: Р. Ф. Ерьоменко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У РОЗВИТКУ І ПРОГРЕСУВАННІ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

В експериментах на щурах-самцях доведено, що в міру прогресування HCl-індукованого гострого ураження легень як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві достовірно зростає рівень активних форм кисню.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостре ураження легень, активні форми кисню, кров, бронхоальвеолярний змив.

ВСТУП. Респіраторний відділ легень є важливим компонентом системного гомеостазу, який при багатьох патологічних станах, незважаючи на ряд деструктивних і дистрофічних змін у своєму складі, проявляє широкі компенсаторні властивості. Провідне значення у розвитку ускладнень і летальних наслідків належить тяжким прогресуючим респіраторним порушенням, що є одним із компонентів синдрому поліорганної недостатності [11].

Метаболізм клітини в більшості випадків залежить від характеру інформації, яку несуть первинні месенджери – цитокіни. ФНП- α , як і IL-1 β , активує НАДФН-оксидази нейтрофільних гранулоцитів, які окиснюють НАДФН до НАДФ⁺ за рахунок відновлення O₂ до супероксидного аніон-радикала. Ферментативна генерація супероксидного аніон-радикала в організмі людини здійснюється також ксантиноксидазою, цитохромом P450, альдегідоксидазою, ліпоксигеназою, циклооксигеназою нейтрофілів і моноцитів [6, 9]. У результаті виникає так званий кисневий спалах, який зумовлений активними формами кисню (АФК), серед яких мієлопероксидаза каталізує реакцію утворення гіпохлориту з аніона хлору і пероксиду водню, а також відбувається утворення гідроксильного радикала з пероксиду водню і гіпохлориту за присутності іонів заліза [5, 8]. Дисмутація супероксидних аніон-радикалів під дією супероксиддисмутаз у біологічних тканинах спричиняє утворення пероксиду водню, який здатний легко проникати через мембрани клітин [7, 14].

© М. І. Марущак, 2012.

Розвиток і прогресування гострого ураження легень (ГУЛ) певним чином залежать від функціональної активності нейтрофілів, функція яких – фагоцитоз і продукція активних форм кисню. В результаті нейтрофіли стають основним джерелом АФК, а їх гіперпродукція може призводити до порушення функцій, пошкодження і смерті клітини внаслідок розвитку окисного стресу [3, 10, 13]. Отримані попередньо результати дозволяють говорити про регіонарну секвестрацію нейтрофілів у легенях за умов ГУЛ та гострого респіраторного дистрес-синдрому. Внаслідок цього в периферичній крові має місце зменшення нейтрофілів, що зумовлює зниження метаболічного резерву нейтрофілів периферичної крові [4].

Метою даного дослідження було з'ясувати роль активних форм кисню в нейтрофілах крові та гомогенату легень експериментальних тварин у патогенезі розвитку гострого ураження легень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди було проведено на 60 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 200–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Тварин поділили на 5 груп: 1-ша – контрольна група (n=12); 2-га – моделювання ГУЛ, спостереження через 2 год (n=12); 3-тя – моделювання ГУЛ, спостереження через 6 год (n=12); 4-та – моделювання ГУЛ, спостереження через 12 год (n=12); 5-та – моделювання ГУЛ, спостереження через 24 год (n=12).

Для дослідження вибрали нейтрофілозалежну експериментальну модель ГУЛ [12]. Щурів анестезували шляхом внутрішньочеревного введення тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону шиї обробляли хлоргексидином, і робили 0,5 см серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею HCl, pH=1,2, в дозі 1,0 мл/кг на вдиху. Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в аналогічній дозі.

Через 2, 6, 12 і 24 год тварин знову анестезували тіопенталом натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини. Для одержання бронхоальвеолярного змиву (БАЗ) щурам вводили інтра-трахеально 2 мл стерильного фізіологічного розчину, який через 1 хв забирали. Дану процедуру повторювали 3 рази. Отриманий БАЗ центрифугували протягом 10 хв при 3000 об. Супернатант збирали для наступних досліджень, а з одержаного осаду виділяли нейтрофіли. АФК досліджували в нейтрофілах гепаринізованої цільної крові та БАЗ. Популяцію нейтрофілів отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування при температурі 4 °C і швидкості 1500 об./хв утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася з мононуклеарних клітин – 80 % лімфоцитів, 15–18 % моноцитів і незначного (2–3 %) додатка гранулоцитів. Нижня інтерфаза (на межі градієнтів розчинів щільністю 1,077–1,092) являла собою на 98–100 % популяцію нейтрофілів. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім складала 98–99 %. Аналіз зразків клітин проводили на проточному цитометрі “Epics XL” (“Beckman Coulter”, США) за допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (інтенсивність світіння на клітину).

Барвник ДХФ-ДА є неполярною сполукою. Пасивно проникаючи в клітину, він гідролізується естеразами (відщеплюються ацетатні групи) і перетворюється в полярну сполуку, яка не здатна дифундувати назад з клітини, – 2,7-дигідродихлорфлуоресцеїн. За присутності внутрішньоклітинних активних форм кисню, головним чином після реакції з пероксидом водню, що утворюється під час респіраторного “вибуху”, 2,7-дигідродихлорфлуоресцеїн окиснюється до 2,7-дихлорфлуоресцеїну, який є флуоресціюючою сполу-

кою в ділянці зеленого спектра, що дозволяє аналізувати клітини за інтенсивністю світіння барвника (FL-1 канал) за допомогою проточної цитометрії.

Статистичну обробку отриманих даних проведено стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакета статистичних програм. Результати наведено як ($M \pm m$), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Достовірність розбіжностей між досліджуваними показниками визначали за допомогою двовибіркового критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати проведеного нами дослідження вказали на те, що в першу фазу (перші 2 год пошкодження) ГУЛ у крові експериментальних тварин спостерігалось достовірне зростання рівня АФК нейтрофілів ($p < 0,01$) до $(71,43 \pm 0,60) \%$ порівняно з даними контролю – $(40,79 \pm 0,81) \%$, причому такий високий рівень кисневих радикалів відмічено протягом 24 год спостереження (рис. 1). Так, у 3-й дослідній групі відсоток АФК збільшився на 9,5 % порівняно з 2-ю групою, а в 4-й – на 4,6 % відносно отриманих результатів 3-ї групи. Через 24 год після моделювання HCl-індукованого ГУЛ рівень АФК достовірно зріс на 75,12 % стосовно даних контрольної групи ($p < 0,01$). Проводячи статистичну обробку даних, ми дійшли висновку, що АФК у крові щурів з HCl-індукованим ГУЛ практично відразу реагують з молекулами, які контактують з ними, зокрема з білками, мембранними ліпідами, причому їх високий рівень зберігається протягом перших 24 год експерименту. Звертає на себе увагу досить високе значення АФК у контрольній групі. Проте АФК не лише проявляють цитотоксичну дію, але й можуть бути вторинними месенджерами при

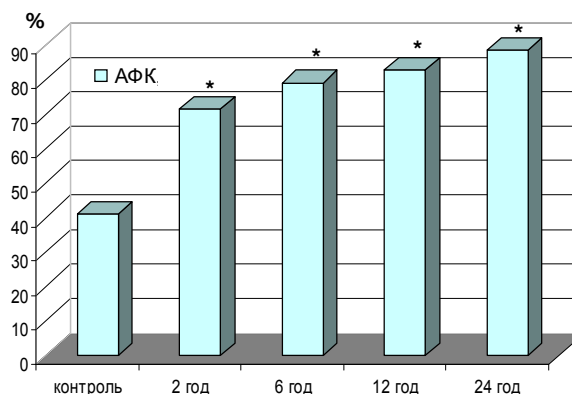


Рис. 1. Рівень активних форм кисню в нейтрофільних гранулоцитах крові при HCl-індукованому гострому ураженні легень (* – $p < 0,01$ порівняно з контролем).

підтримці фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, а також у регуляції таких клітинних реакцій, як проліферація, диференціювання та апоптоз [2].

Будь-які органи можуть постраждати від окисного ураження, проте легені найбільш уразливі в цьому відношенні, оскільки в них підвищена можливість перебігу вільнорадикальних процесів. Тканина легень містить у надлишку ненасичені жирні кислоти, які є субстратом для перекисного окиснення ліпідів. Важливо, що в патогенезі HCl-індукованого ГУЛ важливе місце займає акумуляція активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол, які є джерелом АФК [4, 5].

При проведенні аналізу рівня АФК нейтрофільних гранулоцитів у БАЗ було встановлено, що відсоток кисневих радикалів різко зростає уже на 2 годину експерименту на 106 % ($p < 0,01$) (рис. 2). Потрібно зауважити, що рівень АФК був високим у всіх групах спостереження. Так, у 3-й дослідній групі даний показник достовірно збільшився, порівняно з контролем, у 2,22 раза ($p < 0,001$) та в 1,08 раза відносно даних 2-ї групи ($p < 0,01$). Аналізуючи отримані результати у двох останніх експериментальних групах, ми відмітили достовірне зростання рівня АФК відповідно до даних контрольної групи. Зіставляючи отримані результати в 4-й та 5-й групах, встановили, що різниця між показниками не була статистично значимою, хоча достовірно відрізнялась від даних контрольної групи ($p < 0,001$) (4-та дослідна група: $91,88 \pm 0,66$ %, 5-та дослідна група: $95,33 \pm 0,97$ % проти $39,29 \pm 0,65$ % – контроль). Важливо відмітити, що власне гіперпродукція АФК у нейтрофільних гранулоцитах може зумовлювати функціональні порушення

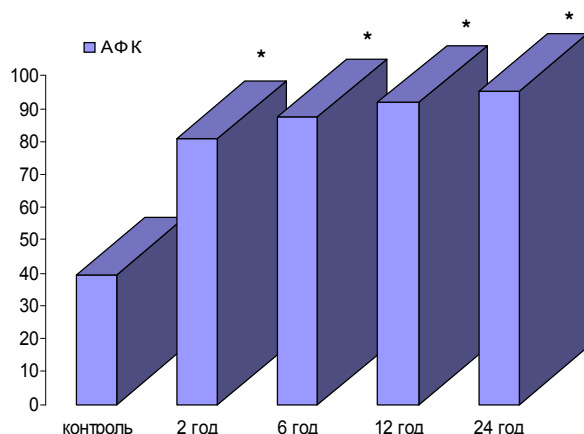


Рис. 2. Рівень активних форм кисню в нейтрофільних гранулоцитах бронхоальвеолярного змиву при HCl-індукованому гострому ураженні легень, % (* – $p < 0,001$ порівняно з контролем).

клітини і, як наслідок, смерть клітини в результаті розвитку окисного стресу.

Окисне ураження є результатом окисного стресу, коли порушується баланс прооксидантно-антиоксидантної системи. У попередніх дослідженнях ми довели, що при експериментальному ГУЛ, індукованому інтратрахеальним введенням хлоридної кислоти, спостерігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення: рівень ТБК-активних продуктів у гомогенаті легень перевищував приблизно на 37 % показники попередньої дослідної групи, тоді як у сироватці крові він також зростає, але менше (на 24 %) [1]. Встановлено, що в нейтрофілах до 90 % кисню, який споживається, витрачається на утворення $O_2^{\cdot -}$ і H_2O_2 [9]. Одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, що проявляється зростанням рівня малонового діальдегіду.

Важливим є зіставлення результатів визначення рівня АФК нейтрофілів у крові та БАЗ щурів з модельованим гідрохлоридним ГУЛ (рис. 3). Досліджено, що зміни кисневих радикалів відбувались однонаправлено у бік поглиблення окисного стресу. При цьому в 2-й групі рівень АФК у БАЗ був на 13,38 % вищим порівняно з даними цієї ж групи у крові, в 3-й та 4-й групах у БАЗ – приблизно на 11,0 % більшим, ніж у крові, в 5-й групі в БАЗ – на 7,62 % переважав дані цієї ж групи в крові. Найбільш значиме зростання АФК як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві відмічено через 2 год спостереження. В міру прогресування ГУЛ рівень АФК залишався достовірно високим стосовно даних контрольної групи, проте був статистично менш значимим у 3-й, 4-й та 5-й експериментальних групах.

Наші дані підтверджують те, що при ГУЛ, модельованому інтратрахеальним введенням

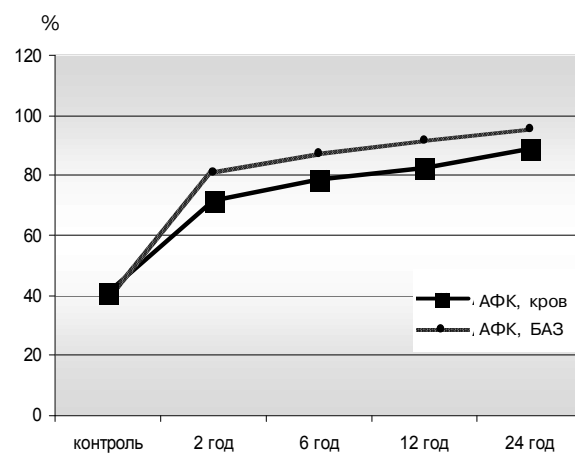


Рис. 3. Направленість змін активних форм кисню нейтрофілів у крові й бронхоальвеолярному змиві.

гідрохлоридної кислоти, у легенях більш виражений окисний стрес, ніж у системному кровотоці. Враховуючи основну функцію нейтрофілів – фагоцитоз, вони швидко мігрують у зону ураження при появі певного патологічного чинника. Гідрохлоридна кислота, яка в даній моделі ГУЛ є оксидантом, викликає в легенях полімеризацію актину нейтрофілів і знижує їх здатність до деформації, що зумовлює адгезію гранулоцитів до ендотелію. Накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та адгезія їх до ендотелію супроводжуються генерацією АФК, що призводить

до окисного стресу, наслідком якого є руйнування структурних елементів альвеол.

ВИСНОВКИ. 1. При HCl-індукованому гострому ураженні легень як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві достовірно зростає рівень активних форм кисню у міру прогресування захворювання.

2. При зіставленні результатів визначення рівня АФК нейтрофілів у крові та гомогенаті легень щурів з модельованим гідрохлоридним ГУЛ виявлено синхронний розвиток окисного стресу на системному і місцевому рівнях з переважанням легеневого окисного спалаху.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гришук Л. А. Динаміка перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в щурів за умов гострого ураження легень / Л. А. Гришук, М. І. Марущак // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2011. – № 2 (05). – С. 16–20.
2. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) / В. Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 4. – С. 47–58.
3. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс / Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
4. Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак, Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // Буковин. мед. вісник. – 2011. – **15**, № 3. – С. 82–86.
5. Asai T. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits / T. Asai, Y. Ohno, S. Minatoguchi [et al.] // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**. – P. 22–26.
6. De Dooy J. J. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates / J. J. De Dooy, L. M. Mahieu, H. P. Van Bever // Eur. J. Pediatr. – 2001. – **160**. – P. 457–463.
7. Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes / H. Glosli, K. J. Tronstad, H. Wergedal [et al.] // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1450–1452.
8. Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / K. Tamagawa, Y. Taooka, A. Maeda [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – **161**. – P. 1279–1284.
9. Lee W. L. Neutrophil activation and acute lung injury / W. L. Lee, G. P. Downey // Curr. Opin. Crit. Care. – 2001. – **7**. – P. 1–7.
10. Maiani N. A. Apoptosis of neutrophils / N. A. Maiani, T. W. Kuijpers, D. Roos // Acta Haematologica. – 2004. – **111**. – P. 56–66.
11. Marshall J. C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome / J. C. Marshall // Crit. Care Med. – 2001. – **29**. – P. 99–106.
12. Matute-Bello G. Animal models of acute lung injury / G. Matute-Bello, C. Frevert, T. Martin // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2008. – **295**. – P. 379–399.
13. Tiwari B. S. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death / B. S. Tiwari, B. Belenghi, A. Levine // Plant Physiology. – 2002. – **128**. – P. 1271–1281.
14. Tumor necrosis factor-alpha-mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H₂O₂ / Y. Ishii, C. A. Partridge, P. J. Del Vecchio, A. B. Malik // J. Clin. Invest. – 1992. – **89**. – P. 794–802.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАЗВИТИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ ОСТРОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГКИХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме

В экспериментах на крысах-самцах доказано, что по мере прогрессирования HCl-индуцированного острого поражения легких как в крови, так и в бронхоальвеолярном смыве достоверно возрастает уровень активных форм кислорода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острое поражение легких, активные формы кислорода, кровь, бронхоальвеолярный смыв.

М. I. Marushchak
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF AN ACUTE LUNG INJURY IN EXPERIMENT

Summary

In experiments on rats-males there has been proved that with the progression of HCl-induced acute lung injury both in the blood and bronchoalveolar lavage significantly increase the levels of reactive oxygen species.

KEY WORDS: acute lung injury, reactive oxygen, blood, bronchoalveolar lavage.

Отримано 06.02.12

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

СТАН ПОЛ У МОЗКУ І ЗМІНИ РЕАКТИВНОСТІ АВТОНОМНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ КРОВОООБІГУ В МОЛОДИХ ЩУРІВ ПРИ МЕТЕОЦИКЛОНІ

Метеотропні реакції розглядають як наслідок зниження пристосувальних можливостей організму до несприятливих зовнішніх факторів і один із проявів порушення гомеостатичних регуляторних механізмів. Метою даного дослідження було визначити гістохімічні зміни в головному мозку щурів різного віку за умов гіпоксичного ефекту атмосфери при метеоситуації III типу і провести аналіз патогенетичних змін автономної регуляції кровообігу при медико-метеорологічній ситуації III типу в експерименті. Гіпоксичний ефект атмосфери при метеоситуації III типу створює пошкоджуючий вплив на клітинному рівні у тварин усіх вікових груп, про що свідчить активація вільнорадикальних процесів за підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів у нервовій тканині й крові інтактних щурів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метеотропні реакції, гомеостаз, ТБК-активні продукти, гіпоксичний ефект атмосфери.

ВСТУП. Відомо, що метеоциклон викликає в організмі людини суттєві зміни центральної регуляції автономних функцій, зокрема регіонарного кровообігу, які характеризуються як метеотропні реакції [9, 11]. Дослідження впливу несприятливих чинників середовища, які впливають на захворюваність і працездатність населення, є актуальною науковою проблемою. Метеотропні реакції розглядають як наслідок зниження пристосувальних можливостей організму до несприятливих зовнішніх факторів і один із проявів порушення гомеостатичних регуляторних механізмів [10, 12, 13]. Проте механізми порушень при метеотропних реакціях, анатомо-фізіологічні структури, які задіяні в їх реалізації, вивчено недостатньо. Урахування індивідуальних, вікових і фізіологічних особливостей дозволить уточнити механізми впливу гіпоксичного ефекту атмосферного фронту на організм.

Метою даного дослідження було визначити гістохімічні зміни в головному мозку щурів різного віку за умов гіпоксичного ефекту атмосфери при метеоситуації III типу і провести аналіз патогенетичних змін автономної регуляції кровообігу при медико-метеорологічній ситуації III типу в експерименті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У зразках заморожених тканин головного мозку і крові нестате-

возрілих і старих тварин визначали вміст ТБК-активних продуктів і дієнових кон'югатів спектрофотометричним методом [1, 3, 4, 8]. За допомогою кардіоінтервалографії і варіаційної пульсометрії досліджували стан автономної регуляції кровообігу в нелінійних білих щурів у вихідному стані й після ізольованого впливу глутаргіну [2] і танакану [5, 6] на асоціативну кору великих півкуль головного мозку. Статистичну обробку даних здійснювали у програмі "Excel" за допомогою критерію Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Особливості реакції експериментальних тварин на гіпоксичний ефект медико-метеорологічної ситуації III типу характеризували резервні можливості організму в різних вікових групах. При метеоситуації I типу в молодих щурів вміст дієнових кон'югатів (ДК) у мозку і малонового діальдегіду (МДА) у крові був суттєво меншим, ніж у старих. У молодих тварин, порівняно зі старими, потужність антиоксидантних механізмів ефективніше компенсувала прооксидантні системи клітин при метеоситуації I типу.

Виявлено, що при метеоциклоні накопичувалися ТБК-активні продукти в мозку тварин. При медико-метеорологічній ситуації III типу вміст ДК і МДА суттєво зростав у крові й мозку всіх вікових груп щурів. Вміст МДА у крові молодих тварин при медико-метеорологічній ситуації III типу був суттєво меншим, ніж у старих, за таких же умов експерименту (табл. 1).

За цими даними, у молодих щурів на фоні метеоциклону спостерігалася більш виражена рівновага прооксидантних і антиоксидантних механізмів порівняно зі старими. Вікові особливості у процесах внутрішньоклітинного метаболізму і реактивності клітин створювали у молодих тварин більш сприятливі передумови для адаптації до гіпоксичного ефекту атмосфери.

У нестатевозрілих тварин при медико-метеорологічній ситуації I і III типів виявили особливості напруження регуляторних процесів за змінами індексу напруження (ІН) порівняно зі старими щурами. Незрілість регуляторних систем у молодих тварин пояснювала високу активність симпатичної регуляції в інтактних. Отже, висока активність гомеостатичних механізмів у молодих тварин, порівняно зі старими, досягалася за рахунок суттєво інтенсивнішого навантаження на центральний контур регуляції серцевого ритму.

Введення глутаргіну справа молодим щурам при метеоситуації I типу спричиняло зростання індексу напруження і вегетативного показника ритму (ВПР), але різниця була несуттєвою через велику варіабельність показ-

ників. Введення глутаргіну зліва викликало у нестатевозрілих тварин суттєве збільшення амплітуди моди, що свідчило про активацію симпатичних впливів на серцевий ритм.

Інтактні нестатевозрілі щури при метеоситуації I типу мали суттєво менші середню тривалість кардіоциклу, варіаційний розмах і моду порівняно з такими показниками молодих інтактних тварин при III типі погоди. За цими даними, активність симпатичних впливів на серцевий ритм у молодих інтактних щурів зменшувалася за умов метеоситуації III типу. Отже, в молодих тварин пошкоджуючий вплив гіпоксичного ефекту атмосфери викликав активацію енергозберігаючих парасимпатичних впливів.

Після введення глутаргіну на фоні антициклону в молодих інтактних тварин було зареєстровано суттєво менші значення середньої тривалості кардіоциклу, варіаційного розкиду і моди порівняно з такими показниками при антициклоні ($p < 0,05$). Водночас ІН суттєво не відрізнявся при метеоситуації I і III типів після введення глутаргіну справа молодим щурам (табл. 2). Після лівобічного введення глутаргіну молоді тварини при антициклоні мали суттєво

Таблиця 1 – Визначення ТБК-активних продуктів у молодих і старих тварин при змінних типах погоди

Показник	Антициклон		Циклон	
	1,5 міс.	10–12 міс.	1,5 міс.	10–12 міс.
Вміст у мозку ДК, мкмоль/л	3,77±0,52 ⁺	4,72±0,04	5,36±0,03*	5,05±0,02*
Вміст у мозку МДА, мкмоль/л	1,80±0,17 ⁺	2,56±0,05	2,37±0,19*	2,76±0,14*
Вміст у крові ДК, мкмоль/л	3,53±0,01	4,17±0,05	4,49±0,26*	4,81±0,25*
Вміст у крові МДА, мкмоль/л	1,85±0,10 ⁺	2,45±0,02	2,35±0,03**	2,76±0,08*

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з антициклоном; + – $p < 0,05$ порівняно зі старими тваринами.

Таблиця 2 – Напруження регуляторних процесів у молодих і старих тварин при змінних типах погоди

Група тварин	Інтактні	Введення глутаргіну справа	Введення глутаргіну зліва	Введення танакану справа	Введення танакану зліва
Антициклон					
Молоді	23571,27±686,70 ⁺	42193,62±651,83	21760,91±546,92 ⁺	146184,60±1331,72 ^{***}	12253,17±326,64 ^{°#}
Старі	11298,15±30,42 [°]	33317,66±133,91*	2850,72±21,26 [°]	5397,22±23,68**	42929,29±728,98 ^{°#}
Циклон					
Молоді	21362,11±427,96	22234,89±122,32	24854,27±59,39	14531,40±413,26*	2618,312±967,34 ^{°#}
Старі	15135,31±325,60	17630,29±87,12	18071,06±65,49	10220,08±73,31	22043,12±22,93 ^{***}

Примітка. + – $p < 0,05$ порівняно зі старими тваринами; * – $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; ° – $p < 0,05$ порівняно з метеоситуацією III типу; # – $p < 0,05$ порівняно з ефектом правобічного введення препарату; ** – $p < 0,05$ порівняно з ефектом глутаргіну.

меншу амплітуду моди порівняно з аналогічними результатами при метеоситуації III типу. Отримані дані свідчили про те, що введення глутаргіну викликало ідентичні регуляторні зміни при метеоситуації I типу, хоча вони досягалися завдяки певним функціональним особливостям при впливі на праву і ліву півкулі. Зокрема, введення глутаргіну справа при метеоситуації I типу більш суттєво посилювало симпатичні впливи на серцевий ритм, ніж при метеоциклоні.

Введення танакану справа молодим щурам при метеоситуації I типу викликало суттєве підвищення ІН і ВПР, тобто активацію симпатичних впливів на серцевий ритм. Лівобічне введення танакану посилювало парасимпатикотонію у нестатевозрілих тварин при антициклоні, оскільки ІН і ВПР, зареєстровані після лівобічного введення танакану, були суттєво меншими, ніж аналогічні показники тварин, які отримали вплив препарату на праву півкулю ($p < 0,05$). Отже, ефект танакану в даному випадку суттєво відрізнявся при стимуляції правої і лівої півкуль головного мозку.

Слід зауважити суттєву різницю ефектів глутаргіну і танакану при правобічному введенні. Введення танакану справа викликало зростання ІН і ВПР суттєво більшою мірою, ніж ефект глутаргіну в нестатевозрілих тварин при метеоситуації I типу. Вплив танакану на ліву півкулю у молодих щурів призводив до більшої варіабельності серцевого ритму, ніж аналогічний ефект глутаргіну за умов антициклону ($p < 0,05$). За цими даними, вплив танакану на ліву півкулю викликав активацію парасимпатичної регуляції серцевої діяльності у молодих тварин при метеоситуації I типу.

У нестатевозрілих тварин при медико-метеорологічній ситуації I типу після введення танакану справа середня тривалість кардіоциклу і мода були менші, а ІН і ВПР – більші, ніж при циклоні ($p < 0,05$). Після введення танакану зліва у нестатевозрілих щурів зареєстрували значно менший ІН при метеоситуації I типу, ніж при метеоциклоні ($p < 0,05$).

За цими даними, вплив танакану на праву півкулю викликав значнішу активацію симпатичної регуляції серцевого ритму при метеоситуації I типу, ніж при циклонічній погоді. Стимуляція лівої півкулі при антициклоні призводила до більшого вираження парасимпатичних впливів на серцевий ритм порівняно з метеоситуацією III типу.

Після введення глутаргіну справа у молодих щурів зареєстровано суттєво більшу варіабельність серцевого ритму, ніж у старих при метеоситуації III типу. Різниця ІН у молодих і

старих тварин не була вірогідною за порівнюваних експериментальних умов через велику варіабельність даного показника у молодих тварин. Отриманий результат можна пояснити незрілістю нервової регуляції у молодих щурів.

Введення глутаргіну справа викликало у молодих тварин зростання вегетативного показника ритму при метеоситуації III типу. При лівобічному введенні глутаргіну в молодих тварин суттєво зменшувалися середня тривалість і варіабельність кардіоциклу ($p < 0,05$).

Таким чином, вплив глутаргіну при несприятливій метеоситуації III типу посилював вплив центрального контуру регуляції серцевого ритму в молодих тварин. Після введення глутаргіну зліва зареєстровано менші тривалість і варіабельність кардіоциклу, ніж після правобічного введення препарату. Активація симпатичної регуляції після стимуляції лівої півкулі при метеоситуації III типу була більш інтенсивною.

Порівняно зі старими щурами молоді при метеоситуації III типу після введення танакану справа мали суттєво менший варіаційний розмах. Після лівобічного введення танакану у молодих тварин зареєстрували більший ІН, ніж у старих. Отримані дані свідчили про більш значну активацію симпатичних впливів у молодих щурів за даних умов порівняно зі старими.

Введення танакану молодим тваринам справа і зліва викликало зменшення варіабельності серцевого ритму порівняно з інтактними щурами даної вікової групи. Стимуляція лівої півкулі призводила до суттєво більшої активації центрального контуру регуляції серцевого ритму в молодих тварин порівняно з результатами правобічного введення даного препарату. Зокрема, після лівобічного введення танакану в молодих тварин при метеоциклоні зареєстровано суттєво менші середню тривалість кардіоциклу, Мо і суттєво більший ІН ($p < 0,05$).

Правобічне введення танакану викликало суттєво меншу варіабельність серцевого ритму при нижчому значенні ІН і ВПР порівняно з впливом глутаргіну в аналогічних умовах експерименту. Вплив танакану спричиняв більш щадну активацію центрального контуру регуляції серцевого ритму, порівняно з глутаргіном, при стимуляції правої півкулі в молодих тварин за умов метеоциклону.

ВИСНОВКИ. Висока активність гомеостатичних механізмів у молодих тварин, порівняно зі старими, досягається за рахунок суттєво інтенсивнішого навантаження на центральний

контур регуляції серцевого ритму. В молодих щурів, порівняно зі старими, потужність антиоксидантних механізмів ефективніше компенсує прооксидантні системи клітин при метеоситуації I типу. Гіпоксичний ефект атмосфери при метеоситуації III типу створює пошкоджуючий вплив на клітинному рівні в молодих тварин, про що свідчить активація вільнорадикальних процесів за підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів у нервовій тканині й крові інтактних щурів ($p < 0,05$). Вплив танакану ви-

кликає щадну активацію центрального контуру регуляції серцевого ритму в молодих тварин за умов метеоциклону.

У подальших дослідженнях доцільно вивчити роль транскрипційних регуляторів генів ссавців, відповідальних за реакцію на гіпоксію [7, 14], зокрема гіпоксія-індуцибельного фактора, у змінах реактивності організму на гіпоксичний вплив медико-метеорологічної ситуації III типу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения ПОЛ вместе с тиобарбитуровой кислотой [Текст] / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–42.
2. Бабак О. Я. Глутаргин – фармакологическое действие и клиническое применение [Текст] / О. Я. Бабак, В. М. Фролов, Н. В. Харченко. – Харьков – Луганск : Элтон-2, 2005. – 456 с.
3. Гаврилов В. Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой [Текст] / В. Б. Гаврилов, А. П. Гаврилова, Л. М. Жажуль // Вопр. мед. химии. – 1987. – **33**, № 1. – С. 118–122.
4. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение гидроперекисей липидов в плазме крови [Текст] / В. Б. Гаврилов, М. Г. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1988. – № 3. – С. 36–39.
5. Окладников В. И. Гипотеза “общего конечного пути” действия ноотропного препарата “Танакан” [Текст] / В. И. Окладников // Сибир. мед. журн. – 2008. – № 4. – С. 92–95.
6. Онбыш Т. Е. Механизмы реализации фармакологической активности экстракта гинкго билоба [Текст] / Т. Е. Онбыш, Л. М. Макарова, В. Е. Погорелый // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 5. – С. 22–25.
7. Серебровская Т. В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания [Текст] / Т. В. Серебровская // Укр. пульмонолог. журн. – 2005. – № 3 (додаток). – С. 77–81.
8. Тимирбулатов Т. А. Метод определения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение [Текст] / Т. А. Тимирбулатов, С. И. Селезнев // Лаб. дело. – 1988. – № 4. – С. 209–211.
9. Хаснулин В. И. Роль экологически обусловленного стресса и функциональных асимметрий головного мозга в адаптации и дизадаптации висцеральных систем в экстремальных климато-геофизических условиях Севера (на примере сердечно-сосудистой системы) [Текст] / В. И. Хаснулин // Современные проблемы общей патологии и экологии человека. Труды НЦКЭМ СО РАМН ; под ред. В. П. Казначеева. – Новосибирск : СО РАМН, 2002. – С. 62–70.
10. Шаршенова А. А. Возрастные особенности адаптационных механизмов вегетативной нервной системы у детей среднегорья [Электронный ресурс] / А. А. Шаршенова, Э. Дж. Мажигова // Педиатрия. – 2005. – № 3. – С. 110–113. – Режим доступа до журн. : <http://www.pediatricjournal.ru>.
11. D'Aleo J. A look at the environmental changes and “global warming” [Электронный ресурс] / J. D'Aleo // Chief WSI/INTELLICAST Meteorologist. – Written April 9, 2002. – Режим доступа до статті : <http://www.intellicast.com/DrDewpoint/Library/1295>.
12. Grewe V. Dynamic-chemical coupling of the upper troposphere and lower stratosphere region / V. Grewe, C. Reithmeier, D. Shindell // Chemosphere. – 2002. – **47**. – P. 851–861.
13. Shindell D. T. Climate and ozone response to increased stratospheric water vapor [Текст] / D. T. Shindell // Geophys. Res. Lett. – 2001. – **28**. – P. 1551–1554.
14. Zarembek K. A. HIF-1 α : a master regulator of innate host defenses? / K. A. Zarembek, H. L. Malech // J. Clin. Invest. – 2005. – **115**. – P. 1702–1704.

СОСТОЯНИЕ ПОЛ В МОЗГЕ И ИЗМЕНЕНИЯ РЕАКТИВНОСТИ АВТОНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ У МОЛОДЫХ КРЫС ПРИ МЕТЕОЦИКЛОНЕ

Резюме

Метеотропные реакции рассматривают как следствие снижения приспособительных возможностей организма к неблагоприятным внешним факторам и одно из проявлений нарушения гомеостатических регуляторных механизмов. Целью данного исследования было определить гистохимические изменения в головном мозге крыс разного возраста в условиях гипоксического эффекта атмосферы при метеоситуации III типа и провести анализ патогенетических изменений автономной регуляции кровообращения при медико-метеорологической ситуации III типа в эксперименте. Гипоксический эффект атмосферы при метеоситуации III типа создает повреждающее влияние на клеточном уровне у животных всех возрастов, о чем свидетельствует активация свободнорадикальных процессов с повышенным содержанием ТБК-активных продуктов в нервной ткани и крови интактных крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метеотропные реакции, гомеостаз, ТБК-активные продукты, гипоксический эффект атмосферы.

N. M. Volkova
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

STATE LIPID PEROXIDATION IN THE BRAIN AND AUTONOMIC CIRCULATORY CONTROL REACTIVITY CHANGES IN YOUNG RATS AT CYCLONIC WEATHER

Summary

Meteotropic reactions are considered as a consequence of lower adaptive capacity to adverse external factors and one of the manifestations of violations of homeostatic regulatory mechanisms. The purpose of this study was to determine the histochemical changes in the brain of rats of different ages under hypoxic effect of the atmosphere at cyclonic weather type III and to analyze pathogenic changes in autonomic regulation of circulation. Hypoxic effect of the atmosphere at cyclonic weather type III creates a damaging effect on the cellular level in animals of all age groups, as evidenced by activation of free radical processes by high content of TBA-active products in nervous tissue and blood of intact rats.

KEY WORDS: cyclonic weather, homeostasis, TBA-active products, hypoxic atmosphere.

Отримано 02.02.12

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

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ
АНТИМУТАГЕННОЇ ДІЇ ЕЛГАЦИНУ**

Проведено оцінку потенційної антимутагенної дії препарату “Елгацин” у трьох тест-системах: методом урахування рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій у дрозофіли, методом урахування частоти хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів та методом обліку частоти домінантних летальних мутацій у статевих клітинах щурів. Показано, що на тлі використання елгацину зменшується частота летальних мутацій у мух-дрозофіл, дещо знижується відсоток сукупної кількості хромосомних порушень у клітинах кісткового мозку щурів, не змінюється мітотична активність статевих клітин щурів порівняно з інтактними тваринами. Узагальнення результатів дослідження дозволило дійти висновку про відсутність у елгацину мутагенної дії. Крім того, на тлі елгацину зменшуються або усуваються прояви генотоксичних впливів, що дозволяє обговорювати його антимутагенні властивості.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: елаготаніни, елгацин, мутагенні властивості, антимутагенна дія.

ВСТУП. Огляд літературних джерел останніх десятиліть показує, що одним із найбільш перспективних напрямків фармакологічного дослідження елаготанінів є з'ясування молекулярних механізмів їх антимутагенної, антиканцерогенної активності та встановлення залежності “структура–дія” серед мономерних, олігомерних, макроциклічних представників цього класу [6, 7, 9, 12]. Більшість публікацій присвячена дослідженню опосередкованого втручання елаготанінів у процеси мутагенезу та канцерогенезу через регуляцію накопичення, активації, детоксикації мутагенів і канцерогенів, а також модуляцію активності ферментів та факторів росту, відповідальних за процес клітинної трансформації і проліферації [9]. Р. W. Thulstrup et al. (1999) встановили спроможність ЕК безпосередньо взаємодіяти з молекулою ДНК. За допомогою оптичних спектроскопічних методів встановлено, що у нейтральній формі при рН 5,5 молекула ЕК приєднується до подвійної спіралі ДНК, тоді як підвищення значень рН значно лімітує взаємодію. Зазначений механізм, на думку авторів, можна вважати важливим молекулярним механізмом багатьох різновидів біологічної активності елагової кислоти [10]. Ще одним із можливих механізмів, які зумовлюють антимутагенну дію елаготанінів, вважають їх анти-

оксидантну активність. Відомо, що значна кількість мутагенів продукує активні форми кисню (АФК) як внаслідок біотрансформації, так і під час взаємодії з клітинними макромолекулами. У такому разі антиоксидантна дія елаготанінів забезпечує захист клітин від окисної трансформації [8, 9, 12]. У дослідях з опроміненням мишей (1,5–3,0 Gy) пероральне введення ЕК зменшувало чисельність клітин крові та спинномозкової рідини з ядерними і хромосомальними дефектами однаково ефективно, як і при застосуванні вітаміну Е в тій же дозі [7]. В інших дослідженнях [11] показано, що у реалізації антимутагенної дії елагової кислоти й інших фенольних сполук (галлової кислоти, кверцетину, (-)-епікатехінгалату, (-)-епігалокатехіну, таніну тощо) антиоксидантна дія не має вирішального значення.

У зв'язку із зазначеним, викликало інтерес дослідити наявність та особливості генотропної дії оригінального вітчизняного препарату “Елгацин”, активна субстанція якого представлена сумою елаготанінів і який впроваджують у медичну практику як кардіопротекторний метаболітотропний засіб [5].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Оцінку потенційної антимутагенної дії препарату “Елгацин” досліджували за повною програмою в трьох тест-системах: методом урахування рецесивних,

зчеплених зі статтю летальних мутацій у дрозофіли (РСЗЛ), методом урахування частоти хромосомних аберацій (ХА) у клітинах кісткового мозку щурів та методом обліку частоти домінуючих летальних мутацій (ДЛМ) у статевих клітинах щурів [2–4]. Комплекс цих трьох тест-систем дозволяє зареєструвати весь можливий спектр генетичних порушень у соматичних і статевих клітинах еукаріот на генетичному, хромосомному та геномному рівнях, які можуть з'явитися під впливом препарату, і зробити належний висновок про його мутагенну/антимутагенну активність [2–4].

Метод РСЗЛ у *Drosophila melanogaster* (Меллер-5), який дозволяє оцінити здатність препарату індукувати генні мутації, було опрацьовано на двох лініях *D. melanogaster* – Oregon-R (дослідна) і Меллер-5 (Basc) (тестерна). У попередніх експериментах визначали LD₅₀ елгацину (LD₅₀=3,75 мг/мл), в якій препарат додавали у поживне середовище. Личинок лінії Oregon-R третього личинкового віку відмивали від звичайного середовища і пересаджували на середовище, яке містило елгацин. Після вилуплення імаго відбирали самців, які ще не копулювали, і парували їх з віргінними самками лінії Меллер-5. Отримане потомство (F1) парували між собою. Одержане потомство другого покоління (F2) оцінювали візуально в культуральних пробірках. Пробірки, в яких були відсутні самці дикого типу, відзначали як “леталі” (тобто летальні мутації). Загальна кількість культуральних пробірок відповідала кількості проаналізованих Х-хромосом самців, які підлягали впливу препарату. Частоту летальних мутацій визначали у відсотках відносно кількості досліджених хромосом.

Для вивчення цитогенетичної активності елгацину щурам-самцям вводили препарат внутрішньошлунково в дозі 150 мг/кг одноразово згідно з методикою [2, 3]. Через 6, 24, 48 год тварин знеживлювали відповідно до вимог та принципів біоетики і вилучали стегнову кістку. З кістки видаляли епіфіз, і разом з кістковим мозком фіксували її у фіксаторі Карнуа. Після проводки фіксованих кісток у батареї спиртів з кісткового мозку готували тимчасові давлені препарати, які фарбували розчином ацетокарміну. Облік частоти хромосомних аберацій проводили ана-телофазним методом, який дозволяє зареєструвати власне

ХА, в тому числі й порушення на рівні хроматид, а також злипання та відставання хромосом, які зазвичай пов'язані з порушенням структури клітинних мембран. Метод дає змогу в одному препараті оцінити рівень проліферативної активності клітин за допомогою обчислення мітотичного індексу.

Для проведення тесту ДЛМ щурам-самцям вводили препарат у дозі 15 і 150 мг/кг протягом періоду сперматогенезу, який охоплює всі стадії дозрівання сперматозоїдів – зрілі сперматозоїди, сперматиди та сперматоцити, за винятком стовбурових сперматогоній. Після закінчення введення самців парували з інтактними самками і реєстрували перший день вагітності. На 20-й день самок знеживлювали й оцінювали стандартні показники розвитку потомства: кількість жовтих тіл вагітності, рівень ембріональної смертності, кількість живих ембріонів, а також рівень ДЛМ [2]. Разом із цим, було досліджено запліднюючу здатність самців, що також є ознакою впливу препарату на геном статевих клітин.

Результати досліджень було оброблено статистично за допомогою параметричних та непараметричних критеріїв: критерію Фішера, критерію Стюдента і критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні [1, 2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За допомогою методу РСЗЛ вивчено здатність елгацину індукувати у Х-хромосомі самців дикого типу рецесивні летальні мутації, які через жіночу лінію передаються самцям 2-го покоління. Результати дослідження наведено в таблиці 1.

Інтегральним показником, який дозволяє визначити мутагенні потенції досліджуваних об'єктів, є ступінь мутагенного ефекту. Як видно з таблиці 1, цей показник для елгацину дорівнював 0, що підтверджує відсутність його генотоксичної дії. Попри зазначене, вирощування личинок дрозофіл Oregon-R у живильному середовищі з додаванням елгацину позначилось виразною, хоча й невірогідно значущою, тенденцією до зменшення частоти летальних мутацій практично у 2 рази порівняно з контролем. Це дає підставу стверджувати, що при застосуванні елгацину створюються умови, за яких упереджується виникнення генних мутацій.

Більш деталізовану картину щодо впливу елгацину на генетичний апарат клітини було

Таблиця 1 – **Ступінь мутагенного ефекту субстанції елгацину**

Умови досліджу	Кількість досліджених хромосом	Частота летальних мутацій, f%±m%	Ступінь мутагенного ефекту, бали
Контроль	1020	0,392±0,20	
Субстанція елгацину	1004	0,199±0,14	0

отримано в дослідях на клітинах кісткового мозку щурів-самців, яким препарат вводили у значно більшій дозі (150 мг/кг), ніж його умовно-терапевтична (1 мг/кг). Результати вивчення цитогенетичної активності елгацину показали відсутність будь-яких негативних порушень на рівні хроматид і хромосом в усі терміни дослідження (табл. 2). Мітотична активність у тварин дослідної групи залишалася на рівні контролю, що свідчить про невтручання препарату в процес клітинної проліферації. Звертає на себе увагу й той факт, що відсоток сукупної кількості порушень на тлі елгацину мав певну тенденцію до зменшення порівняно з контролем (табл. 2).

При дослідженні елгацину в тесті ДЛМ, результати якого наведено у таблиці 3, встановлено, що відсоток усіх видів ембріональної загибелі плодів мав характер регресуючої тенденції порівняно з контрольним значенням. Підвищення частоти ДЛМ під впливом елгацину не було зареєстровано, що дозволяє говорити про відсутність у препараті мутагенних властивостей. Як видно з таблиці 3, на тлі елгацину в дозі 15 мг/кг дещо збільшувалась кількість живих плодів на одну самку, що свідчить на користь генопротекторної дії препарату. Одержані від самок ембріони дослідної групи також не відрізнялись від ембріонів контрольної ні за розмірами, ні за масою.

Таблиця 2 – Частота хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів при введенні елгацину

Показник	Контроль	Елгацин, 150 мг/кг		
		6 год	24 год	48 год
Кількість тварин	6	6	6	6
Кількість проаналізованих клітин	1200	1200	1200	1200
Фрагменти, %	0,9±0,55	0,8±0,41	0,8±0,52	0,7±0,26
Хромосомні мости, %	1,0±0,55	0,7±0,52	0,6±0,20	0,8±0,40
Хроматидні мости, %	0,8±0,61	0,8±0,41	0,8±0,27	0,8±0,41
Кількість власне аберацій, %	2,8±0,52	2,3±0,41	2,2±0,41	2,3±0,41
Злипання хромосом, %	0,4±0,38	0,3±0,27	0,4±0,03	0,3±0,26
Відставання хромосом, %	0,5±0,32	0,4±0,38	0,3±0,26	0,5±0,45
Сукупна кількість порушень, %	3,7±0,52	3,0±0,63	2,9±0,66	3,2±0,75
Мітотичний індекс	1,6±0,17	1,7±0,17	1,7±0,21	1,7±0,14

Таблиця 3 – Частота домінантних летальних мутацій у щурів при введенні елгацину

Показник	Контроль	Елгацин	
		150 мг/кг	15мг/кг
Число спостережень	14	11	11
Кількість ЖТВ, ум. од.	9,8±1,48	9,4±2,32	9,5±1,29
Кількість місць імплантації, ум. од.	9,1±1,75	8,8±2,29	9,5±1,29
Загальна ембріональна смертність, %	15,1 (0÷27,3)	11,8 (0÷33)	1,1(0÷12,5)
Доімплантаційна загибель плодів, %	5,8 (0÷16,7)	9,5 (0÷41,7)	0
Постімплантаційна загибель плодів, %	6,5 (0÷20)	2,9 (0÷20)	1,1(0÷12,5)
Число живих плодів на одну самку	8,4±1,95	8,3±2,75	9,4±1,43
Частота ДЛМ, %		1,0	0
Маса плодів	2,5±0,40	2,3±0,42	2,4±0,29
Розміри плодів	3,1±0,26	2,7±9,35	3,2±0,21

ВИСНОВКИ. Експериментальне тестування елгацину в лабораторних умовах показало відсутність у препараті мутагенної дії. Встановлено, що на тлі елгацину зменшуються або усуваються прояви генотоксичних впливів, що дозволяє обговорювати його антимуагенні властивості. Зважаючи на факт універсаль-

ності генетичного матеріалу в різних біологічних об'єктів і відомі дані літератури щодо високого рівня збігу результатів, отриманих під час дослідження модельних об'єктів і вищих організмів, у тому числі на людині, треба думати, що елгацин чинитиме антимуагенну дію і на рівні генетичного апарату ссавців.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Ленинград : Медицина, Ленингр. отд., 1973. – 141 с.

2. Методические указания к большому практикуму по генетическому анализу. – Харьков : ХГУ, 1985. – 31 с.

3. Нарушение митоза как показатель общетокс-

сического и цитотоксического действия пестицидов : методические рекомендации. – К., 1983. – 18 с.

4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – Женева, 1989. – Вып. 51. – 212 с. (Серия “Гигиенические критерии состояния окружающей среды”).

5. Сахарова Т. С. Експериментальне вивчення фармакодинаміки та механізму дії нової групи природних антиоксидантів на основі еллаготанінів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра фармацевт. наук / Т. С. Сахарова. – Харків, 2008. – 36 с.

6. Chen S. C. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds / S. C. Chen, K. T. Chung // Food Chem. Toxicol. – 2000. – **38**, № 1. – P. 1–5.

7. De Mejia E. G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans / E. G. De Mejia, E. Castano-Tostado, G. Loarca-Pina // Mutat. Res. – 1999. – **441**, № 1. – P. 1–9.

8. Feldman K. S. Recent progress in ellagitannin chemistry / K. S. Feldman // Phytochemistry. – 2005. – **66**, № 17. – P. 1984–2000.

9. Ferguson L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability / L. R. Ferguson // Mutation Research. – 2001. – № 475. – P. 89–111.

10. Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichroism UV-VIS spectroscopy / P. W. Thulstrup, T. Thormann, J. Spanget-Larsen [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – **265**, № 2. – P. 416–421.

11. Mut-Test to detect substances suppressing spontaneous mutation due to oxidative damage / Y. Yonezawa, S. Kawamura, M. Yamato, H. Nishioka // Mutat. Res. – 2001. – **490**, № 1. – P. 21–26.

12. Yoshida T. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights / T. Yoshida, T. Natano, H. Ito // Biofactors. – 2000. – № 13 (1–4). – P. 121–125.

Л. В. Яковлева, Т. С. Сахарова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АНТИМУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭЛГАЦИНА

Резюме

Проведена оценка потенциального антимутагенного действия препарата “Элгацин” в трех тест-системах: с помощью метода учета рецессивных, сопряженных с полом летальных мутаций у дрозофилы, метода учета частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс и метода учета частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках крыс. Показано, что на фоне использования элгацина уменьшается частота летальных мутаций у мух-дрозофил, несколько снижается процент совокупного количества хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс, не изменяется митотическая активность половых клеток крыс в сравнении с интактными животными. Обобщение результатов исследования позволило сделать вывод об отсутствии у элгацина мутагенного действия. Кроме того, на фоне элгацина уменьшаются или устраняются проявления генотоксических влияний, что позволяет обсуждать его антимутагенные свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эллаготанины, элгацин, мутагенные свойства, антимутагенное действие.

L. V. Yakovlieva, T. S. Sakharova
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

EXPERIMENTAL RESEARCH OF POTENTIAL ANTIMUTAGENIC ACTION OF ELGACIN

Summary

There was conducted the evaluation of potential antimutagenic action of the drug “Elgacin” in three test-systems: by the method of taking into account the recessive, coupling with the sex of lethal mutations in fruit-fly, by the method of taking into account the frequency of chromosome aberrations, in the cells of rats’ bone marrow and the method of calculation of frequency of dominant lethal mutations in rats’ sex cells. There was shown that on the background of the Elgacin use it is decreased the frequency of lethal mutation in fruit-flies, it is reduced the percent of total quantity of chromosome disorders in the cells of rats’ bone marrow, it isn’t changed the mitosis activity of rats’ sex cells in comparing with inactive animals. Generalization of the research results allowed to make a conclusion about an absence of mutagenic action in Elgacin. Besides, on the background of Elgacin there are decreased or removed the manifestations of genotoxic influences, that allows to discuss its antimutagenic properties.

KEY WORDS: ellagotannines, Elgacin, mutagenic properties, antimutagenic action.

Отримано 13.02.12

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

ГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРИ АЦИНАРНОГО ВІДДІЛУ ВЕЛИКИХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

Комплексне вивчення гістохімічної будови ацинарного відділу привушних, піднижньощелепних та під'язикових великих слинних залоз показало відмінності в їх будові, пов'язані зі специфікою функції, яку вони виконують.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: вивчення, будова, ацинарний відділ, слинні залози.

ВСТУП. Із загального об'єму слини, який виробляється в людини, згідно з даними В. Л. Бикова, 25 % припадає на привушні слинні залози, 70 % – на піднижньощелепні й 5 % – на під'язикові [2, 6]. Як свідчать дані А. Хема та Д. Кормака, всі великі слинні залози мають стереотипну будову. Так, у кожній слинній залозі слід розрізняти паренхіму, представлену епітеліальними компонентами, та строму, яка складається зі сполучної тканини [1, 3]. Паренхіма залози утворена ацинусами, які утворюють секрет, та протоками, що його виводять.

У привушних слинних залозах зустрічаються ацинуси здебільшого білкові, в піднижньощелепних переважають білково-слизові кінцеві відділи. Тому в цих залозах у 80 % виявляють білкові сероцити. У під'язиковій слинній залозі спостерігається змішана секреція, але переважає слизовий компонент, тому мукоцити зустрічаються частіше.

Ацинарні відділи дрібних слинних залоз (губні, піднебінні та язикові) змішані, містять серомукозні клітини. У привушних слинних залозах переважає один вид епітеліоцитів кінцевих відділів – сероцити. Піднижньощелепна слинна залоза містить два види ацинарних відділів (білкові й змішані), під'язикова – три види (змішані ацинуси, слизові та білкові ацинуси) [5].

Метою даного дослідження було комплексне вивчення гістохімічної будови ацинарного відділу привушних, піднижньощелепних та під'язикових великих слинних залоз.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Матеріалом дослідження послуговували великі слинні залози – привушні, піднижньощелепні та під'язикові, взяті після розтину в практично здорових людей, які померли в Полтавській психіатричній лікарні ім. І. М. Мальцева.

Забрані зразки матеріалу фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну. В подальшому виготовляли, відповідно, парафінові або епоксидні блоки, з яких отримували тонкі зрізи. З парафінових зрізів, крім загальних гістологічних забарвлень гематоксилін-еозином та за Ван-Гізона, проводили гістологічні забарвлення ШИК-альціановим синім та ШИК-альціановим синім+за Бергманом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як показують проведені нами дослідження, при комбінованому гістохімічному забарвленні Бергман+ШИК+альціановим синім слід розрізняти три типи ацинусів:

- 1-й тип – в ацинусах переважають мукоцити;
- 2-й тип – в ацинусах наявні сероцити;
- 3-й тип – ацинуси містять як мукоцити, так і сероцити.

Основною функцією секреторно-видільного відділу є синтез та виділення білкового або муцинозного секрету. При цьому слід розрізняти три рівні утворення даного компонента слини: ацинозний, вставний та смугастий. Ацинозний відділ у різних великих слинних залозах містить різний секрет. Так, при гістохімічному забарвленні ШИК-альціановим синім у привушних слинних залозах переважно зустрічається білковий ацинус, його клітини містять дрібні Бергман-ШИК+альціан сині-позитивні білкові гранули, останні витісняють округле ядро до базальної мембрани. Разом

© М. С. Гнатюк, П. А. Гасюк, 2012.

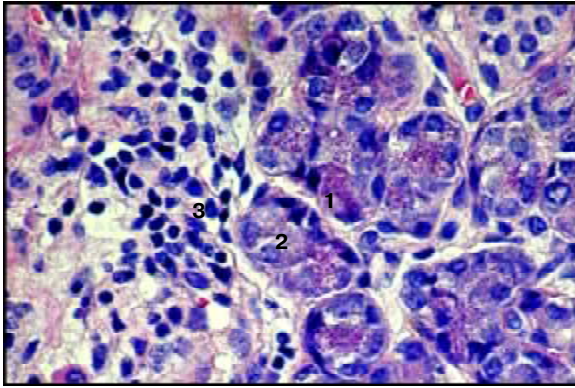


Рис. 1. Серозні ацинуси слинної залози: 1 – сероцити з внутрішньоцитоплазматичним вмістом базофільних гранул; 2 – базальнорозташоване ядро трикутної форми; 3 – лімфо-, гістоцитарна інфільтрація в стромі навколо ацинусів. Забарвлення ШИК-альціановим синім та за Бергманом. Зб. x400.

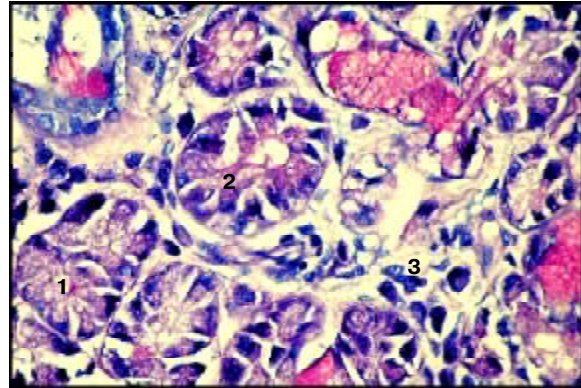


Рис. 2. Ацинус змішаного типу: 1 – сероцити і мукоцити, що співіснують один з одним; 2 – ШИК-позитивний і базофільний секрет у просвіті ацинуса; 3 – лімфо-, гістоцитарна інфільтрація сполучної тканини ацинуса. Забарвлення ШИК-альціановим синім та за Бергманом. Зб. x1000.

із тим, поблизу базальної мембрани розташовуються трикутної форми міоепітеліальні клітини. Слід відзначити, що постійно навколо білкових ацинусів зустрічаються в стромі лімфогістіоцитарні інфільтрати (рис. 1).

Деяко по-іншому побудовані ацинуси піднижньощелепної слинної залози. Так, при гістохімічному забарвленні Бергман-ШИК-альціановим синім ацинуси містять слизові гранули ШИК-позитивного секрету. При цьому їх ядра зміщуються до базальної мембрани, а просвіт ацинусів майже повністю заповнений слизом (рис. 2).

У під'язиковій слинній залозі наявний змішаний слизовий білковий секрет. При цьому серозні клітини, що виділяють білок, містять блідо-рожеві гранули, тоді як мукоцити заповнені ШИК-позитивним секретом (рис. 3).

Певні ацинуси, залежно від секреторного циклу, можуть перебувати у трьох фазах: фазі синтезу секрету, фазі накопичення секрету і фазі виділення секрету. При цьому умовно можна виділити три структурно-функціональні рівні організації гланулоцитів. Перший рівень розташовується біля базальної мембрани, через яку в клітину надходять неорганічні сполуки, вода та низькомолекулярні органічні речовини. Із цих сполук у шорсткому ендоплазматичному ретикулумі синтезуються проміжні продукти секрету. Останні на другому структурно-функціональному рівні переміщуються в зону апарату Гольджі, в якому утворюються просекреторні гранули. Нарешті, третій рівень диференціювання характеризується наявністю секреторних білкових або слизових гранул,

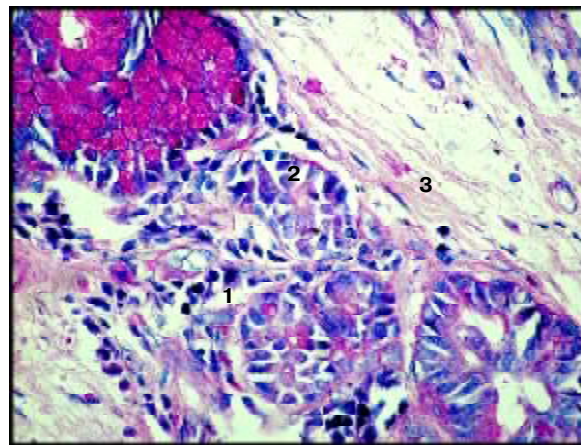


Рис. 3. Серозні ацинуси, оточені міоепітеліальними “корзинчастими” клітинами: 1 – серозні клітини з блідо-рожевими гранулами; 2 – мукоцити з ШИК-позитивним секретом; 3 – стромальна лімфо-, гістоцитарна інфільтрація навколо ацинусів. Забарвлення ШИК-альціановим синім та за Бергманом. Зб. x200.

які виділяються мерокриновим шляхом у просвіт ацинуса.

ВИСНОВКИ. Отже, як показують результати проведених нами гістохімічних досліджень, ацинарні відділи слинних залоз представлені двома диференційованими типами секреторних клітин. Специфіка їх диференціювання проявляється виділенням слизового та білкового секрету, який вивільняється у просвіт ацинусів як апокринно, так і мерокринно через дрібні пори, що містяться на поверхні епітеліоцитів. Вихід секрету забезпечується певною топографією епітеліальних клітин з міоепітеліальними.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Афанасьев Ю. И. Гистология / Ю. П. Афанасьев, Н. А. Юрина. – М. : Медицина, 1999. – 236 с.
2. Быков В. Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека / В. Л. Быков. – СПб. : Специальная литература, 1996. – 247 с.
3. Гемонов В. В. Развитие и строение органов ротовой полости и зубов / В. В. Гемонов, Э. Н. Лаврова, Л. И. Фалин. – М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 87 с.
4. Лісова І. Г. Сучасні уявлення про морфо-функціональні особливості слинних залоз людини / І. Г. Лісова // Укр. мед. альманах. – 2001. – **4**, № 4. – С. 97–102.
5. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс ; пер. с англ. – 3-е изд. – М. : Иностранная литература, 1962. – 926 с.
6. Development of the rat sublingual gland: a light and electron microscopic immunocytochemical study / M. S. Wolff, L. Mirels, J. Lagner [et al.] // Anat. Rec. – 2002. – **266**. – P. 30–42.

М. С. Гнатюк, П. А. Гасюк

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ АЦИНАРНОГО ОТДЕЛА БОЛЬШИХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Комплексное изучение гистохимического строения ацинарного отдела околоушных, поднижнечелюстных и подъязычных больших слюнных желез показало различия в их строении, связанные со спецификой функции, которую они выполняют.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **изучение, строение, ацинарный отдел, слюнные железы.**

M. S. Hnatiuk, P. A. Hasiuk

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

HYSTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ACYNARIC DEPARTMENT STRUCTURE OF HUMAN SALIVARY GLANDS

Summary

Comprehensive study of morphofunctional structure of acynaric of parotid, submandibulars and hypoglossal salivary glands showed the differences in their structure related to the specific functions they perform.

KEY WORDS: **learning, structure, acynaric department, salivary gland.**

Отримано 20.02.12

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

**РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ
ОДОНТОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

У статті проведено аналіз наявних літературних даних щодо участі цитокінів у механізмах розвитку та патогенезі запальних процесів одонтогенного походження. Показано, що цитокіни відіграють суттєву роль у патогенезі запальних процесів щелепно-лицевої ділянки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цитокіни, запальний процес, альвеоліт.

Проблема сучасного лікування та діагностики запальних процесів щелепно-лицевої ділянки є однією з актуальних у стоматології та щелепно-лицевій хірургії. Хворі з гострими запальними процесами щелепно-лицевої ділянки складають вагомую частину (54,3 %) від загальної кількості хворих, яких приймають на лікування у відділення хірургічної стоматології. Але незважаючи на значні успіхи в дослідженнях, спрямованих на покращення лікування та профілактики даної патології, залишаються невивченими механізми розвитку та перебігу гострих запальних процесів щелепно-лицевої ділянки, таких, як абсцеси, флегмони, пародонтити, стоматити і постекстракційні альвеоліти.

Постекстракційні альвеоліти, або запалення стінок альвеоли зуба, є ускладненням, пов'язаним з видаленням зубів. Як свідчать дані літератури, операція з видалення зуба є найбільш розповсюдженою на амбулаторному хірургічному прийомі й складає 82,2–91,0 % від усіх маніпуляцій [1]. За даними різних авторів, екстракцію зуба проводять у середньому 40,0–45,0 % пацієнтів від кількості всіх первинних стоматологічних хворих [1, 2]. Частота постекстракційних альвеолітів складає 20,0 % від кількості пацієнтів, яким було виконано екстракцію зуба, і може досягати 50,0 % при видаленні кутніх зубів. Відомо кілька факторів ризику для виникнення даного ускладнення: куріння, стрес, супутні захворювання.

Незважаючи на те, що патогенез альвеоліту ще не до кінця вивчено, відомо, що його

© А. Є. Демкович, 2012.

виникнення пов'язане із ситуацією, коли згусток крові, який повинен був забезпечити початок процесу загоєння ранки в місці видаленого зуба, не сформувався або був зрушений з місця. В результаті процес загоєння лунки затягується. Поодинокі дані літератури [24, 29] свідчать про те, що при цьому змінюється сам характер формування запального процесу залежно від імунних і регуляторних впливів. Тому є актуальним з'ясування механізмів розвитку даного патологічного процесу.

Метою роботи було проаналізувати літературні дані щодо з'ясування ролі цитокінових порушень у механізмах розвитку запальних процесів щелепно-лицевої ділянки, зокрема постекстракційних альвеолітів.

Відомо, що в патогенезі гострих запальних процесів щелепно-лицевої ділянки, в тому числі й постекстракційних альвеолітів, беруть участь цитокіни – первинні медіатори запалення, які є ключовими в імунній системі як у нормі, так і при патології [7, 8, 28]. Цитокіни – біорегулятори місцевої і загальної дій, медіатори міжклітинних взаємодій імунної відповіді, які контролюють проліферацію, активацію, міграцію і апоптоз клітин [3, 24, 30, 36, 37]. Вони забезпечують міжклітинну взаємодію і займають провідне місце в регуляції інтенсивності запальної реакції організму [22].

Цитокіни – клас невеликих гормоноподібних пептидів і білків (мол. маса – від 8 до 80 кДа) – синтезуються та секретуються клітинами імунної системи і моноцитами, макрофагами. Різновидні біологічні функції цитокінів поділяють на три основні категорії: регулюють

розвиток і функціонування імунної системи, контролюють ріст і диференціювання клітин крові (система гемопоезу), беруть участь у неспецифічних захисних реакціях організму, впливаючи на запальні процеси, згортання крові, кров'яний тиск. Загалом цитокіни беруть участь у регуляції росту, тривалості життя клітин (апоптоз). Вони є молекулами специфічного клітинного "спілкування" в нашому організмі, які синтезуються і декретуються після отримання відповідного сигналу. Таким чином, саме завдяки їм імунна система отримує інформацію про інфікування організму, розвиток запальних процесів, а вже після цього проходить активація захисних механізмів реактивності організму [14, 15].

Система цитокінів включає інтерлейкіни, інтерферони, групи ФНП, нейротрофічні фактори, хемокіни, окремі гормони та гормоніди й ін. [3, 17, 18, 30, 37]. Відомо, що значна активація утворення прозапальних цитокінів прямо залежить від ступеня розвитку запального процесу. Отже, дисбаланс у системі цитокінового комплексу відіграє суттєву роль у патогенезі гострих запальних процесів щелепно-лицевої ділянки [5, 8, 9, 12, 13, 21, 29].

Цитокіни розпізнають і приймають специфічні сигнали через спеціальний рецептор, який знаходиться на поверхні їх клітин. Один і той же рецепторний комплекс є спільним для декількох цитокінів. Як тільки цитокін зв'язується з рецептором, з поверхні клітини передається сигнал ядру і відбувається активація певних генів. Гени цитокінів експресуються, відбувається зчитування інформації і запускається синтез відповідного білка, секреція різних захисних молекул. Залежно від сигналу можуть виділятися лізоцим, гістамін, інтерферони, С-реактивний білок, інтерлейкіни й інші біологічно активні речовини [15, 18, 22, 24].

До інших характеристик цитокінів належать плейотропність та багатофункціональність. Плейотропність проявляється в тому, що один і той же цитокін може діяти на багато видів клітин, викликаючи при цьому різноманітні ефекти залежно від рецепторів клітин-мішеней. Різні цитокіни виконують однакову функцію або мають схожу активність, тобто їм притаманні синергізм та взаємозамінність біологічної дії. Багатофункціональність забезпечується широким спектром дії на різні види клітин і тканин [15, 19]. Активація клітин одним цитокіном викликає синтез іншого – це прояв каскадного характеру цитокінової регуляції. Цитокіни стимулюють або, навпаки, знижують синтез самих себе, інших цитокінів та їх рецепторів, беручи участь у створенні цитокінової

сітки (каскад цитокінів). Взаємоперехрещення між цитокінами приводить до того, що в діях багатьох з них спостерігається синергізм, а деякі цитокіни є антагоністами. Часто в організмі можна спостерігати весь каскад цитокінів із складним зворотним зв'язком [19].

Цитокіни не мають антигенної специфічності в біологічній дії. Вони лише впливають на функціональну активність клітин, які беруть участь у формуванні уродженого і набутого імунітету. Проте, впливаючи на Т- і В-лімфоцити, цитокіни здатні стимулювати антигенозалежні процеси імунної системи.

Більшість цитокінів не синтезується поза запальною реакцією, експресія генів цитокінів виникає у відповідь на проникнення в організм патогенів, антигенне подразнення або пошкодження тканин. Одним із найсильніших стимулів синтезу цитокінів є компоненти клітинних стінок бактерій – пептидоглікани, полісахариди, мураміддипептиди. Цитокіни синтезуються у відповідь на стимуляцію через дуже короткий період часу. Синтез зупиняється за рахунок різних механізмів авторегулювання [19].

Поділяють цитокіни, залежно від їх функцій, на противірусні, прозапальні, протизапальні, протипухлинні, пухлинні. Сучасна класифікація поділяє цитокіни на:

1. Протизапальні цитокіни, які здебільшого виділяються макрофагами у відповідь на інфекцію (IL-1, IL-6, TNF α , хемокіни, макрофагальні запальні білки, I α , I β та ін.).

2. Цитокіни, які необхідні для диференціювання, проліферації та активації моноцитів і лімфоцитів (IL-2, IL-4, трансформуючий фактор- β та ін.).

3. Цитокіни, які необхідні для диференціювання і проліферації кровотворних клітин (IL-3, IL-7, гранулоцитарний макрофагальний колонієстимулювальний фактор та ін.) [15, 20].

Інтерлейкіни, які мають номер від 1 до 25, не належать до однієї підгрупи цитокінів і можуть бути поділені на прозапальні, росткові й диференціюючі фактори лімфоцитів, окремі регуляторні цитокіни [19].

Прозапальним цитокінам належить фундаментальна роль у розвитку запальних процесів щелепно-лицевої ділянки. Вони декретуються багатьма імунокомпетентними клітинами, проте найбільше макрофагами і моноцитами, які, у свою чергу, активуються патогенною мікрофлорою [6, 9, 27]. Баланс цитокінів прозапальної та протизапальної груп є основою для адекватної імунної відповіді на мікробний антиген [21].

Підвищений викид прозапальних цитокінів призводить до деградації позаклітинного мат-

риксу та, як наслідок, до пошкодження тканин пародонта і резорбції альвеолярної кістки [6, 8]. При цьому розвивається дисбаланс продукування про- і протизапальних цитокінів, а це порушує взаємозв'язок в локальній системі імунного захисту тканин щелепно-лицевої ділянки, що в результаті призводить до розвитку запального процесу даної ділянки [9, 16, 28, 33, 38].

Кістковорезорбуючими цитокінами перш за все визнано ІЛ-1 β і ФНП- α [10, 35]. Дію інших цитокінів на кісткову тканину пародонта вивчено менше, і ще менше досліджено вплив інших видів цитокінів на патогенез запальних процесів щелепно-лицевої ділянки. Також встановлено, що ФНП- α стимулює вивільнення ІЛ-1, а він, у свою чергу, стимулює синтез інших цитокінів [10, 28]. ФНП- α є активним стимулятором продукції ІФН- γ , а той, у свою чергу, індукує синтез ФНП- α . Протизапальний цитокін ІФН- γ характеризує хронічне запалення і разом з ІЛ-1 та ФНП- α займає центральну ланку в його розвитку. Крім регуляції секреції ФНП- α , ІФН- γ стимулює також утворення ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-12, разом із тим, ці інтерлейкіни викликають збільшення продукції ІФН- γ [10, 31, 34].

У пацієнтів із запальними захворюваннями щелепно-лицевої ділянки в гострі періоди захворювання різного ступеня тяжкості виявлено збільшення вмісту ІЛ-1 β , ІЛ-6, ФНП- α в сироватці крові [21].

На фоні підвищеної активності прозапальних цитокінів викликає інтерес вивчення концентрації і динаміки ІЛ-10. Баланс цитокінів прозапальної і протизапальної систем є основою для адекватної імунної відповіді на мікробний антиген. ІЛ-10 – багатофункціональний цитокін, що проявляє, головним чином, антизапальну й антицитокінову дії [21, 26, 32]. Даний медіатор пригнічує ефекторні функції макрофагів, Т-клітин, NK-клітин, і ці інгібіторні ефекти пов'язані з блокадою синтезу цитокінів. Досліджено, що в гострий період перебігу запальних процесів щелепно-лицевої ділянки рівень ІЛ-10 мінімальний [21].

Особливий інтерес становило вивчення ролі ФНП- α у перебігу запальної реакції. ФНП- α синтезується в основному тромбоцитами, макрофагами, стимулює ангиогенез, активує фібробласти і стимулює синтез колагенової матриці [21, 23, 39]. Цитокіни беруть участь як регулятори в кожній фазі запального процесу, стимулюючи макрофагальну ланку (прискорюють очищення ранової поверхні), активуючи проліферативно-диференціюючий потенціал фібробластів (запускають репарацію пошкоджених тканин) [4, 25, 29].

Відомо, що протизапальний інтерлейкін ІЛ-4 пригнічує синтез ФНП- α , ІЛ-1 β і ІФН- γ , до якого має сильну антагонічну дію [10, 11]. Від рівня синтезу ІЛ-4 та ІЛ-10 залежать рівновага системи цитокінів і розвиток гуморальної відповіді на пошкоджувальну дію прозапальних цитокінів [10]. Таким чином, визначення цитокінового статусу при запальних захворюваннях щелепно-лицевої ділянки, зокрема постекстракційного альвеоліту, є актуальним, а встановлення особливостей змін співвідношень цитокінів ФНП- α , ІФН- γ , ІЛ-12, ІЛ-4 має наукову новизну в патогенезі їх розвитку.

Отже, в патогенезі розвитку і перебігу запальних процесів щелепно-лицевої ділянки важливу роль відіграють цитокіни – група гормоноподібних білків і пептидів, медіаторів запалення.

Дисбаланс у системі цитокінів відіграє суттєву роль в характері перебігу і наслідків запальних процесів щелепно-лицевої ділянки.

Продукція цитокінів прямо залежить від ступеня тяжкості запального процесу.

Підвищена продукція прозапальних цитокінів супроводжується зниженням рівня протизапальних цитокінів у сироватці крові хворих із запальними процесами одонтогенного походження.

Перспективним напрямком подальших досліджень є комплексне вивчення ролі цитокінів крові та активних форм кисню при запальних захворюваннях щелепно-лицевої ділянки, зокрема при постекстракційних альвеолітах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Безруков С. Г. Оценка эффективности лечебно-профилактической повязки, используемой при удалении зуба / С. Г. Безруков // Другий український міжнародний конгрес. – 2006. – С. 184–187.
2. Бернадская Г. П. Эффективность применения гемостатической губки с анбеном и димексидом

- при лечении альвеолитов / Г. П. Бернадская // Тезисы докладов научно-практической конференции стоматологов Киевской области. – Белая Церковь, 1989. – С. 28.

3. Васильева Г. И. Цитокины – общая система гомеостатической регуляции клеточных функций /

Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Цитология. – 2001. – **43**, № 12. – С. 1101–1111.

4. Изучение механизмов местного иммуномодулирующего действия интерлейкина-1 β . Усиление функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов человека в очаге воспаления под влиянием интерлейкина-1 β / Е. А. Варюшина, В. Г. Конусова, А. С. Симбирцев [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 18–22.

5. Ковальчук Л. В. Роль цитокинов в механизмах развития хронического воспаления при пародонтите / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, М. А. Рогова // Иммунология. – 2000. – № 6. – С. 24–26.

6. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т. П. Иванюшко, Л. В. Ганковская, Л. В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 13–16.

7. Машенко И. С. Обмен цитокинов у больных с генерализованным пародонтитом / И. С. Машенко // Соврем. стоматол. – 2004. – № 1. – С. 73–75.

8. Мельничук Г. М. Патогенетическое значение цитокинов крови в развитии генерализованного пародонтита / Г. М. Мельничук // Соврем. стоматол. – 2006. – № 1. – С. 55–57.

9. Мельничук Г. М. Рівень цитокінів у сироватці крові у хворих на генералізований пародонтит / Г. М. Мельничук // Укр. мед. часопис. – 2005. – № 3/47. – С. 104–106.

10. Мельничук Г. М. Цитокиновый профиль слюны у больных генерализованным пародонтитом / Г. М. Мельничук // Соврем. стоматол. – 2005. – № 3. – С. 71–73.

11. Нейко Є. М. Фізіологія цитокінів / Є. М. Нейко, О. Д. Александрук, М. М. Островський // Гал. лік. вісник. – 2000. – **7**, № 4. – С. 153–158.

12. Орехова Л. Ю. Роль изменений в системе иммунитета при заболеваниях тканей пародонта / Л. Ю. Орехова, Л. Н. Бубнова, Т. В. Глазанова // Пародонтология. – 1999. – № 1. – С. 27–29.

13. Політун А. М. Вплив комплексного лікування на рівень цитокінів про- та протизапальних ланок у ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит / А. М. Політун // Імплантологія. Пародонтологія. Остеологія. – 2008. – № 2. – С. 103–106.

14. Преферанская Н. Г. Лекарственные средства на основании цитокинов / Н. Г. Преферанская // Рос. мед. журн. – 2008. – № 1. – С. 35–38.

15. Роль цитокинового звена в воспалительном процессе / Т. Бухтиарова, З. Омеляненко, В. Хоменко, О. Ядловский // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 9. – С. 22–27.

16. Самойленко А. В. Дисбаланс в системе цитокинов больных генерализованным пародонтитом и его коррекция цитокинотерапией / А. В. Самойленко, И. С. Машенко, А. Ю. Макаревич // Соврем. стоматол. – 2001. – № 2. – С. 41–43.

17. Симбирцев А. С. Клиническое применение препаратов цитокинов / А. С. Симбирцев // Иммунология. – 2004. – **25**, № 4. – С. 247–251.

18. Симбирцев А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – **3**, № 2. – С. 16–22.

19. Симбирцев А. С. Цитокины – новая система

регуляции защитных реакций организма / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 9–16.

20. Скляр Л. Ф. Цитоксинотерапия рекомбинантным интерлейкином-2 (ронколейкином) больных хроническим вирусным гепатитом / Л. Ф. Скляр, Е. В. Маркелова // Цитокины и воспаление. – 2002. – **1**, № 4. – С. 43–46.

21. Соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в крови и ране больных с одонтогенными флегмонами / М. Ш. Мустафаев, З. Ф. Хараева Б. А. Рехвиашвили, Э. М. Тарчокова // Стоматология. – 2007. – № 5. – С. 19–24.

22. Сукманський О. І. Цитокини – нова система біорегуляторів / О. І. Сукманський // Вісник стоматології : науково-практичний рецензований журнал. – 2005. – № 3. – С. 69–74.

23. Тенчурина Т. Г. Оценка влияния факторов роста и тиреотропина на процесс заживления послеоперационной раны / Т. Г. Тенчурина // Рус. врач. – 2005. – № 1. – С. 43–46.

24. Тодоріко Л. Д. Цитокини – нова система регуляції захисних реакцій організму, їх роль у формуванні запалення / Л. Д. Тодоріко, К. В. Рихліцька // Клін. та експерим. патол. – 2004. – **3**, № 1. – С. 91–96.

25. Травма: воспаление и иммунитет / Н. М. Калинина, А. Е. Сюсюкин, Д. А. Вологжанин [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2005. – **4**, № 1. – С. 28–35.

26. Уровень цитокинов плазмы крови при стафилококковой инфекции / Н. А. Курилович, В. Р. Тимочко, Э. А. Кашуба [и др.] // Мед. иммунол. – 2006. – № 2–3. – С. 276–277.

27. Цепов Л. М. Нерешенные вопросы этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта / Л. М. Цепов, А. И. Николаев // Пародонтология. – 2001. – № 1–2. – С. 30–32.

28. Цепов Л. М. Цитокины как новое направление в иммунокоррекции при воспалительных заболеваниях пародонта / Л. М. Цепов // Пародонтология. – 1999. – № 2. – С. 29–31.

29. Цитокиноопосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойно-хирургической патологией / А. А. Останин, О. Ю. Леплина, М. А. Тихонова, Е. А. Шевела // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 23–28.

30. Balkwill F. R. Cytokine Cell Biology: A Practical Approach / F. R. Balkwill. – 3 rd. ed. – Oxford Univ. Press, 2001.

31. Dayer J. IL-1, TNF and their specific inhibitors / J. Dayer, D. Burger // cEurop. Cytokine Netw. – 1994. – **6**, № 6. – P. 563–571.

32. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds / D. M. Copper, L. Yu, P. Hennessey [et al.] // Ann. Surg. – 1994. – № 4. – P. 688–691.

33. Gurses N. Immunohistochemical of limphoid subsets in chronic adult periodontitis / N. Gurses, F. Uhlu, M. Hekimgil // J. of Nihon Univ. School of Dentistry. – 1996. – **38**, № 2. – P. 94–101.

34. Harriston T. Priming with IFN- restores deficient IL-12 production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive donors / T. Harriston, S. Levitz // J. Immunol. – 1997. – **158**, № 1. – P. 459–463.

35. Markovic D. Current knowledge on resorption of

the alveolar ridge / D. Markovic, M. Karsic // Med. Pregl. – 1999. – **52**, № 9–10. – P. 357–361.

36. Mc Gee J. O.'D. (Eds) Oxford Textbook of Pathology V. 1. Principles of Pathology / J. O.'D. Mc Gee, P. G. Isaacson, N. A. Wright. – Oxford, N.Y., Tokyo: Oxford Univ. Press, 1992. – 792 p.

37. Oppenheim J. Cytokine Reference / J. Oppenheim, M. Feldman. – London: Academic Press, 2000. – 2015 p.

38. Reduced CD8⁺ peripheral blood T-lymphocytes in rapid progressive periodontitis / T. Nagasawa, H. Nitta, H. Watanabe, I. Ishikawa // Arch. Oral Biol. – **40** (7). – P. 605–608.

39. Roberts A. B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta) / A. B. Roberts, M. B. Spron // Growth Factors. – 1993. – № 8. – P. 1–9.

А. Е. Демкович

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ОДОНТОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Резюме

В статье проведен анализ имеющихся литературных данных об участии цитокинов в механизмах развития и патогенезе воспалительных процессов одонтогенного происхождения. Показано, что цитокины играют существенную роль в патогенезе воспалительных процессов челюстно-лицевой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины, воспалительный процесс, альвеолит.

A. Ye. Demkovych

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

CYTOKINES IN THE MECHANISM OF DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PROCESSES OF ODONTOGENIC GENESIS

Summary

The article presents an analysis of available literature data on the participation of cytokines in the mechanisms of development and the pathogenesis of inflammatory odontogenic genesis. It was shown that cytokines play a significant role in the pathogenesis of inflammatory processes of maxillofacial area.

KEY WORDS: cytokines, inflammatory process, alveolitis.

Отримано 18.11.11

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

ПОСТУП БІОХІМІЇ НА ПЕРЕХРЕСТІ ХХ–ХХІ СТ.

Проведено огляд літератури, присвяченої становленню біохімії як науки на межі ХХ–ХХІ ст. Показано особливості біохімічних напрямків у певні періоди розвитку науки, відмічено сучасні перспективні наукові біотехнології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: абзими, геноміка, імунні комплекси, нанотехнології, стовбурові клітини.

Біохімія як наука сформувалася у ХХ ст., хоча її корені губляться в сивій давнині. У першій половині ХХ ст. було сформовано основні положення з біохімії та відкрито головні структурні компоненти живих організмів: білки, ліпіди, вуглеводи, нуклеїнові кислоти, гормони та мінеральні речовини. Застосування в біохімічних дослідженнях високочутливих і адекватних методів дослідження сприяло швидкому розвитку біохімії, що проявилось подвоєнням об'єму наукової інформації кожні 10 років. У кінці ХХ ст. та в перше десятиліття ХХІ ст., завдяки новим сучасним технологіям, оснований на використанні найсучасніших фізичних та фізико-хімічних методів, об'єм наукової інформації в біохімії подвоюється кожні 5 років, а то і швидше. Бум наукової інформації про структуру і роль складників живої матерії призвів до появи нових наукових відгалужень від біохімії (біофізика, біофізична хімія, молекулярна біологія), які розширюють можливості людини втручатися в перебіг фізіологічних процесів здорового і хворого організму.

В історії біохімії можна чітко виділити домінування певних напрямків, що припадають на окремі періоди. Так, перша половина ХХ ст. характеризувалась переважанням досліджень біохімії білків і ферментів. У 50–60 рр. чітко використовували в науці вчення про вітаміни і ферменти.

У наступні роки панівним став напрямок, що характеризувався вивченням ролі мінеральних речовин у поєднанні з ферментами і вітамінами. Відбулася класифікація мінеральних речовин на макро- і мікроелементи, формувалось вчення про незамінні біоеlementи

(мідь, залізо, цинк, кобальт) та біогеохімічні зони, яким властивий надмірний або обмежений вміст цих речовин у ґрунтах, продуктах харчування, на що живі організми реагують певними відхиленнями від норми.

Від початку 50-х рр. минулого століття з відкриттям плазматичних та внутрішньоклітинних мембран почались бурхливий розвиток біохімії клітини і вивчення всіх проявів життя на субклітинному рівні – досліджувалась роль ядра, мітохондрій, ендоплазматичної сітки, лізосом тощо. Таким чином, людина постійно збагачує своє уявлення про суть життя з біохімічної точки зору. В цей період інтенсивно вивчали різні види окисно-відновних процесів у клітині (оксидазне, переоксидазне, пероксидне, мікросомальне).

Стрімкий розвиток біохімії та молекулярної біології на межі ХХ–ХХІ ст. зумовив так званий інформаційний вибух, у результаті якого остаточно сформувалася нова біологічна дисципліна – геноміка із завданням вивчити структуру генів живих організмів, з'ясувати експресію та функції всіх генів, що входять до складу геному. З розвитком геноміки тісно пов'язані протеоміка, генетична інженерія та біоінформатика. Ефективний розвиток геноміки забезпечується використанням комп'ютерних методологій для вирішення інформаційних проблем [6].

На основі геноміки та інформатики створюються сучасні молекулярні біотехнології, що зумовлюють злиття фундаментальної біології з медициною та формування так званої біомедицини. Остання включає такі підрозділи, як генна діагностика, генна терапія, отримання рекомбінантних білків, специфічних моно-

клональних антитіл. Важливою складовою сучасних біотехнологій є клітинні технології, зокрема вирощування і використання стовбурових клітин. Поєднання генної терапії з технологією стовбурових клітин стає одним з дуже перспективних напрямків у медицині й біології. Ці напрямки інтенсивно розробляють в Інституті молекулярної біології і генетики НАНУ. Тут проводять фундаментальні дослідження тест-систем для генної діагностики спадкових та онкозахворювань, розробку аналітичних приладів нового покоління – біосенсорів [13, 14].

Великий крок зроблено в генній інженерії та використанні антитіл (імуноглобулінів) [5]. Опрацьовуються методи конструювання антитіл із заданою специфічністю дії (С. В. Комісаренко), створюються рекомбінантні моно- і біовалентні антитіла, розробляються бібліотеки імуноглобулінів із практично необмеженою кількістю специфічностей [5]. Уперше (1986 р.) отримано антитіла з каталітичною активністю (абзими), що було досягнуто шляхом скерованої імунізації тварин кон'югатами стабільних аналогів перехідних станів хімічних реакцій. Такі антитіла, що здатні гідролізувати пептиди, виділили із сироватки крові хворих на бронхіальну астму. Їх назвали “натуральними”, або “природними”, абзимами [7, 17].

Ці та подібні дослідження сприяли формуванню підрозділу молекулярної біології – абзимології. У наступні роки було вивчено цілий ряд абзимів, які проявляють протейназу, ДНК- і РНК-азну та полісахаридгідролазну здатність. Найбільше природних абзимів виявлено в крові людей, хворих на автоімунні захворювання (астма, системний червоний вовчак, розсіяний склероз та ін.). Склалося уявлення, що абзими є наслідком порушення імунного статусу організму. Але в 1991 р. з молока клінічно здорових жінок уперше виділено абзими, що викликають фосфорилювання казеїну. Отже, поява абзимів необов'язково пов'язана з патологією, вони можуть бути у клінічно здорових людей. Згодом у молоці людини відкрили абзими, що володіють протейніназою, ліпідкіназою та полісахаридкіназою активністю. А з плазми крові здорових людей було виділено імуноглобулін G, здатний інгібувати протейніназну активність абзимів [7, 18]. Подальшого розвитку набув напрямок використання ензимів у лікуванні захворювань. У кінці 50-х рр. в ензимотерапії використовували, головним чином, ензимні суміші (панкреатин, хімотрипсин, амілаза, ліпаза і папаїн). Спожиті *per os*, вони проявляли протизапальну, імуномодулюючу та протинабрякову дії і застосовувалися у травматології, при лікуванні судинних, автоімунних

онкологічних захворювань. Установлено, що для ензимів характерний широкий спектр імуномодулюючої та імунонормалізуючої дій. Вони позитивно впливають на гуморальний (антитіла, імунокомплекси) та клітинний імунітет (ефективні Т-лімфоцити, цитокіни) [19]. Але найбільш важливою є їх дія на природний імунітет та запальні процеси. Донедавна вважалось, що патогенна дія імунокомплексних та автоімунних захворювань пов'язана з надмірним утворенням і нагромадженням імунокомплексів та розвитком запальної реакції. Нові дані свідчать про те, що імунокомплекси уражають всю імунну систему. Процес починається з фагоцитозу імунокомплексів клітинами моноклеарної фагоцитарної системи за посередництвом імуноглобулінових рецепторів і рецепторів комплементу. Одночасно активуються фагоцитарні клітини, в яких проходить респіраторний спалах. Під впливом протеаз рослинного і тваринного походження зменшується кількість імунокомплексів. Ці ензими викликають проліферацію та активацію Т-лімфоцитів, збільшення кількості Т-хелперів і зменшення супресорних клітин. Одночасно посилюється синтез ключових цитокінів, зокрема TNF-альфа і TNF-бета (TNF – tumor nekrosis factor). Важливе значення має і цитокінтрансформуючий фактор росту (TGF-бета), який обмежує розмноження ракових клітин. Широко застосовують трансфер-фактор як імуномодулятор, який використовують при лікуванні автоімунних захворювань (діабет, рак, шкірні хвороби) [8, 9, 11].

Значним прогресом для медицини і біології є впровадження в практику нових біотехнологій, зокрема стовбурових клітин. У 2006 р. японський професор Яманака запропонував унікальну технологію генерування стовбурових клітин зі шкіри людини. Цим було закладено основу відновної медицини майбутнього, яка знаходить собі все більше прихильників у всьому світі. Стовбуровим клітинам притаманна унікальна властивість: самовідтворюватись і диференціюватись в різні типи спеціалізованих клітин [12]. Це означає, що будь-яка стовбурова клітина може стати клітиною шкіри, печінки, серця, легень тощо. Така фантастична властивість стовбурових клітин знайшла собі застосування в онкології, реконструктивній хірургії, трансплантації органів, кардіології, одержанні крові та ін. [3, 4, 10].

В Україні можливість застосування стовбурових клітин вивчають у багатьох науково-медицих центрах. Зокрема, в Інституті клітинної терапії проводять клінічні випробування стовбурових клітин із пуповинної крові, створено перший кріобанк стовбурових клітин

пуповинної крові. Зараз апробовують лікування стовбуровими клітинами хворих на панкреанекрози, цирози печінки, цукровий діабет II типу.

За допомогою технології стовбурових клітин уперше було одержано повноцінну штучну тканину кишечника людини. Це перша робота, яка показала, що індуковані плюрипотентні стовбурові клітини в пробірці можна перетворити на тканини людського організму. Стовбурові клітини утворюються тільки в період ембріонального розвитку. Зараз за допомогою сучасних технологій із клітин і тканин дорослого організму одержують нові клітини з властивостями стовбурових. Їх називають індукованими плюрипотентними клітинами. Але для того, щоб направити розвиток клітин у потрібному напрямку, наприклад з метою утворення тканини кишечника людини, додають хімічні реактиви та біологічні молекули, імітуючи в пробірці умови росту тканин на стадії ембріонального розвитку людини [15]. Протягом 28 днів ці послідовні кроки дозволяють науковцям отримати тканини з тримірною структурою, яка віддзеркалює структуру тканин кишечника немовляти в утробі матері.

Дослідження людських стовбурових клітин дасть змогу з'ясувати ті складні біохімічні процеси, які відбуваються під час ембріонального розвитку людини, зокрема зрозуміти механізм перетворення недиференційованих клітин на диференційовані. Адже такі хвороби, як злоякісний ріст чи аномалії розвитку людини, виникають внаслідок неправильного поділу клітин та їх диференціації. Встановлення молекулярних і генетичних механізмів контролю цих процесів може допомогти зрозуміти виникнення захворювань і опрацювати нові стратегії їх лікування. Стовбурові клітини, спрямовані на диференціацію у специфічні типи клітин, можна використовувати для лікування багатьох захворювань, зокрема хвороби Паркінсона, інсультів, опіків, ревматоїдного артрити тощо [1, 8, 9]. Дослідження, проведені на лабораторних тваринах, показують, що стовбурові клітини з кісткового мозку при пересадженні в уражене серце можуть генерувати клітини серцевого м'яза і замінити тканини серця [9]. Зрозуміло, що в основі диференціації клітин, їх трансплантації та приживлення лежить складний механізм біохімічних перетворень, знання яких необхідне для практичного застосування [2, 7].

Важливим рушієм наукового процесу, основанийого на біохімічних категоріях і принципах, є нанотехнології. Нанотехнологія як різновидність біотехнології характеризується мініатюризацією приладів і матеріалів, які

застосовують у біомедичних дослідженнях. Відбувається поступовий перехід досліджень із мікросвіту в наносвіт, тобто в масштаби, характерні для окремих молекул (один нанометр складає 10^{-9} м). В кінцевому результаті, завдяки зменшенню розмірів вимірювальних приладів, стає можливим визначити не концентрацію молекул, а їх кількість. Спеціалісти з нанобіотехнологій використовують фундаментальні знання з попередніх періодів розвитку науки для конструювання аналогів живих об'єктів або їх частин, надаючи їм властивостей, що перевершують за своїми характеристиками живі системи [18–20].

Нанобіотехнологія – міждисциплінарна галузь, але головна складова медицини. Це і створення нових систем діагностики і контролю лікування, розробка нових лікарських сполук та систем адресної доставки ліків [15, 16]. Реальністю стає створення біосумісних матеріалів для заміщення пошкодженої тканини чи органа. Відпрацьовані або патологічно змінені біоструктури з метою попередження деградації, малігнізації або обструкції можна буде вибірково усувати. Розрізняють три головні напрямки розвитку сучасних нанобіотехнологій [21, 22]. Перший напрямок передбачає надання системам шляхом модифікації властивостей, необхідних для забезпечення певних функцій, використання мікроорганізмів як продуцентів наноматеріалів. Другий напрямок – напівсинтетичні нанобіотехнології. Тут використовують біополімери: білки, нуклеїнові кислоти й інші біомолекули та їх комплекси для утворення різних біонанотехнологічних пристроїв (пор, сенсорів, біомоторів). На основі самоукладки цих структур буде створено біокомп'ютери, що знайдуть своє застосування в діагностиці. Третій напрямок – “синтетичні” нанобіотехнології, призначені створювати пристрої для вимірювання молекулярних похибок і діагностики захворювань.

Існують нанобіотехнології одержання в природних біореакторах (бактеріальних клітинах) різних наночастинок, які застосовують у різних напрямках: в діагностиках з використанням імунохімії, виділення нуклеїнових кислот, контролі за адресною доставкою ліків. Можна буде за допомогою бактеріального синтезу отримувати наночастинки, що містять метали. Наприклад, металопептид, металонуклеотидні комплекси з розміром мікропристроїв до 2-х нанометрів і менше. Синтез наноструктур можна реалізувати і в розчинах з використанням клітинної стінки бактерій, тобто будуть створені мембрани з білків, що мають певні контрольовані розміри пор. Звичайно, нанобіотехнології використовуватимуть

не тільки окремі молекули, але і великі молекулярні ансамблі (наприклад віруси). Такі структури можна застосовувати як контейнери для інших наночастинок. Дуже перспективним є спосіб доставки ліків до клітин організму за допомогою нанобіотехнології. Але тут виникає проблема безпечності таких середників і способів їх доставки [23, 24].

Треба відзначити, що нові наукові технології і досягнення сучасної біохімії та її дочірніх дисциплін стали можливими тільки завдяки працям науковців із класичної біохімії. В розвиток біохімії ХХ ст. значний внесок зробили українські науковці. Першим, хто ініціював дослідження нуклеїнових кислот, був академік І. Я. Горбачевський, який ще в 1882 р. розпочав вивчення нуклеїнового обміну, синтезувавши сечову кислоту як кінцевий продукт розпаду нуклеїнових кислот. А на початку ХХ ст. він вперше у світі запропонував теорію біосинтезу сечової кислоти, основні положення якої не втратили свого значення і сьогодні.

Значний внесок у вчення про імунітет, зокрема про фагоцитоз, зробив лауреат Нобелівської премії І. І. Мечников.

О. М. Бах сприяв розробці теорії біологічного окиснення, зокрема механізму перекисного окиснення, спираючись на який, німецький дослідник О. Варбург запропонував теорію тканинного дихання. Перший президент УАН академік В. І. Вернадський розробив нові наукові напрямки – біогеохімію, кристалографію. Він опрацював учення про ноосферу як сферу панування розуму. В. І. Вернадський, ризикуючи життям, уперше в 1940 р. у своїй праці “Біогеохімічні очерки” розкритикував марксистський метод діалектичного матеріалізму як такий, що зовсім не може дати основ для розвитку науки.

П. Г. Костюк опрацював теорію іонних каналів у плазматичних мембранах, механізм транспорту іонів через мембрани [10].

О. Й. Войнар, Г. О. Бабенко – основоположники вчення про мікроелементи в медицині. Завдяки їм цей напрямок знайшов широке визнання не тільки в Україні, але й далеко за її межами.

О. В. Палладін зробив внесок у вчення про вітаміни. Він уперше шляхом синтезу одержав водорозчинний вітамін К і довів його роль у згортанні крові.

Академік С. В. Комісаренко плідно опрацьовує проблему імунітету.

Академік Малюта – праці з молекулярної біології, автоімунні хвороби, синтез біосенсорів, які застосовують в експериментальній і практичній медицині.

Важливо, що завдяки науковцям, які працюють на кафедрах біохімії в університетах та інститутах, було вивчено метаболізм біологічно важливих сполук (білки, ліпіди, вуглеводи, нуклеїнові кислоти, мінеральні речовини тощо) як у нормі, так і за різних патологічних станів. Результати їх досліджень впроваджують у практичну медицину, ветеринарію, сільське господарство. Зокрема, було розкрито механізми впливу на організм різних сторонніх чинників, розкрито патогенез дії ксенобіотиків на різні види окисних процесів. Показано роль антиоксидантів, сорбентів у збереженні стаціонарного стану організму. Вивчено і показано практичну доцільність дослідження активних форм кисню та азоту. Встановлено роль захисних систем організму (антиоксидантної, детоксикаційної, імунної) за дії різних патологічних чинників. Одержано ряд патентів на винаходи і практичне застосування ентеросорбентів, металокомплексів трансплантації гепатоцитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бехтерева Н. М. Про трансплантацію ембріональних нервових тканин в лікуванні паркінсонізму / Н. М. Бехтерева, Е. Г. Гилерович, Ф. А. Турчин // Невропатологія і психіатрія ім. С. С. Корсакова. – 1990. – № 11. – С. 10–13.
2. Ватутин Н. Т. Роль трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин в регенерації пошкоджених тканин / Н. Т. Ватутин, В. К. Гринь, Н. В. Калинкина // Укр. мед. часопис. – 2003. – № 3. – С. 42–49.
3. Владимиров В. К. Новини захисту рослин / В. К. Владимиров // Біотехнологія в Україні: проблема трансгенної картоплі. – 1999. – № 8. – С. 65–75.
4. Грищенко В. І. Клітинна і тканинна терапія:

сучасне і майбутнє / В. І. Грищенко // Трансплантологія. – 2000. – 1, № 1. – С. 15–17.

5. Ефетов К. А. Моноклональна імуносистематика / К. А. Ефетов // Матер. IX укр. біохім. з'їзду. – 2006. – 1. – С. 39–40.

6. Єльська Г. В. Геноміка та протеоміка як основа сучасних технологій / Г. В. Єльська, Д. М. Говорун // Матер. IX укр. біохім. з'їзду. – 2006. – 1. – С. 6.

7. Кіт Ю. А. Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини і деякі механізми регуляції їх активності / Ю. А. Кіт, Р. С. Стойка // Матер. IX укр. біохім. з'їзду. – 2006. – 1. – С. 20.

8. Комісаренко С. В. Інженерія та використання

антитіл / С. В. Комісаренко // Матер. IX укр. біохім. з'їзду. – 2006. – 1. – С. 6.

9. Кордюм В. А. Стволові клітини і їх терапевтичний потенціал / В. А. Кордюм, В. І. Дерябіна // Мистецтво лікування. – 2004. – № 2. – С. 7–9.

10. Костерин С. А. Транспорт іонів кальцію у гладких м'язів / С. А. Костерин. – К. : Наукова думка, 1990. – С. 216.

11. Кравцов А. В. Механізм регуляції векторних ферментів біомембран / А. В. Кравцов, І. Р. Алексєнко. – К. : Наукова думка, 1990. – С. 176.

12. Лукаш Л. Л. Стволові клітки млекопитающих in vitro как основа для создания современных биотехнологий / Л. Л. Лукаш, С. В. Васильовська // Біополімери і клітина. – 2001. – 17, № 3. – С. 205–211.

13. Маруненко І. М. Викладання біології / І. М. Маруненко // Біотехнологія: перспектива розвитку. – 1997. – № 7. – С. 12.

14. Москаленко В. Ф. Нанонаука: стан, перспективи досліджень / В. Ф. Москаленко, Л. Г. Розенфельд, І. С. Чекман // Науковий вісник Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. – 2008. – № 4. – С. 19–25.

15. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти / Б. Патон, В. Москаленко, І. Чекман, Б. Мовчан // Вісн. НАН України. – 2009. – № 6. – С. 18–26.

16. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) / І. С. Чекман, А. М. Сердюк, Ю. І. Кундієв [та ін.] // Довкілля та здоров'я. – 2009. – № 1 (48). – С. 3–7.

17. Селезнева Е. В. Влияние трансплантации стволовых клеток на регенерацию панкреатических островков / Е. В. Селезнева // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. – 2006. – 142, № 3. – С. 248.

18. Стойка Р. С. Сучасна стратегія біохімічних досліджень ролі біологічно активних речовин / Р. С. Стойка // Матер. IX укр. біохім. з'їзду. – 2006. – 1, № 11. – С. 14.

19. Субота Н. П. Біохімічні та імунологічні механізми дії трансплантованих фетальних препаратів / Н. П. Субота, В. А. Пітько, В. І. Грищенко // Трансплантологія. – 2000. – 1, № 1. – С. 290–292.

20. Сучков А. Нанотехнологии: когда наноразмер имеет вселенские размеры / А. Сучков // InfoCom.uz. – 2004. – № 3. – С. 25–26.

21. Baun A. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing / A. Baun // Ecotoxicology. – 2008. – 17. – P. 387–395.

22. Dreher K. L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles / K. L. Dreher // Toxicol. Sci. – 2004. – 77. – P. 3–5.

23. Moore R. Nanomedicine and risk: further perspective / R. Moore // Med. Device Technol. – 2007. – 18, № 6. – P. 28–29.

24. Hoet P. H. M. Nanoparticles – known and unknown health risks / P. H. M. Hoet, I. Bruske-Hohlfeld, O. V. Salata // J. Nanobiotechnology. – 2004. – № 2. – P. 1–15.

Я. И. Гонский

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО РАЗВИТИЕ БИОХИМИИ НА РУБЕЖЕ XX–XXI В.

Резюме

Проведен обзор литературы, посвященной становлению биохимии как науки на рубеже XX–XXI в. Показано особенности биохимических направлений в определенные периоды развития науки, отмечено современные перспективные научные биотехнологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: абзимы, геномика, иммунные комплексы, нанотехнологии, стволовые клетки.

Ya. I. Honskyi

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

MOVEMENT OF BIOCHEMISTRY IN XX–XXI CENTURIES

Summary

There was made the literature review devoted to the formation of biochemistry as a science in XX–XXI centuries. There were shown the peculiarities of biochemical directions at certain development periods of the science and the modern perspective scientific biotechnologies were mentioned.

KEY WORDS: abzim, genomics, immune complexes, nanotechnologies, stem cells.

Отримано 22.02.12

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