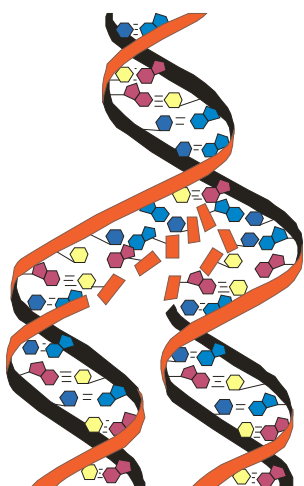


Всеукраїнська громадська наукова організація "Українська академія наук"
ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України"

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



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

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

2(51) 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 МОЗ України" (протокол № 11 від 24 квітня 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

Федорчук О. Г. (Київ) ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ВИСОКОАНГІОГЕННОГО ВАРІАНТА КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬОІС: ЗВ'ЯЗОК З МЕТАСТАТИЧНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

5

Максимович Я. С., Драницина А. С., Сокур О. В., Остапченко Л. І. (Київ) ЕКСПРЕСІЯ ІЗОФОРМ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ТА ЗАГОЄННЯ СТРЕСІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ

11

Воронкова Ю. С., Скорик О. Д., Штеменко Н. І. (Дніпропетровськ) ХАРАКТЕРИСТИКА АНЕМІЧНОГО ТА ГІПОГЛІКЕМІЧНОГО СТАНУ КРОВІ ПРИ РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ЗАСТОСУВАННІ ЦИСПЛАТИНУ І КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІУ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ВВЕДЕННЯ

18

Пясковська О. М. (Київ) АНТИАНГІОГЕННА ДІЯ ЦИКЛОФОСФАМУ ВІДНОСНО МЕТАСТАЗУЮЧИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН

25

Поляков В. В., Сенаторова Г. С. (Харків) ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ В ДІТЕЙ ІЗ БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ ТА РЕЦИДИВНИМ ОБСТРУКТИВНИМ БРОНХІТОМ

30

Голік М. Ю., Українець І. В., Кравченко В. М., Петрушова Л. О. (Харків) СИНТЕЗ ТА ДІУРЕТИЧНА ДІЯ АЛКІЛАМІДІВ 4-ГІДРОКСИ-2-ОКСО-1,2,5,6,7,8-ГЕКСАГІДРОхіНОЛІН-3-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

35

Шлюсар О. І., Блажеєвський М. Є., Александрова Д. І. (Чернівці, Харків, Одеса) КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТРИФЛЮОПЕРАЗИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРІЇ У ВИГЛЯДІ S-ОКСИДУ

39

Сусла О. Б. (Тернопіль) ОСОБЛИВОСТІ ПОРУШЕНЬ МІНЕРАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ХВОРИХ ІЗ КАЛЬЦИНОЗОМ КЛАПАНІВ СЕРЦЯ НА ДОДІАЛІЗНОМУ ТА ДІАЛІЗНОМУ ЕТАПАХ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

44

Олещук О. М. (Тернопіль) ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ІІ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ЗА ПРИСУТНОСТІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

49

Яковлева Л. В., Немайчих О. Д., Кошова О. Ю. (Харків, Луганськ) ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ У ФОРМІ ЖЕЛЕ

54

Філіпцова К. А., Вовчук І. Л. (Одеса) ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А ЗЛОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

59

Щерба В. В., Корда М. М. (Тернопіль) ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПАРОДОНТИТУ НА ФОНІ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ

64

Іскра Р. Я. (Львів) БІЛКОВИЙ ОБМІН У ВАГІТНИХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ЦИТРАТУ НАНОХРОМУ

69

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Fedorchuk O. H. (Kyiv) IMMUNOGENIC PROPERTIES OF HIGH-ANGIOGENIC LEWIS LUNG CARCINOMA: CORRELATION WITH METASTATIC POTENTIAL

5

Maksymovych Ya. S., Dranytsyna A. S., Sokur O. V., Ostapchenko L. I. (Kyiv) EXPRESSION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE ISOFORMS UNDER DEVELOPMENT AND HEALING OF STRESS-INDUCED INJURIES OF RAT GASTRIC MUCOSA

11

Voronkova Yu. S., Skoryk O. D., Shtemenko N. I. (Dnipropetrovsk) CHARACTERISTICS OF THE ANAEMIC AND HYPOGLYCEMIA STATE OF BLOOD AT THE GUERIN'S CARCINOMA GROWTH AND APPLICATION OF CISPLATINUM AND RHENIUM CLUSTER COMPOUNDS AT DIFFERENT FORMS OF INTRODUCTION

18

Pyaskovska O. M. (Kyiv) ANTIANGIOGENIC ACTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE TO EXPERIMENTAL METASTATIC TUMORS

25

Polyakov V. V., Senatorova H. S. (Kharkiv) THE FEATURES OF CONNECTIVE TISSUE METABOLISM IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AND RECIDIVATING OBSTRUCTIVE BRONCHITIS

30

Holik M. Yu., Ukrainets I. V., Kravchenko V. M., Petrushova L. O. (Kharkiv) SYNTHESIS AND DIURETIC ACTION OF 4-HYDROXY-2-OXO-1,2,5,6,7,8-HEXAHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID ALKYLAMIDES

35

Shliuser O. I., Blazheyevskiy M. Ye., Aleksandrova D. I. (Chernivtsi, Kharkiv, Odessa) QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRIFLUOPERAZINE BY SPECTROFLUORIMETRIC METHOD AS ITS SULFOXIDE IN DRUG

39

Susla O. B. (Ternopil) CHARACTERISTICS OF MINERAL METABOLISM DISTURBANCES IN PATIENTS WITH CARDIAC VALVE CALCINOSIS UNDER PREDIALYSIS AND DIALYSIS STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

44

Oleshchuk O. M. (Ternopil) PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AT ISCHEMIC-REPERFUSION OF LIVER OF RATS AT THE PRESENCE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

49

Yakovlieva L. V., Nemyatykh O. D., Koshova O. Yu. (Kharkiv, Luhansk) RESEARCH OF IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF ECHINACEA PURPUREA DRUG IN JELLY FORM

54

Filipstsova K. A., Vovchuk I. L. (Odessa) PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CARBOXYPEPTIDASE A OF THE MALIGNANT TUMOR TISSUE OF THE MAMMALIAN GLAND

59

Shcherba V. V., Korda M. M. (Ternopil) PATHOGENETIC PECULIARITIES OF PERIODONTITIS IN CHRONIC HEPATITIS

64

Iskra R. Ya. (Lviv) PROTEIN METABOLISM IN PREGNANT RATS UNDER THE ACTION OF CITRATE NANOCHROMIUM

69

Йолтухівський М. М. (Вінниця) ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ МЕТИЛУВАННЯ, ТРАНССУЛЬФУВАННЯ ТА УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В НИРКАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЦИСПЛАТИНОВОЇ НЕФРОПАТІЇ

72

Yoltukhivskiy M. M. (Vinnytsya) STUDY OF THE PROCESSES OF METHYLATION, TRANSULFURATION AND HYDROGEN SULFIDE FORMATION IN RAT KIDNEY WITH CISPLATIN NEPHROPATHY

Доцюк Л. Г., Кушнір І. Г., Бойчук Т. М. (Чернівці) ІНТРАРЕНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЦИРКАДΙΑННОГО РИТМУ ФУНКЦІЇ НИРОК

78

Dotsyuk L. G., Kushnir I. G., Boichuk T. M. (Chernivtsi) INTRARENAL MECHANISMS OF CIRCADIAN RHYTHM KIDNEY FUNCTION REGULATION

Петрух Л. І., Коваленко М. М., Михалик О. І., Павленко О. В., Панич О. П. (Львів) ВЗАЄМОДІЯ ФЛУОРЕНІВ З ОСНОВНИМИ КОМПОНЕНТАМИ МОЛОКА

82

Petrukh L. I., Kovalenko M. M., Myhalyk O. I., Pavlenko O. V., Panych O. P. (Lviv) INTERACTION OF FLUORENS AND BASIC MILK COMPONENTS

Пацкань Л. О., Кліщ І. М. (Тернопіль) ВПЛИВ ПАРАЦЕТАМОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ НІТРИТІВ

87

Patskan L. O., Klishch I. M. (Ternopil) THE IMPACT OF PARACETAMOL ON THE LIPID PEROXIDATION ACTIVITY PROCESSES AND ON THE STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM OF THE RATS ON THE BACKGROUND OF PROLONGED USE OF NITRITE

Вербіловський Я. П., Ільченко О. В. (Вінниця) ВИЗНАЧЕННЯ ЛОВАСТАТИНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

92

Verbilovskyi Ya. P., Il'chenko O. V. (Vinnytsya) HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF LOVASTATIN IN PLASMA

Цимбалюк А. В. (Тернопіль) АНТИТОКСИЧНИЙ ФЕНОМЕН КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОГО КСЕНОДЕРМАЛЬНОГО СУБСТРАТУ

96

Tsybaliuk A. V. (Ternopil) ANTITOXIC PHENOMENON OF THE CRIOLIOFILIZED XENOGRFT SUBSTRATE

Марущак М. І. (Тернопіль) МЕТАБОЛІЧНІ ПОРУШЕННЯ У ЩУРІВ З ГОСТРИМ УРАЖЕННЯМ ЛЕГЕНЬ

99

Marushchak M. I. (Ternopil) METABOLIC DISORDERS IN THE RATS WITH ACUTE LUNG INJURY

Ісаєв С. Г., Девяткіна А. О., Єрьоміна Г. О., Семенов А. М., Мазейко А. Ю., Сокурєнко І. А., Шевельова Н. Ю. (Харків) СИНТЕЗ, БУДОВА ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НІТРО- ТА ХЛОРАЗМІЩЕНИХ 9-(R-ІЛІДЕН)ГІДРАЗІНОАКРИДИНІВ

104

Isaiev S. H., Deviatkina A. O., Yeriomina A. O., Semenov A. M., Mazeiko A. Yu., Sokurenko I. A., Shevelyova N. Yu. (Kharkiv) SYNTHESIS, STRUCTURE AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NITRO- AND CHLOROSUBSTITUTED OF 9-(R-ILIDEN)HYDRAZINOACRIDINES

Загайко А. Л., Филимоненко В. П., Красільнікова О. А., Соловйова Л. М., Огай Ю. О. (Харків, Ялта) ВПЛИВ СУБСТАНЦІЇ "ПОЛІКАТЕХІН" НА ВМІСТ ПІАУРОНОВОЇ КИСЛОТИ У ШКІРІ ЩУРІВ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ФІБРОБЛАСТІВ

108

Zahayko A. L., Fylymonenko V. P., Krasilnikova O. A., Solovyova L. M., Oghai Yu. O. (Kharkiv, Yalta) THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS

ПРОБЛЕМИ І ДОСВІД ВИКЛАДАННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ТА МЕДИЧНОЇ ХІМІЇ

Ніженковська І. В., Стеченко О. В., Ягупова А. С., Яніцька Л. В. (Київ) БІООРГАНІЧНА ТА БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ НА МЕДИКО-ПСИХОЛОГІЧНОМУ ФАКУЛЬТЕТІ: СТАН ВИКЛАДАННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

112

PROBLEMS AND EXPERIENCE OF BIOLOGICAL AND MEDICAL CHEMISTRY TEACHING

Nizhenkovska I. V., Stechenko O. V., Yahupova A. S., Yanitska L. V. (Kyiv) THE TEACHING OF BIOORGANIC AND BIOLOGICAL CHEMISTRY IN THE MEDICAL-PSYCHOLOGICAL DEPARTMENT: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

О. Г. Федорчук
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ВИСОКОАНГІОГЕННОГО ВАРІАНТА КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС: ЗВ'ЯЗОК З МЕТАСТАТИЧНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

Досліджено імуногенні властивості високоангіогенного (LLC/R9) і низькоангіогенного (LLC) варіантів карциноми легені Льюїс та проаналізовано їх зв'язок з метастатичним потенціалом. Показано, що LLC/R9, порівняно з LLC, активує антитілогенез у селезінці. Висловлено припущення, що низький рівень метастазування LLC/R9 частково зумовлений антитілозалежними цитотоксичними реакціями.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: високо- та низькоангіогенні пухлини, антитілогенез, антитілозалежна цитотоксичність.

ВСТУП. Із середини минулого століття розвиток пухлинного процесу нерозривно пов'язують з фізіологічними та патофізіологічними процесами організму-пухлиноносія. Біологічні властивості пухлинних клітин визначають характер взаємозв'язків між пухлиною та фізіологічними системами організму, результатом чого стає специфіка перебігу пухлинного процесу [1, 5, 8]. Відомо, що біологічні властивості пухлини позначаються значним чином і на функціях імунної системи. З одного боку, в процесі *in vivo* росту відбувається так звана імуноселекція пухлинних клітин: позитивної селекції зазнають клітини, здатні уникнути імунного нагляду, тобто низькоімуногенні [14, 18]. З іншого боку, пухлинні клітини виробляють низку чинників, що модулюють функції ефекторних клітин як уродженого, так і адаптивного імунітету, формуючи у такий спосіб сприятливе імунологічне мікрооточення пухлини [15, 21, 23]. У такому мікрооточенні можливим стає ріст навіть високоімуногенних пухлинних клітин.

Раніше нами було показано, що два варіанти карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9) істотно відрізняються за своїм проліферативним, ангіогенним та метастатичним потенціалом. LLC/R9, порівняно з LLC, характеризується великою швидкістю росту первинної пухлини, високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом. Зазначені біологічні особливості клітин LLC/R9 позначилися на їх чутливості до дії антиангіогенних чинників,

що було підтверджено високою ефективністю протипухлинної дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу в мишей з перещепленою LLC/R9 [3, 6, 10, 12].

Метою даної роботи було провести порівняльний аналіз деяких показників імуногенності клітин карциноми легені Льюїс з різним ангіогенним та метастатичним потенціалом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мишах-самцях лінії C57/BL₆ віком 2–2,5 міс., масою 18–23 г розведення віварію ІЕПОР. Усі дослідження на тваринах було виконано згідно з правилами, прийнятими Етичним комітетом ІЕПОР.

Пухлинні клітини (LLC/R9, LLC) нарощували в середовищі RPMI (Sigma, США) з додаванням 10 % ETC (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину за стандартних умов і перещеплювали в м'язи стегна в кількості 1×10^6 на одну тварину в 0,1 мл фізіологічного розчину.

Було сформовано три групи тварин (у кожній групі по 9 тварин): експериментальну групу (миші з LLC/R9), групу позитивного контролю (миші з LLC), групу негативного контролю (миші без пухлин – інтактні тварини). В процесі росту LLC/R9 оцінювали масу та морфологію селезінки, відносний вміст мононуклеарних спленічних лейкоцитів та їх мітогеніндуковану проліферативну активність, а також загальний рівень сироваткових імуноглобулінів у мишей з LLC/R9. Додатково вивчали вплив спленектомії на рівень метастазування LLC/R9.

Для морфологічної характеристики селезінки виготовляли парафінові зрізи тканини товщиною 5 мкм і фарбували їх гематоксилін/еозином відповідно до стандартної методики з наступним мікроскопічним аналізом препаратів [16].

Для дослідження мітогеніндукованої проліферативної активності мононуклеарних спленічних лейкоцитів із суспензії спленоцитів виділяли мононуклеарні лейкоцити шляхом центрифугування у градієнті щільності фікол-верографін. Концентрацію клітин вносили в кількості 1×10^6 /лунку. Як мітогени використовували фітогемаглютинін (ФГА) (100 мкг/лунку) та ліпополісахарид *E. coli* (ЛПС) (5 мг/лунку). Мітогеніндуковану проліферативну активність оцінювали шляхом аналізу ДНК-статусу мононуклеарних спленічних лейкоцитів методом проточної цитофлуориметрії [9].

Аналіз сироваткового рівня імуноглобулінів проводили згідно з [19]. Для проведення імуноферментного аналізу як антиген використовували сироватку з крові мишей із LLC та LLC/R9. Як панель для калібрування застосовували мишачі імуноглобуліни класу G. Отримані результати реєстрували за допомогою фотометричного рідера (Awareness technology inc, США).

Спленектомію проводили під комбінованим наркозом каліпсовету та ефіру в асептичних умовах за 14 діб до перещеплення пухлинних клітин.

Статистичну обробку одержаних результатів було виконано за допомогою дескриптивних методів, нелінійного регресійного аналізу, t-критерію Стюдента та u-критерію Вілкоксона з використанням програми "Statistica v.7.5".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження показали, що, починаючи вже з 14 доби росту пухлини LLC/R9, маса селезінки та її клітинність були у 2,2 і 4,4 раза (відповідно) більшими, ніж у тварин без пухлин, та в 1,8 і 3,2 раза (відповідно) більшими порівняно з мишами з LLC (табл.).

Таблиця – **Маса та клітинність селезінки мишей у динаміці росту LLC/R9**

Показник селезінки	Інтактні тварини	Миші з LLC/R9				Миші з LLC			
		доба після перещеплення пухлинних клітин							
		8	14	20	25	8	14	20	25
Маса, мг	101,0± 15,0	158,3± 24,3	225,0± 34,0*	258,0± 35,4*	240,7± 18,7*	127,3± 9,1	120,3± 7,2	144,6± 20,8	138,6± 31,5
Кількість спленоцитів, ·10 ⁶	110,2± 10,9	192,2± 19,9	255,0± 29,9*	337,5± 25,0*	298,2± 31,5*	121,7± 15,4	114,6± 10,1	150,2± 16,1	171,6± 30,8

Примітка. * – різниця з інтактними тваринами достовірна ($p < 0,05$).

Дослідження цитоморфологічних показників селезінки було мотивоване тим, що, згідно з [3], у тварин з ангіогенезозалежною пухлиною LLC/R9 спостерігалася прогресивна спленомегалія. Відомо, що спленомегалія може відбуватися не лише за рахунок активації процесів гематопоезу поза кістковим мозком, але і в результаті активації антитілогенезу. Селезінка – вторинний лімфоїдний орган, основною функцією якого є кооперативна взаємодія Т- і В-лімфоцитів у процесі Т-залежного антитілогенезу [22].

Проведені гістологічні дослідження показали, що спленомегалія у тварин з LLC/R9 супроводжується значною стимуляцією проліферативного пулу селезінки. Тому можна припустити, що знижений метастатичний потенціал пухлин LLC/R9, порівняно з LLC, значною мірою зумовлений підвищеною функціональною активністю В-клітинної ланки селезінки. Перевірка цієї гіпотези є основним акцентом даної роботи. Вивчення морфологічної будови селезінки тварин з вихідною пухлиною LLC не виявило змін у будові цього органа порівняно з інтактним контролем. Селезінка представлена клітинами білої та червоної пульпи, які мають чітку межу (рис. 1).

У селезінці мишей з LLC/R9 зустрічаються лише одиничні невеликі ділянки білої пульпи

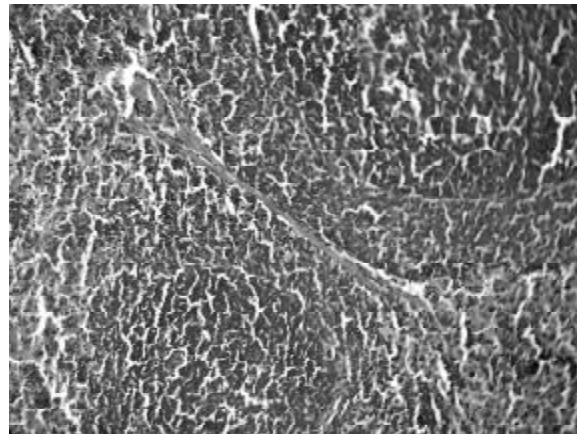


Рис. 1. Морфологічна будова селезінки мишей з LLC на 14 добу після перещеплення, $\times 200$.

(рис. 2, А). Основна частина органа представлена маленькими скупченнями клітин як білої, так і червоної пульпи, між якими не спостерігається чіткої межі, що характерна для морфологічної будови селезінки в нормі. Слід відмітити присутність значної кількості бластних клітин у всіх цих невеликих скупченнях лімфоїдної тканини (рис. 2, Б), що вказує на підвищену проліферативну активність В-клітинного пулу селезінки.

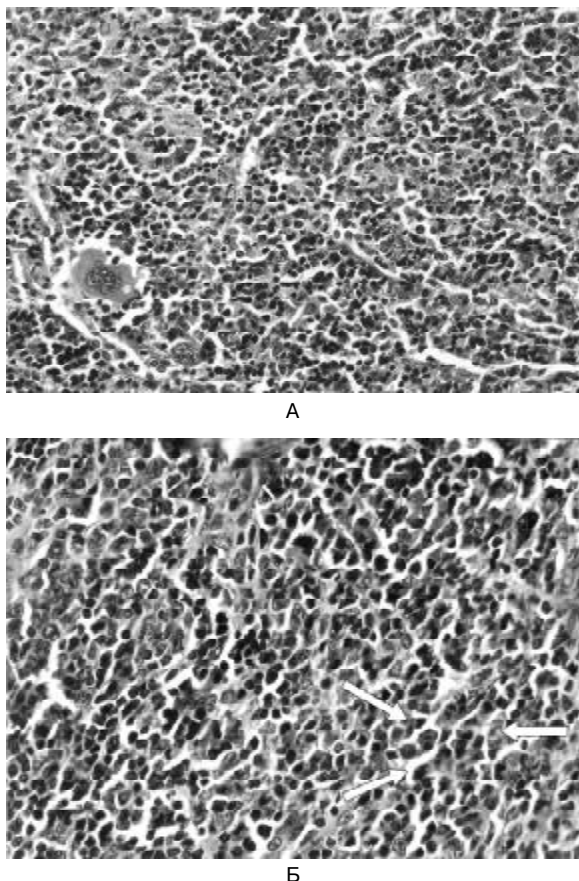


Рис. 2. Морфологічна будова селезінки мишей з LLC/R9 на 14 добу після перещеплення, x200.

На відміну від LLC/R9, у тварин з LLC бластні клітини визначаються лише в червоній пульпі. У білій пульпі вони зустрічаються лише в разі утворення вторинних фолікулів.

Додатковий доказ високої проліферативної активності В-клітинного пулу селезінки клітин тварин з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс отримано при дослідженні проліферативної відповіді мононуклеарних спленоцитів тварин-пухлиноносіїв на мітогени. Було використано два мітогени: бактеріальний ліпополісахарид, що є поліклональним активатором проліферації В-клітин [2], та фітогемаглютинін, який вважають активатором проліферації Т-клітин [11, 17]. Проліферативну активність мононуклеарних спле-

ноцитів оцінювали за відсотком клітин, що перебувають у S- та G2-M-фазах клітинного циклу (проліферативний індекс) [7]. За результатами наших досліджень, проведених на 14 добу після перещеплення пухлин, спонтанна проліферативна активність мононуклеарних спленоцитів мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс була статистично достовірно вищою порівняно з такою у мишей з низькоангіогенними пухлинами і знаходилася на рівні інтактного контролю (рис. 3, А).

Дослідження проліферативної відповіді на стимуляцію ФГА (рис. 3, Б) показали, що проліферативний індекс мононуклеарних спленоцитів мишей був майже однаковим у всіх досліджуваних групах з незначною тенденцією до вищого рівня у тварин з LLC/R9.

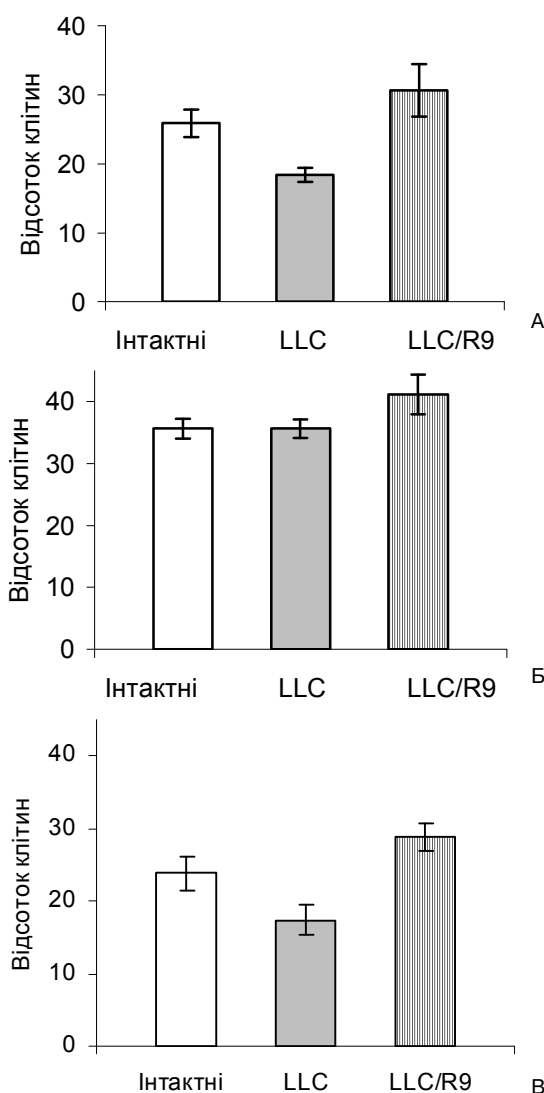


Рис. 3. Проліферативна відповідь мононуклеарних спленічних лейкоцитів на мітогени у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс: А – спонтанна проліферація; Б – ФГА-індукована проліферація; В – ЛПС-індукована проліферація.

Проліферативна активність мононуклеарних спленоцитів мишей з LLC/R9 у відповідь на стимуляцію ліпополісахаридом була вищою за відповідний показник в інтактних тварин та значно перевищувала аналогічний показник у мишей з LLC – на 63 % ($p < 0,05$, рис. 3, В).

Висока проліферативна активність В-клітинного пулу селезінки тварин з LLC/R9 узгоджувалася з високим сироватковим рівнем імуноглобулінів. Дослідження загального рівня циркулюючих імуноглобулінів (IgG) у сироватці крові мишей із трансплантованими клітинами карциноми легені Льюїс з різним ангіогенним потенціалом показали, що в мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс цей показник був на 70 % ($p < 0,01$) вищим порівняно з таким у тварин з вихідним варіантом пухлини (рис. 4).

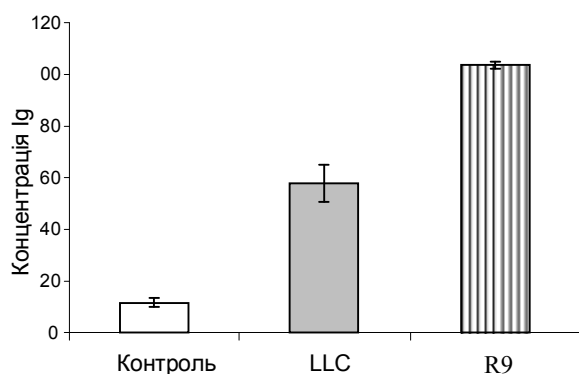


Рис. 4. Сироватковий рівень імуноглобулінів у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс.

Отримані результати дозволили висловити припущення, що приріст кількості антитіл у сироватці тварин-пухлиноносіїв, порівняно з інтактними тваринами, зумовлений активацією протипухлинного антитілогенезу, більш вираженого в мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс. У такому випадку низький (порівняно з LLC) рівень

метастазування LLC/R9 може бути частково зумовлений реалізацією специфічного анти-тілозалежного протипухлинного імунітету. Відомо, що Ат беруть участь у протипухлинному імунітеті в реакціях антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементозалежної цитотоксичності (КЗЦ). АЗКЦ відбувається тоді, коли Fc-фрагмент Ат зв'язується з рецептором до Fc-фрагмента (FcRs), FcRI та FcRIII, що розміщений на поверхні ефektorних клітин, таких, як макрофаги, природні кілери або нейтрофіли. Клітини-ефектори руйнують пухлинні клітини шляхом ендо- або екзоцитозу. В КЗЦ-реакції фрагмент комплементу C1q зв'язується з Fc-фрагментом IgG у складі імунного комплексу на поверхні пухлинної клітини і викликає каскад протеолітичних реакцій, що призводить до загибелі клітини шляхом лізису або до її опсонізації з наступною активацією вже зазначених клітин уродженого імунітету [13, 19, 20].

Для перевірки висловленого припущення ми провели спленектомію в мишей за 14 днів до перещеплення високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс з метою гальмування процесів антитілогенезу в цих тварин. Як контроль хірургічного втручання виконали лапаротомію без видалення селезінки.

Як показали результати досліджень, видалення селезінки у тварин із трансплантованим високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс спричиняло істотне статистично достовірне зростання кількості легеневих метастазів і загального об'єму метастатичного ураження (рис. 5): середня кількість метастазів у мишей з видаленою селезінкою ($n=15$) була в 2,4 ($p < 0,01$) раза більшою, ніж у тварин, в яких виконали лапаротомію без видалення даного органу ($n=11$). Об'єм метастатичного ураження при цьому також був більшим у спленектомованих мишей – в 1,74 раза ($p < 0,05$).

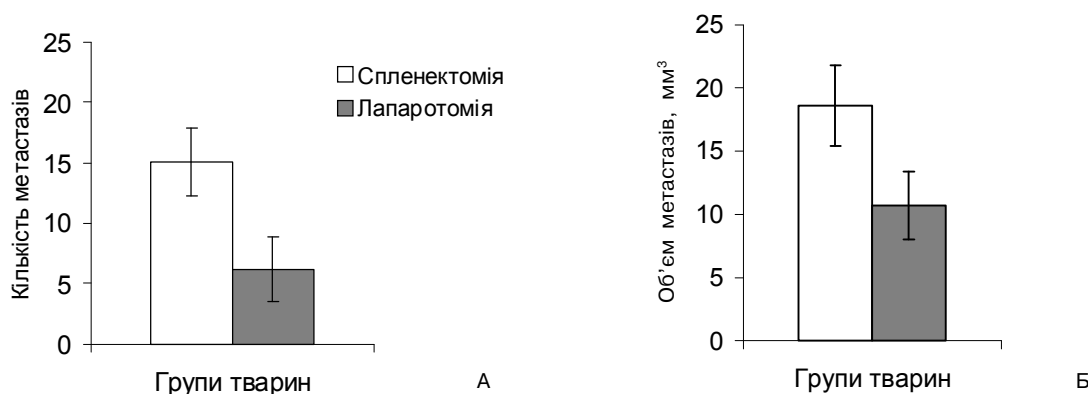


Рис. 5. Вплив спленектомії на рівень метастазування високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс: А – кількість метастазів у легенях тварин-пухлиноносіїв; Б – об'єм метастатичного ураження.

ВИСНОВОК. Підвищення ангіогенного потенціалу клітин LLC/R9 супроводжується зростанням їх імуногенності, що проявляється здатністю активувати антитілогенез. Наслідком активації антитілогенезу є зниження метаста-

тичного потенціалу пухлини, ймовірно, зумовлене елімінацією циркулюючих пухлинних клітин у реакціях антитілозалежного клітинного і гуморального імунітету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. – К. : Наук. думка, 2005. – 791 с.
2. Вершигора А. А. Имунологія / А. А. Вершигора. – К. : Вища школа, 2005. – 597 с.
3. VEGF опосередковує особливості паранеопластичного синдрому у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс / О. Г. Федорчук, О. М. Пяковська, Л. М. Сківка [та ін.] // Вісник Луганського нац. університету ім. Т. Шевченка. – 2010. – № 10. – С. 23–29.
4. Диденко Г. В. Модификация противоопухолевой аутовакцины на основе продуктов метаболизма *B. Subtilis* 7025 при помощи сорбентов и аутомарофагов / Г. В. Диденко, О. С. Дворщенко, Г. С. Лисовенко // Эксперим. онкол. – 2003. – № 2. – С. 116–118.
5. Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли / Р. Е. Кавецкий. – К. : Наук. думка, 1977. – 243 с.
6. Колесник Д. Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангіогенезом : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / Д. Л. Колесник. – К., 2010. – 20 с.
7. Меньшиков В. В. Клиническая лабораторная диагностика // Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – М. : Лабинформ-РАМЛД, 1999. – С. 170–177.
8. Осинский С. Микрофизиология опухолей / С. Осинский, П. Ваупель. – К. : Наук. думка, 2009. – 253 с.
9. Хаитов Р. В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека : пособие для врачей лаборантов / Р. В. Хаитов. – М., 2001. – 51 с.
10. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture / O. N. Pyaskovskaya, D. L. Kolesnik, A. V. Kolobov [et al.] // Exp. Oncol. – 2008. – **30**, № 4. – P. 269–275.
11. Brenner D. Concepts of activated T cell death / D. Brenner, P. H. Krammer, R. Arnold // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2008. – **66**, № 1. – P. 52–64.
12. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O. N. Pyaskovskaya, O. I. Dasyukevich, D. L. Kolesnik [et al.] // Exp. Oncol. – 2007. – **29**, № 3. – P. 197–202.
13. Fas ligand breaks tolerance to self-antigens and induces tumor immunity mediated by antibodies / A. K. Simon, A. Gallimore, E. Jones [et al.] // Cancer Cell. – 2002. – **2**, № 4. – P. 315–322.
14. Garcia-Lora A. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape / A. Garcia-Lora, I. Algarra, F. Garrido // J. Cell Physiol. – 2003. – **195**, № 3. – P. 346–355.
15. Immunology: the immune system in health & disease, 5 ed. / C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. – N-Y : Garlandpress, 2002. – 732 p.
16. Kiernan J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice / J. A. Kiernan. – Bloxham : Scion 4th ed., 2008. – 606 p.
17. Krammer P. H. Life and death in peripheral T cells / P. H. Krammer, R. Arnold, I. N. Lavrik // Nat. Rev. Immunol. – 2007. – **7**, № 7. – P. 532–542.
18. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells / N. Aptsiauri, T. Cabrera, A. Garcia-Lora [et al.] // Int. Rev. Cytol. – 2007. – **256**. – P. 139–189.
19. Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating presentation of immune complex derived antigen to CD8+ T cells in vivo / J. M. de Jong, D. H. Schuurhuis, A. Ioan-Facsinay [et al.] // Mol. Immunol. – 2006. – **43**, № 13. – P. 2045–2050.
20. Nimmerjahn F. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions / F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch // Methods Mol. Biol. – 2008. – № 415. – P. 151–162.
21. Schreiber R. D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth // Science. – 2011. – **331**. – P. 1565–1570.
22. The role of B-cells for in vivo T-cell responses to a Friend virus-induced leukemia / K. R. Schultz, J. P. Klarinet, R. S. Gieni [et al.] // Science. – 1990. – **249**, № 4971. – P. 921–923.
23. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression / J. M. Reiman, M. Kmiecik, M. H. Manjili, K. L. Knutson // Semin. Cancer Biol. – 2007. – **17**, № 4. – P. 275–287.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВЫСОКОАНГИОГЕННОГО ВАРИАНТА КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС: СВЯЗЬ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Резюме

Исследованы иммунологические свойства высокоангиогенного (LLC/R9) и низкоангиогенного (LLC) вариантов карциномы легкого Льюис и проанализирована их связь с метастатическим потенциалом. Показано, что LLC/R9, по сравнению с LLC, активирует антителогенез в селезенке. Высказано предположение, что низкий уровень метастазирования LLC/R9 частично обусловлен антителозависимыми цитотоксическими реакциями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **высоко- и низкоангиогенные опухоли, антителогенез, антителозависимая цитотоксичность.**

О. Н. Fedorchuk
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY
AND RADIOBIOLOGY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF HIGH-ANGIOGENIC LEWIS LUNG CARCINOMA: CORELATION WITH METASTATIC POTENTIAL

Summary

Immunogenic properties of high-angiogenic (LLC/R9) and low-angiogenic (LLC) variants of Lewis lung carcinoma were studied and their correlation with metastatic potential was analyzed. It was shown that LLC/R9, comparing to LLC, activates antibodygenesis in spleen. It was suggested that low level of LLC/R9 metastasis was particular stipulated by antibody-dependant cytotoxic reaction.

KEY WORDS: **high- and low-angiogenic tumors, antibody generation, antibody-dependent cytotoxicity.**

Отримано 03.11.11

Адреса для листування: О. Г. Федорчук, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: fed6@mail.ru

ЕКСПРЕСІЯ ІЗОФОРМ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ТА ЗАГОЄННЯ СТРЕСІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ

Досліджено експресію ізоформ синтази оксиду азоту (NOS) за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка. Експресію гена індукцйбельної NOS було зафіксовано лише після двогодинного впливу пошкоджувального чинника, тоді як вміст мРНК ендотеліальної та нейрональної NOS у динаміці розвитку і загоєння стресіндукованих уражень не змінювався. Розвиток стресіндукованих уражень супроводжувався підвищенням активності NOS та вмісту нітрит-іонів, тоді як загоєння супроводжувалось зниженням даних показників.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксид азоту, ізоформи синтази оксиду азоту, виразка шлунка.

ВСТУП. Останнім часом у структурі захворювань органів травлення серед населення України одне з провідних місць займає виразкова хвороба [5]. Її слід розглядати як хронічне складне поліетіологічне, генетично і патологічно неоднорідне захворювання, схильне до прогресування та рецидиву, основним проявом якого є формування виразкового дефекту в шлунку чи дванадцятипалій кишці. У патогенез цього захворювання залучено розбалансування нервових, а потім і гуморальних механізмів, що регулюють секреторну, моторну функції шлунка, кровопостачання та трофіку слизової оболонки. Порушення регіонального кровотоку призводить до ішемії тканин, ретро-дифузії іонів водню, некрозу клітин, у результаті чого утворюються ерозії та крововиливи [7].

Незважаючи на те, що відомо багато факторів, які беруть участь у розвитку виразки шлунка, повністю патогенез цього захворювання не вивчено. Експериментальні та клінічні дослідження останніх років показали, що однією з речовин, яка бере участь у регуляції тонусу судин, вивільненні вазоактивних медіаторів з клітин ендотелію і забезпечує кровопостачання органів шлунково-кишкового тракту, є оксид азоту (NO) [22]. Оксид азоту синтезується в організмі людини і тварин з L-аргініну різними формами синтази оксиду азоту (NOS) і проявляє гастропротекторні властивості, оскільки здатен попереджувати розвиток

уражень слизової оболонки шлунка та сприяти загоєнню виразок [18]. З іншого боку, NO може стимулювати розвиток запальних процесів, будучи додатковим пошкоджувальним чинником при багатьох захворюваннях органів шлунково-кишкового тракту.

Дані літератури щодо участі різних типів NOS у виникненні, розвитку та загоєнні виразок шлунка суперечливі. Оксид азоту, який утворюється в результаті активації конститутивних форм NO-синтази, проявляє гастропротекторні властивості, тоді як гіперпродукування NO внаслідок активації індукцйбельної форми NO-синтази спричиняє пошкоджувальний вплив на слизову оболонку шлунка [11]. Встановлено, що під час загоєння виразок збільшується експресія мРНК ендотеліальної NO-синтази, що корелює з розвитком ангиогенезу. Оксид азоту, синтезований даною ізоформою, може пригнічувати активність протеїнази С та змінювати експресію молекул адгезії на ендотеліальних клітинах, впливаючи таким чином на процеси утворення нових судин у слизовій оболонці шлунка [17].

Показано, що надмірна кількість оксиду азоту, синтезованого iNOS, може сприяти виразкоутворенню, оскільки ця ізоформа ферменту активується цитокінами і в нормі її експресію не виявлено, тоді як інші автори пов'язують такий характер експресії даної форми ферменту з ранніми процесами загоєння [20].

Тому метою даної роботи було оцінити активність синтази оксиду азоту та рівень екс-

пресії її ізоформ за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно з Європейською конвенцією. Досліди проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 250–270 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту щури мали доступ лише до води. Експериментальну виразку шлунка у піддослідних тварин викликали за допомогою іммобілізаційного водно-імерсійного стресу [23]. Тварин забивали методом дислокації шийних хребців після 0,5-, 1-, 2-, 3-годинної дії стресу, а також через 12 та 14 год після припинення дії пошкоджувального чинника. Візуально досліджували стан слизової оболонки шлунка щурів і розраховували ступінь та індекс виразкового ураження, застосовуючи систему балів [6].

Активність NO-синтази визначали згідно з методом [18], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окиснення оксиду азоту. Активність ферменту виражали в нмоль продуктів аеробного окиснення оксиду азоту, утворених ферментом за 1 хв з розрахунку на 1 мг білка. Вміст нітрит-іонів визначали за методом Гріса [25] із модифікаціями.

РНК отримували за методом Chomczynski [12]. кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 5 мкг РНК, 1 мМ дНТФ, 200 од. зворотної транскриптази RevertAid M-MLV, буфер для неї, 20 од. рибонуклеазного інгібітора (RiboLock), 20 пкмоль зворотного праймера. Синтез проводили за таких умов: 70 °C – 5 хв, далі 37 °C – 5 хв, 42 °C – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл кДНК, буфер для ПЛР, по 200 мкМ кожного dNTP, по 30–50 pmol кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl₂ та 1,5 од. Taq ДНК полімерази (“MBI Fermentas”, Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 94 °C – 5 хв; далі 35 циклів: денатурація ДНК 94 °C – 1 хв; гібридизація праймерів 52 °C – 45 с для iNOS (400 п.н.) [13], 55 °C – 45 хв для nNOS (602 п.н.) [19], 50 °C – 45 хв для eNOS (574 п.н.) [14] та 49 °C – 40 с для β-актину (521 п.н.) [13] (ген, який конститутивно експресується та використовується як внутрішній контроль реакції); добування ланцюга 72 °C – 1 хв 15 с. Після цього проводили добування ампліфікатів при 72 °C – 5 хв. У реакціях було використано такі

послідовності праймерів: для iNOS – прямий GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотний CTCCTGCCCACTGACTTCGTC; для nNOS – прямий CTACAAGGTCCGATTCAACAG та зворотний CCCACACAGAAGACATCACAG; для eNOS – прямий TACGGAGCAGCAAATCCA та зворотний CAGGCTGCAGTCCTTTGATC; для β-актину – прямий TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний ATTGCCGATAGTGATGAXCT. Розділяли продукти полімеразної ланцюгової реакції (по 20 мкл) електрофоретично в 1,6 % агарозному гелі (“Gibco”, Німеччина), 0,5-кратному TBE-буфері, як описано [2], при напрузі 5–10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії використовували програму “ImageJ 1.45” (NIH, США). Індeksi експресії мРНК визначали для кожного зразка, як описано [8].

Вміст білка визначали за методом Бредфорд [10]. Математичну і статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [1] на комп’ютері з використанням програмного пакета “GraphPad Prism 4.03” (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестували на нормальне розподілення із застосуванням тесту Шапіро–Вілка. Подальший обрахунок результатів здійснювали за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) з посттестом Тукея. Значення $p < 0,05$ було взято як вірогідне.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У динаміці розвитку стресової моделі виразки шлунка візуальне дослідження стану слизової оболонки шлунка щурів дало можливість встановити, що деструктивні ураження залежать від тривалості дії стресового чинника: ступінь ураження тканин шлунка досягав максимальних значень на 3 годину впливу. Через 12 та 24 год після припинення дії стресу спостерігалось різке зниження ступеня ураження. Дослідження активності NO-синтази дозволило встановити, що в динаміці розвитку стресіндукованих виразкових уражень слизової оболонки шлунка щурів підвищувалась активність ферменту на 54, 234 та 485 % (30 хв, 1, 2 год відповідно), максимальні значення було зафіксовано через 3 год після впливу стресового фактора (збільшення на 670 %) порівняно з контрольною групою тварин. Через 12 і 24 год після припинення дії стресу активність NO-синтази знижувалась на 72 та 78 % відповідно, але не досягала контрольних значень.

Активність NO-синтази в клітинах слизової оболонки шлунка супроводжувалась зростанням вмісту нітрит-іона. Так, після 0,5-, 1-, 2- та 3-годинного впливу пошкоджувального фактора

вміст NO_2^- збільшувався на 50, 191, 396 і 575 % відповідно порівняно з контрольними значеннями. Через 12 та 24 год після припинення дії стресу рівень оксиду азоту в тканині зменшувався на 68 та 74 % порівняно з показниками у тварин, яких піддавали 3-годинній дії уражувачого чинника, однак залишався підвищеним, порівняно з контролем, на 114 і 73 % (рис. 1).

У результаті проведених досліджень ми не виявили мРНК iNOS у слизовій оболонці ін-

тактних тварин, а також щурів, яких піддавали короткотривалій дії стресу. Лише після 2-годинного впливу пошкоджувального чинника було зафіксовано експресію даного гена (ми одержали продукти ПЛР однакового розміру: 400 п.н. [13]), інтенсивність якої підвищувалася при збільшенні тривалості впливу стресового фактора. Рівень мРНК iNOS залишався таким же і під час регенерації пошкоджених ділянок слизової оболонки шлунка (рис. 2).

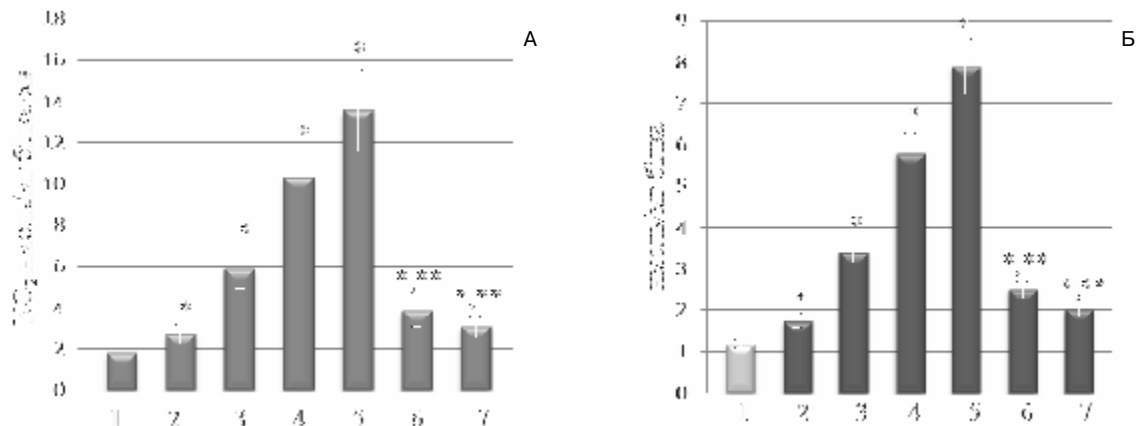


Рис. 1. NO-синтазна активність (А) та вміст нітрит-іонів (Б) у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень шлунка: 1 – контроль; 2 – 30 хв стресу; 3 – 1 год стресу; 4 – 2 год стресу; 5 – 3 год стресу; 6 – 12 год після припинення дії стресу; 7 – 24 год після припинення дії стресу; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яких піддавали 3-годинній дії стресу.

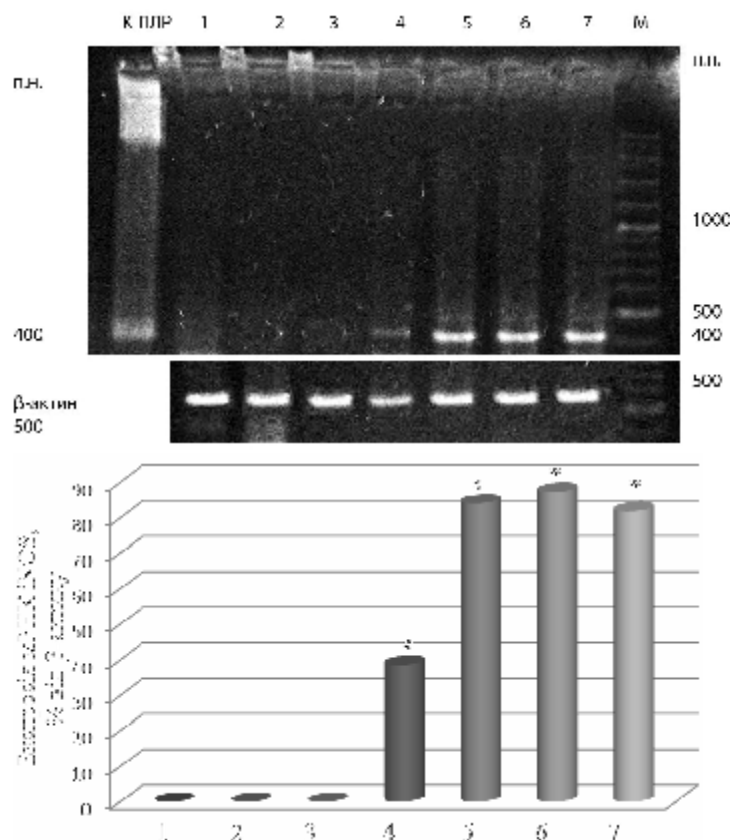


Рис. 2. Рівень експресії мРНК індукцибельної синтази оксиду азоту при розвитку та загоєнні стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: К-ПЛР – позитивний контроль ПЛР – фрагмент розміром 400 п.н.; 1 – контроль; 2 – 30 хв стресу; 3 – 1 год стресу; 4 – 2 год стресу; 5 – 3 год стресу; 6 – 12 год після припинення дії стресу; 7 – 24 год після припинення дії стресу; М – маркер молекулярної маси; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Активацию экспресии индуцибельной NO-синтазы можна пояснити зростанням рівня прозапальних факторів у крові піддослідних тварин під впливом стресу. Так, з літературних джерел відомо, що дія стресу призводить до підвищення рівня IL-TNF у плазмі щурів [16]. Приєднання цих цитокінів до рецепторів на поверхні клітини спричиняє вивільнення транскрипційного фактора NFκB з неактивного комплексу IκB-NFκB, що локалізований у цитозолі. Активний транскрипційний фактор переміщується до ядра, де і стимулює експресію гена iNOS [9].

Дані про характер експресії даної ізоформи збігаються з результатами, отриманими при дослідженні активності iNOS за умов введення її селективного інгібітора. Тому можна припустити, що найбільший внесок у продукування оксиду азоту при дії стресу тривалістю 3 год робить саме ця ізоформа ферменту.

Як відомо, оксид азоту, що синтезується даною ізоформою NOS, відіграє позитивну роль у процесах регенерації пошкоджених ділянок слизової оболонки шлунка, оскільки здатен викликати редукцію запальних процесів, зменшення викиду активних форм кисню та активувати певним чином процеси ангіогенезу, що надзвичайно важливо для перебігу загоєння виразкових уражень [19].

Отримані нами дані збігаються з даними літератури. Так, при виразкоутворенні, спричиненому оцтовою кислотою, максимальний рівень експресії iNOS спостерігався через 72 год після індукції уражень, коли закінчувалася фаза розвитку некрозу і починалися регенераційні процеси. Аналогічні дані отримано і в дослідгах на мишах з кріоіндукованими ураженнями слизової оболонки шлунка [19]. Інші автори стверджують, що мРНК iNOS можна виявити вже через 6 год після аплікації оцтової кислоти. Варто зазначити, що експресію мРНК iNOS та

її активність виявляють і за нормальних умов у тканинах органів шлунково-кишкового тракту [11].

Схожі результати отримано й у разі пошкоджень інших органів шлунково-кишкового тракту. При DSS-індукованому коліті також було зафіксовано активацію експресії мРНК iNOS як при розвитку пошкоджень, так і на початкових етапах відновлення слизової оболонки [18]. Отримані нами дані дають можливість припустити, що оксид азоту, синтезований iNOS, відіграє позитивну роль у загоєнні стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка.

Для eNOS ми одержали продукти ПЛП однакового розміру: 574 п.н. [14], так само, як і для nNOS: 602 п.н. [19]. Як видно з рисунків 3 та 4, змін вмісту мРНК eNOS і nNOS у динаміці розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка не було зафіксовано.

Відомо, що рівень експресії мРНК ендотеліальної NO-синтази може змінюватися під впливом естрогену, 17β-естрадіолу, при експериментальних моделях загоєння ран на шкірі, стану передішемії, а також у відповідь на посилення тиску на ендотелій [15]. Ще одним медіатором транскрипції eNOS є rho/rho-кіназний шлях, який функціонує за різноманітних кардіоваскулярних фізіологічних чи патофізіологічних станів [24]. Однак останнім часом більшість учених схильється до думки, що основним механізмом, який регулює кількість eNOS у клітині, є зміни стабільності її мРНК [15]. Так, злиття клітин, дія ліпополісахаридів чи цитокінів впливають на період півжиття мРНК eNOS. При цьому спостерігаються індукція та експресія принаймні двох цитозольних білків молекулярною масою 51 і 60 кДа, які зв'язуються з ділянкою, багатою на цитидин у 3'-нетранслюючій ділянці мРНК eNOS. Внаслідок цього, можливо, змінюється конфігу-

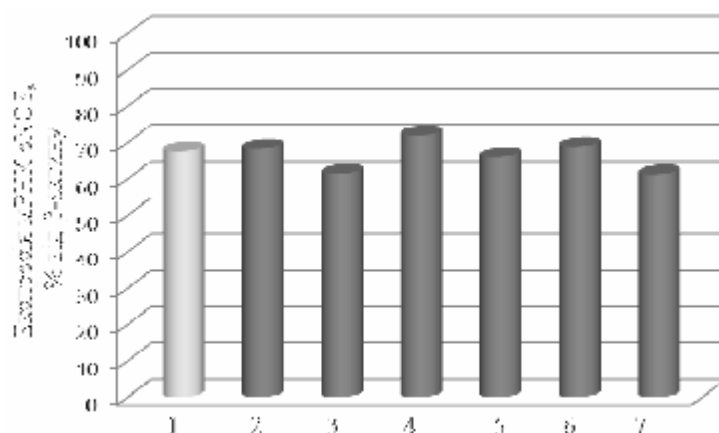


Рис. 3. Рівень експресії мРНК ендотеліальної синтази оксиду азоту при розвитку та загоєнні стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка (позначення, як на рисунку 2).

рація нуклеїнової кислоти, що робить її доступною для дії РНКаз [15]. Крім того, стабільність мРНК eNOS регулюється полімеризаційним станом актину. Так, руйнування актинових філаментів під впливом різних інгібіторів Rho-білків, зокрема статинів, збільшує експресію ендотеліальної NO-синтази шляхом подовження термінів півжиття її мРНК [15, 24].

Як відомо, надлишкова кількість норадреналіну, який виділяється із закінчень нейронів симпатичної нервової системи, призводить до різкого звуження кровоносних судин. У відповідь на вазоконстрикцію відбувається генерація оксиду азоту, оскільки він є однією з найважливіших ланок підтримання нормального кровопостачання слизової оболонки шлунка. У цей процес залучені конститутивні ізоформи синтази оксиду азоту [3]. Однак внаслідок розвитку оксидативного стресу можливі формування супероксидного радикала і його подальша взаємодія з NO, внаслідок чого утворюється пероксинітрит, що має яскраво виражені цитотоксичні властивості. Крім того, в ранню фазу розвитку запалення саме конститутивні ізоформи NO-синтази продукують оксид азоту, що має прозапальні властивості [4].

Однак деякі автори відмічають, що процеси регенерації слизової оболонки шлунка супро-

воджуються підвищенням рівня експресії мРНК eNOS, і саме оксид азоту, синтезований даною ізоформою ферменту, робить найбільший внесок у процеси загоєння, можливо через активацію процесів ангіогенезу. Однак, як вказано вище, під дією прозапальних факторів, рівень яких підвищується в плазмі крові під впливом стресу [16], можливе часткове руйнування мРНК eNOS, внаслідок чого ми не відмітили достовірних змін в експресії даного гена.

Отримані нами результати також підтверджуються даними літератури про те, що при DSS-індукованому коліті рівень експресії нейрональної ізоформи не змінюється. Тому автори припускають, що у процеси розвитку даної патології nNOS не залучена, хоча відомо, що за певних умов оксид азоту, який продукується даною ізоформою, може інгібувати запалення, опосередковане нервовою системою, діючи як гальмівний нейромедіатор. Оскільки оксид азоту може пригнічувати прозапальну дію опасистих клітин і nNOS експресується в нейронах та опасистих клітинах, то зниження рівня цієї ізоформи ферменту може призводити до посилення прозапальної дії опасистих клітин [21].

У дослідях на мишах, дефектних по генах різних ізоформ NO-синтази, було встановлено, що втрата nNOS призводить до посилення

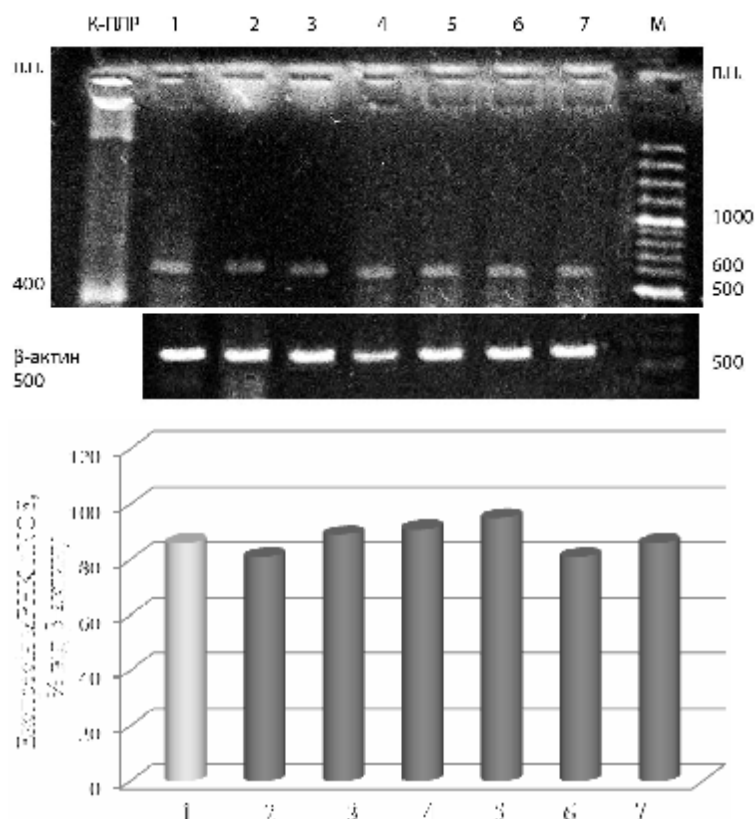


Рис. 4. Рівень експресії мРНК нейрональної синтази оксиду азоту при розвитку та загоєнні стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка (позначення, як на рисунку 2).

ураження слизової оболонки товстої кишки, тоді як втрата iNOS та eNOS мала протилежний ефект. Тому автори припускають, що у розвиток даної патології залучені саме ці ізоформи [21].

ВИСНОВОК. При розвитку стресіндукованих уражень слизової оболонки основний внесок у гіперпродукування оксиду азоту роблять конститутивні ізоформи синтази оксиду азоту, а в процеси загоєння залучений оксид азоту, синтезований індукцибельною ізоформою ферменту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений / З. Брандт. – М. : Мир, 1975. – 312 с.
2. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 480 с.
3. Периферійні механізми регуляції процесів цитопroteкції у слизовій оболонці шлунка / Скляр О. Я., Бондарчук Т. І., Мандрик Ю. В., Червінська М. Є.]. – Львів, 2007. – 159 с.
4. Сомова Л. М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л. М. Сомова, Н. Г. Плехова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 2. – С. 77–80.
5. Шве́ц О. В. Анализ распространенности и патогенетических факторов у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки / О. В. Шве́ц // Врач. дело. – 2001. – № 4. – С. 177–178.
6. Шоно Н. И. Метод определения белка по Бредфорду: область применения, преимущества, недостатки / Н. И. Шоно, Е. М. Баскаева // Лаб. дело. – 1980. – № 4. – С. 4–7.
7. Язвенная болезнь / под ред. Ю. Ю. Елисеева. – М. : КРОН-ПРЕСС, 2000. – 304 с.
8. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats / P. C. Konturek, T. Brzozowski, P. Pierzchalski [et al.] // Aliment Pharmacol. Ther. – 1998. – **12**. – P. 767–777.
9. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation / F. Aktan // Life Sciences. – 2004. – **75**. – P. 639–653.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – **86**. – P. 193–200.
11. Cho C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders / C. H. Cho // Journal of Physiology. – Paris. – 2001. – **95**. – P. 253–256.
12. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. – 1987. – **162**. – P. 156–159.
13. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress / Nie Shi-Nan, Sun Hai-Chen, Wu Xue-Hao [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2004. – **10**(23). – P. 3537–3541.
14. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats / Guo Jin-Sheng, Cho Chi-Hin, Wang Wei-Ping [et al.] // World Journal of Gastroenterology. 2003. – **9**(8). – P. 1767–1771.
15. Fleming I. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase / I. Fleming, R. Busse // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2003. – **284**. – P. R1–R12.
16. Kwiecie O. S. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury / O. S. Kwiecie, T. Brzozowski, S. J. Konturek // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – **53**. – P. 39–50.
17. Ma L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats / L. Ma, J. L. Wallace // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2005. – **279**. – P. 341–346.
18. Martin M. J. New Issues about Nitric Oxide and its Effects on the Gastrointestinal Tract / M. J. Martin, M. D. Jimenez V. Motilva // Current Pharmaceutical Design. – 2001. – **7**. – P. 881–908.
19. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthase in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // Life Sciences. – 2007. – **80**. – P. 329–336.
20. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers / M. Tatemichi, T. Ogura, N. Sakurazawa [et al.] // Int. J. Exp. Path. – 2003. – **84**. – P. 213–220.
21. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury / P. L. Beck, R. Xavier, J. Wong [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2004. – **286**. – P. 137–147.
22. Shah V. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease / V. Shah, G. Lyford, G. Gores // Gastroenterology. – 2004. – **126**, № 3. – P. 903–913.
23. Takagi K. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer / K. Takagi, S. Okabe // Jpn. J. Pharmacol. – 1968. – **18**. – P. 918.
24. The Regulation And Pharmacology Of Endothelial Nitric Oxide Synthase / D. M. Dudzinski, J. Igarashi, D. Greif [et al.] // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2006. – **46**. – P. 235–76.
25. Wallis J. P. Nitric oxide and blood: a review / J. P. Wallis // Transfusion Medicine. – 2005. – **15**. – P. 1–11.

Я. С. Максимович, А. С. Драницина, Л. В. Сокур, Л. И. Остапченко
УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР "ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ" КИЕВСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ЭКСПРЕССИЯ ИЗОФОРМ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ И ЗАЖИВЛЕНИЯ СТРЕССИНДУЦИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

Резюме

Исследовано экспрессию изоформ синтазы оксида азота (NOS) в условиях развития и заживления стрессиндуцированных поражений слизистой оболочки желудка. Экспрессию гена индуцибельной NOS было зафиксировано только после двухчасового действия повреждающего фактора, тогда как содержание мРНК эндотелиальной и нейрональной NOS в динамике развития и заживления стрессиндуцированных поражений не изменялось. Развитие стрессиндуцированных поражений сопровождалось повышением активности NOS и содержания нитрит-ионов, а то время как заживление – снижением данных показателей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксид азота, изоформы синтазы оксида азота, язва желудка.

Ya. S. Maksymovych, A. S. Dranytsyna, O. V. Sokur, L. I. Ostapchenko
EDUCATIONAL AND SCIENTIFIC CENTRE "INSTITUTE OF BIOLOGY" OF TARAS SHEVCHENKO
KYIV NATIONAL UNIVERSITY

EXPRESSION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE ISOFORMS UNDER DEVELOPMENT AND HEALING OF STRESS-INDUCED INJURIES OF RAT GASTRIC MUCOSA

Summary

Expression of nitric oxide synthase isoforms under development and healing of stress-induced injuries of rat gastric mucosa was researched. Expression of inducible NOS gene was registered only after two-hour action of damaging factor, whereas content of neuronal and endothelial NOS did not change during development and healing of injuries. Development of stress-induced injuries was accompanied with increase of NOS activity and nitrite-ions content. Healing of injuries was accompanied with decrease of those parameters.

KEY WORDS: nitric oxide, isoforms of nitric oxide synthase, gastric ulcer.

Отримано 04.03.12

Адреса для листування: А. С. Драницина, вул. Короленка, 68 а, кв. 94, Бровари, 07400, Україна, e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

ХАРАКТЕРИСТИКА АНЕМІЧНОГО ТА ГІПОГЛІКЕМІЧНОГО СТАНУ КРОВІ ПРИ РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ЗАСТОСУВАННІ ЦИСПЛАТИНУ І КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ВВЕДЕННЯ

Вивчено вплив кластерних сполук ренію з органічними лігандами у вигляді ліпосом та цисплатину на біохімічні показники крові щурів при канцерогенезі та його корекції даними сполуками і системою реній–платина. Показано, що система реній–платина має значний антианемічний та протипухлинний ефект, пригнічуючи ріст пухлини, що супроводжується також нормалізацією досліджуваних біохімічних показників крові, таких, як рівень гемоглобіну, концентрація глюкози у плазмі та еритроцитах, а також зменшується рівень патологічних форм еритроцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: анемія, гіпоглікемія, кластерні сполуки ренію, ліпосоми, еритроцити, карцинома Герена, система реній–платина.

ВСТУП. В онкологічній практиці зустрічаються декілька синдромів, патогенез яких тісно пов'язаний з розвитком ендокриної інтоксикації. До них відносять анемію, синдром кахексії, синдром розпаду пухлини, гіпоглікемію, синдром підвищеної в'язкості крові, лактацидоз тощо. Усі ці стани є наслідком одного захворювання – злоякісного пухлинного росту [8, 34]. Канцерогенез та хіміотерапія, а також застосування цисплатину – відомого хіміотерапевтичного препарату в більшості випадків характеризуються розвитком анемічного та гіпоглікемічного станів [15, 21, 27, 32, 33, 35], що негативно відображається на біохімічній картині крові та загальному стані організму, адже цисплатин має виражену токсичність [35].

Майже у 50 % пацієнтів з онкологічним та онкогематологічним діагнозом розвивається анемія. Механізми розвитку анемії при канцерогенезі [1, 12] включають значне підвищення втрати еритроцитів внаслідок гострої або хронічної крововтрати.

Енергетичний обмін пухлин перебуває сьогодні в центрі уваги, оскільки об'єднує в собі дані про взаємозв'язок ракових генів, біоенергетики та злоякісної трансформації. Так, енергетичний обмін пухлинних клітин значно відрізняється від такого нормальних клітин [13, 22, 26]. Для більшості своїх енергетичних потреб нормальні клітини використо-

вують процес дихання, який полягає в отриманні кисню і глюкози для виробництва енергії та зберігання її у вигляді АТФ, але навіть за присутності кисню ракові клітини підвищують свій потенціал до продукування лактату. Злоякісні клітини, як правило, застосовують інший механізм – гліколіз (анаеробний розпад глюкози до АТФ) [20]. Відомо, що при розвитку новоутворень пухлина інтенсивно споживає глюкозу, що викликає гіпоглікемічний стан. Це підвищене споживання глюкози (навіть за присутності активних форм кисню) відоме як ефект Варбурга. Швидкість гліколізу в пухлинних клітинах може бути більш ніж у 30 разів більшою, ніж у нормальних клітинах [19], і близько 63 % енергетичних потреб злоякісні клітини отримують саме таким чином [14].

У наших попередніх дослідженнях [28–30] було охарактеризовано нову систему реній–платина, яка включає введення пухлинно-носієм одноразово цисплатину та кластерної сполуки ренію, що об'єднані в одну систему у вигляді наноліпосом. Показано значний терапевтичний ефект з мінімальним негативним впливом на біохімічну картину крові, біохімічний та функціональний стан нирок і печінки та значну редукцію пухлини і загальний стан організму [2, 28–30].

Тому метою даної роботи було дослідити анемічний та гіпоглікемічний стани системи червоної крові за допомогою визначення зміни показників крові при експериментальному

канцерогенезі, введенні ліпосом і застосуванні різних способів введення комплексних сполук ренію в поєднанні з цисплатином.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі досліджували кластерні сполуки ренію (III) з органічними лігандами та їх ліпосомні форми, а також кластерні сполуки ренію в розчині. Цисплатин та ліпосоми, навантажені лише кластерною сполукою ренію та різними співвідношеннями ренію і цисплатину, готували в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [4].

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 120–150 г віком 2–3 місяці, яких утримували в стандартних умовах. Суспензію клітин карциноми Герена Т8 (20 % у фізіологічному розчині) перещеплювали здоровим щурам від пухлиноносіїв, отриманих в Інституті експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Сполуки ренію і платини вводили таким чином. Одноразове внутрішньочеревне введення розчину цисплатину в дозі 8 мг/кг на 9 добу після трансплантації пухлини [31] та внутрішньочеревне введення кластерних сполук ренію у формі звичайних ліпосом розміром 5–10 мкм за схемою антиоксидантної терапії [9] у дозі 7 мкмоль/кг починали на 3 добу після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби. На 21 добу після трансплантації пухлини тварин декапітували згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, видаляли і зважували пухлину та збирали кров у пробірки з гепарином.

Шляхом центрифугування зібраної крові відокремлювали плазму.

Досліджували такі параметри: рівень гемоглобіну – гемоглобінціанідним методом [3], концентрацію глюкози у плазмі та еритроцитах – глюкозооксидазним методом [3], морфологічну картину крові – цитохімічним методом [10]. Активність даних біохімічних показників визначали спектрофотометрично в цільній крові, плазмі крові та гемолізаті еритроцитів за стандартними лабораторними методиками з використанням тест-наборів фірми “Філісіт-Діагностика” (Україна, м. Дніпропетровськ) і фірми “Реагент” (Україна, м. Дніпропетровськ).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми “Excel”, використовуючи t-критерій Стюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $p < 0,05$ [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати дослідження біохімічних показників крові у піддослідних тварин свідчать про те, що канцерогенез призводить до порушення загальної картини крові. Ступінь гальмування пухлинного росту, масу пухлини, а також біохімічні показники крові при розвитку новоутворення та введенні ліпосом наведено у таблиці 1.

Відомо, що канцерогенез супроводжується значним зниженням рівня гемоглобіну [18]. Захворювання, які пов'язані з низьким рівнем гемоглобіну, характеризуються зменшенням цього показника майже на 30–40 % [1, 8, 12]. У групі Т8 відмічали низький рівень гемоглобіну – $(97,6 \pm 4,88)$ г/л. Порушення гемо- та еритропоезу належать до постійних ознак онкозахворювань, які вказують на злоякісність пухлинного росту [8]. Особливо різкого ступеня анемія досягає у тих випадках, коли має

Таблиця 1 – **Ступінь гальмування пухлини (%), концентрація глюкози у плазмі та еритроцитах (ммоль/л), рівень гемоглобіну (г/л), загальна кількість еритроцитів (10^6 /л) та патологічні форми еритроцитів (%) у щурів-пухлиноносіїв при окремому введенні кластерних сполук ренію з органічними лігандами в різних формах введення**

Група тварин	Ступінь гальмування пухлини, %	Глюкоза, ммоль/л		Рівень Hb, г/л	Кількість еритроцитів		Маса пухлини, г
		плазма	еритроцити		загальна, 10^6 /л	патологічні форми, %	
Контроль	–	$5,93 \pm 0,297$	$32,55 \pm 1,63$	$145,53 \pm 7,28$	$6,71 \pm 1,6$	$11,70 \pm 2,16$	–
Т8	–	$3,46 \pm 0,173^{\#}$	$23,8 \pm 1,19^{\#}$	$97,6 \pm 4,88^{\#}$	$4,51 \pm 1,93^{\#}$	$58,96 \pm 4,54^{\#}$	$63,27 \pm 15,19$
[Re-isob.]lip	$26,77 \pm 1,34$	$5,07 \pm 0,253^*$	$16,73 \pm 0,84$	$141,26 \pm 2,06^*$	$6,62 \pm 1,04^*$	$14,61 \pm 0,83^{**}$	$46,33 \pm 15,60^*$
[Re-Adam.]lip	$28,45 \pm 1,42$	$4,63 \pm 0,232$	$20,19 \pm 1,01$	$64,15 \pm 3,21$	$2,26 \pm 0,11^*$	$17,29 \pm 0,86^{**}$	$45,27 \pm 16,77^*$
[Re-GABA.]lip	$36,3 \pm 2,81$	$8,38 \pm 0,419^{**}$	$20,42 \pm 1,02$	$107,26 \pm 5,36^*$	$5,31 \pm 0,13$	$19,55 \pm 0,75^{**}$	$40,3 \pm 10,34^*$
[Re-prop.]lip	$16,61 \pm 1,83$	$5,31 \pm 0,31^*$	$61,22 \pm 2,81^*$	$93,57 \pm 11,36$	$5,28 \pm 0,87$	$42,73 \pm 0,64^*$	$52,76 \pm 9,41$
[Re-pival.]lip	$35,36 \pm 3,79$	$6,02 \pm 0,44^*$	$58,34 \pm 2,63^*$	$111,26 \pm 5,36^*$	$6,64 \pm 1,04^*$	$40,2 \pm 2,01^*$	$40,9 \pm 19,34^*$
$[\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$63,25 \pm 3,16$	$5,48 \pm 0,36^*$	$38,95 \pm 1,25^*$	$132,6 \pm 1,15^*$	$3,57 \pm 0,18$	$21,43 \pm 1,07^*$	$21,35 \pm 5,34^{**}$

Примітка. * – достовірна різниця порівняно з групою Т8 ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); # – достовірна різниця порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$).

місце кровотеча пухлин, а також метастазування їх у кістковий мозок. Ріст та розвиток карциноми Герена супроводжуються некротичними явищами, особливо на кінцевих етапах прогресії пухлини. У свою чергу, ураження та розклад онкоутворення викликають всмоктування токсинів та підсилюють розклад еритроцитів. Існують деякі припущення відносно механізмів дії ракових токсинів. При вивченні впливу кластерних сполук ренію з органічними лігандами у ліпосомах на рівень гемоглобіну в щурів з карциномою Герена було виявлено підвищення концентрації гемоглобіну під впливом сполук ренію, порівняно з групою Т8, у середньому на 10–44 %. Можливо, це спричинено зменшенням розмірів пухлини та її токсичного впливу на організм тварин.

Карцинома Герена інтенсивно розвивається та на 21 день після імплантації ракових клітин досягає маси 40–85 г, що складає 20–40 % маси тварини. Так, у групі Т8 її маса складала $(63,27 \pm 15,19)$ г. В середньому при введенні кластерних сполук ренію маса пухлини зменшувалася на 17–65 % порівняно з групою Т8. Найкращий результат – $[\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, де ступінь гальмування пухлини становив близько 64 %. Слід зазначити, що розвиток пухлини має індивідуальний характер, тому спостерігалися значні коливання розмірів пухлини і всередині групи. Також можна прослідкувати певну узгодженість між ефективністю пригнічення росту пухлини та рівнем гемоглобіну в крові піддослідних тварин. Це особливо помітно у групі $[\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, де концентрація гемоглобіну складала $(132,6 \pm 1,15)$ г/л, а редукція пухлини становила 63,25 %; при цьому рівень гемоглобіну підвищувався на 35 % порівняно з групою Т8.

Канцерогенез також викликав зміни кількості еритроцитів та зміни у морфологічній картині крові. Кількість еритроцитів зменшувалася на 33 % порівняно з контрольною групою. Причиною зменшення кількості еритроцитів була анемія. Потенційні механізми процесів, які призводили до зниження цього показника, включали у себе значні втрати еритроцитів внаслідок гострих та хронічних крововтрат у онкохворих, абсорбцію на мембрані різних речовин (продуктів метаболізму, пухлинних антигенів), що спричиняла зменшення стійкості еритроцитів та їх більш швидку утилізацію. Також значних змін зазнає еритропоез у онкохворих, і перш за все знижується синтез еритропоєтину [8]. Зазнають змін еритроцитарні мембрани, а отже, змінюється морфологічна картина крові, тобто кількісні показни-

ки дискоцитів та патологічних форм еритроцитів. Показано підвищення патологічних форм еритроцитів у 6 разів порівняно з контролем. Спостерігалася велика кількість мікроцитів, макроцитів, еритроцитів зміненої форми, іноді зустрічались “тіні” та уламки еритроцитів. Такі зміни вказують на швидке старіння еритроцитів, яке супроводжується гіпоксією та метаболічними перебудовами. Негативні наслідки анемії помічають ще й у тому, що тканинна гіпоксія, яка виникає внаслідок анемії, може знижувати ефективність хіміотерапії та променевої терапії, а також гіпоксія підвищує кількість спонтанних мутацій [26]. Введення сполук ренію з органічними лігандами викликало збільшення кількості еритроцитів на 17–47 % порівняно з групою Т8. Наближеними до нормальних значень були показники в групах: $[\text{Re-pival}]\text{lip}$ та $[\text{Re-isob}]\text{lip}$. У цих групах також було відмічено зниження патологічних форм еритроцитів на 33 та 76 % відповідно порівняно з групою Т8, рівень гемоглобіну перебував у межах норми. Отже, дані сполуки проявляють антианемічну дію та здатність стабілізувати еритроцитарні мембрани. У групах $[\text{Re-prop}]\text{lip}$ та $[\text{Re-GABA}]\text{lip}$ спостерігалася підвищення загальної кількості еритроцитів на 17,5 % порівняно з групою Т8. Однак загалом ефективність $[\text{Re-GABA}]\text{lip}$ сполуки за іншими досліджуваними показниками була вищою. У цій групі відмічено зменшення кількості патологічних форм еритроцитів у 3 рази порівняно з групою Т8.

Антианемічна активність сполук ренію залежить від природи, довжини та конфігурації органічних лігандів. При введенні сполук $[\text{Re-Adam}]\text{lip}$ та $[\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ підвищення кількості еритроцитів не відбувалося. Хоча у цих сполук відмічали помірну антиканцерогенну властивість, однак метаболічних порушень, викликаних пухлиною, вони не нормалізують достатньою мірою.

Отже, при вивченні впливу кластерних сполук ренію з органічними лігандами на рівень гемоглобіну, кількість еритроцитів та масу пухлини щурів з карциномою Герена було виявлено підвищення концентрації гемоглобіну під впливом кластерних сполук ренію в середньому на 15 %, зниження кількості патологічних форм еритроцитів на 40 %, зменшення маси пухлини на 45 % порівняно з групою Т8.

Таким чином, сполуки ренію проявляють антианемічну та антиканцерогенну активність. Антиканцерогенні та антианемічні ефекти сполук ренію пов'язані, оскільки лікування анемії підвищує ефективність протипухлинної терапії.

Слід зазначити, що розвиток новоутворення супроводжується також зміною вуглеводного та енергетичного обміну клітини й організму в цілому, що призводить до розвитку гіпоглікемії [11, 16, 17, 24–27, 32]. За літературними даними, рівень глюкози у плазмі становить 5,05 г/л, що майже не відрізняється від даних наших експериментів – 5,93 ммоль/л. До того ж показано, що при розвитку новоутворення цей показник становив 3,46 ммоль/л. У всіх експериментальних групах тварин, яким вводили кластерні сполуки ренію, було помічено підвищення рівня глюкози у плазмі на 33–142 % порівняно з групою Т8, але даний показник у групі [Re-GABA]lip перевищував значення контролю на 41 %.

Аналіз літературних джерел виявив повну відсутність даних щодо вмісту глюкози в еритроцитах. Ми вперше показали, що рівень глюкози в еритроцитах дорівнює $(32,55 \pm 1,63)$ ммоль/л. Адже відомо, що еритроцити – це без'ядерні клітини, єдиним джерелом енергії яких є гліколіз та пентозофосфатний шунт. Швидкість гліколізу в пухлинних клітинах може бути більш ніж у 30 разів вищою, ніж у нормальних клітинах [19], і близько 63 % енергетичних потреб злоякісні клітини отримують саме таким чином [14]. Тому в групі Т8 рівень глюкози був значно нижчим та становив $(23,8 \pm 1,19)$ ммоль/л. Введення кластерних сполук ренію з різними органічними лігандами сприяло значному підвищенню цього показника на 63–157 % по-

рівняно з групою Т8. Але при введенні ліпосомних форм Re-isob., Re-Adam та Re-GABA знижувався рівень глюкози в еритроцитах на 15–30 % порівняно з групою Т8 та на 38–49 % порівняно з контролем. Це можна пояснити механізмами дії кластерних сполук ренію з лігандами різної природи на еритроцит, а також формою введення кластерних сполук ренію, бо саме в цьому випадку було застосовано ліпосомні форми.

Наступним етапом роботи було дослідження розвитку карциноми Герена та біохімічної картини крові при використанні кластерних сполук ренію і цисплатину, системи реній–платина (табл. 2).

Введення системи реній–платина викликало значну редукцію пухлини і ступінь гальмування, який досягав 99,9 % і перевищував значення показника у групі тварин, яким вводили цисплатину (81,22 %), а також сприяло збільшенню кількості еритроцитів на 36–103 % порівняно з групою Т8 для всіх експериментальних груп, окрім Т8+cisPt+[$\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], де цей показник не перевищував такий у групі Т8. Спостерігалось значне зниження кількості патологічних форм еритроцитів – на 26–83 % порівняно з групою Т8. Однак у групі Т8+cisPt+[$\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] цей показник залишався майже у 4 рази вищим, ніж у контрольній групі.

Використання цисплатину призводило до підвищення гемоглобіну до 79 % порівняно з

Таблиця 2 – Ступінь гальмування пухлини (%), концентрація глюкози у плазмі та еритроцитах (ммоль/л), рівень гемоглобіну (г/л), загальна кількість еритроцитів ($10^6/\text{л}$) та патологічні форми еритроцитів (%) у щурів-пухлиноносіїв при введенні системи реній–платина

Група тварин	Ступінь гальмування пухлини, %	Глюкоза, ммоль/л		Рівень Hb, г/л	Кількість еритроцитів		Маса пухлини, г
		плазма	еритроцити		загальна, $10^6/\text{л}$	патологічні форми, %	
Контроль	–	$5,93 \pm 0,297$	$32,55 \pm 1,63$	$145,53 \pm 7,28$	$6,71 \pm 1,6$	$11,70 \pm 2,16$	–
Т8	–	$3,46 \pm 0,173^{\#}$	$23,8 \pm 1,19^{\#}$	$97,6 \pm 4,88^{\#}$	$4,51 \pm 1,93^{\#}$	$58,96 \pm 4,54^{\#}$	$63,27 \pm 15,19$
к+cisPt	–	$5,81 \pm 0,255^*$	$24,77 \pm 1,24$	$168,2 \pm 8,41^*$	$5,24 \pm 1,85^*$	$16,65 \pm 2,34^{**}$	–
Т8+cisPt	$81,22 \pm 4,06$	$6,22 \pm 0,311^*$	$50,99 \pm 2,55^{**}$	$114,89 \pm 8,74^*$	$4,03 \pm 0,55$	$28,65 \pm 3,98^*$	$11,88 \pm 4,90^{**}$
cisPt+[Re-isob.]lip	$99,56 \pm 4,97$	$6,22 \pm 0,311^*$	$34,76 \pm 1,74^*$	$148,87 \pm 7,44^*$	$6,75 \pm 1,02^*$	$10,25 \pm 2,54^{**}$	$0,28 \pm 0,10^{***}$
cisPt+[Re-Adam]lip	$78,0 \pm 3,90$	$7,31 \pm 0,366^{**}$	$54,3 \pm 2,72^{**}$	$104,17 \pm 5,21$	$7,43 \pm 1,05^*$	$26,31 \pm 2,96^*$	$13,92 \pm 1,55^{**}$
cisPt+[Re-GABA]sol	$87,48 \pm 4,37$	$9,08 \pm 0,454^{**}$	$13,67 \pm 0,69^*$	$115,45 \pm 5,77^*$	$9,2 \pm 1,6^*$	$21,23 \pm 1,85^*$	$7,92 \pm 2,30^{**}$
cisPt+[Re-cis-propion.]lip	$97,63 \pm 4,88$	$9,44 \pm 0,472^{**}$	$14,72 \pm 0,74^*$	$119,67 \pm 5,98^*$	$6,15 \pm 1,12^*$	$12,73 \pm 0,64^{**}$	$1,497 \pm 0,34^{**}$
cisPt+[Re-cis-pival.]lip	$99,91 \pm 4,99$	$10,43 \pm 0,522^{**}$	$16,69 \pm 0,83^*$	$100,64 \pm 5,03$	$6,64 \pm 1,04^*$	$10,20 \pm 2,01^{**}$	$0,06 \pm 0,001^{***}$
cisPt+[$\text{Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]	$97,85 \pm 4,89$	$6,07 \pm 0,304^*$	$24,35 \pm 1,22$	$128,9 \pm 6,45^*$	$2,77 \pm 0,14$	$43,83 \pm 1,19$	$1,36 \pm 0,29^{**}$

Примітка. * – достовірна різниця порівняно з групою Т8 ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,001$); # – достовірна різниця порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$).

групою T8. При введенні відомого цитостатика цисплатину його вміст зменшувався на 21 % порівняно з контрольною групою. Застосування в лікуванні платиновмісних режимів – достовірний прогностичний фактор розвитку анемії [5, 7]. Цисплатин – один із найбільш ефективних хіміотерапевтичних сполук у клінічній практиці, однак у 10–40 % пацієнтів зустрічається гостра анемія, що, можливо, є наслідком зниження продукування еритропоетину через ураження нирок і безпосередні токсичні ефекти на кістковий мозок [35]. Однак система реній–платина сприяє нормалізації системи кровотворення, про що свідчить підтримка на рівні контрольних значень кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну, а також нормалізація морфологічної картини крові. Найкращою виявилася сполука cisPt+[Re-isob.]lip. Слід зазначити, що при окремому введенні сполук саме для цього органічного ліганду показана стабілізація показників крові.

Щодо вмісту глюкози у плазмі, то в даному випадку було відмічено значне підвищення рівня глюкози у 2–5 разів порівняно з групою T8. Введення піддослідним тваринам лише цисплатину також спричинило підвищення глюкози у плазмі на 79 % порівняно з групою T8. Глюкоза як основне джерело енергії засвоюється в нормальних клітинах при наявності кисню, що приводить до повного окиснення глюкози й, у свою чергу, запускає цитоплазматичний процес гліколізу, а згодом цикл трикарбонових кислот та окиснювальне фосфорилювання (OxPhos). На відміну від нормальних клітин, пухлинні клітини використовують більше гліколіз як конверсію глюкози в піруват, а згодом у лактат, ніж окиснювальне фосфорилювання, навіть за присутності кисню [13]. Цей

шлях є не настільки ефективним, як окиснювальне фосфорилювання, у продукуванні енергії. Тому, щоб відповідати високим енергетичним потребам, клітини пухлини збільшують продуктивність гліколізу. Перш за все це досягається збільшенням поглинання глюкози і транспортом її специфічними переносниками, GLUT's, на поверхні клітинної мембрани [23]. Залежність клітин пухлини від надпродукування гліколізу, з метою отримання енергії, сьогодні розглядають як новий шлях у лікуванні новоутворень. При вивченні впливу кластерних сполук ренію у системі з цисплатином показано, що відбувається підвищення рівня глюкози в еритроцитах у 2–3,5 рази порівняно з групою T8; для груп cisPt+[Re-cis-propion.]lip, cisPt+[Re-cis-pival.]lip, cisPt+[Re₂(CH₃COO)₄(H₂PO₄)₂·2H₂O – зниження рівня глюкози в еритроцитах на 26–55 % та нормалізація даного показника для групи cisPt+[Re-isob.]lip (34,76 ммоль/л).

ВИСНОВКИ. Імовірно, антианемічні властивості кластерних сполук ренію пов'язані з їх здатністю взаємодіяти з фосфоліпідним бішаром еритроцитарних мембран та запобігати руйнації еритроцитів. Завдяки своїм антирадикальним властивостям сполуки ренію нейтралізують вільні радикали, що перешкоджає окисненню та деструкції гемоглобіну. Стосовно антиканцерогенних властивостей сполук, то за результатами дослідів припускають, що використання системи реній–платина призводить до переважно апоптотичного механізму загибелі клітин. Очевидно, застосування системи ініціює в клітині сигнальні шляхи, які призводять до обох шляхів клітинної смерті, що і спричиняє максимальні ефекти смертності ракової клітини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабичева Л. Г. Лечение анемии в онкологии: роль нового стимулятора эритропоэза Аранесп (дарбэпозтин альфа) / Л. Г. Бабичева, И. В. Поддубная // Совр. онкология. – 2010. – **9**, № 3. – С. 69–74.
2. Бабій С. О. Вплив протипухлинної системи “реній–платина” на функціональний стан нирок щурів у моделі токсичної нефропатії // Вісник проблем біол. і мед. – 2010. – Вип. 3. – С. 94–101.
3. Горячковский А. М. Пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – Одесса : ОКФА, 1994. – С. 255–258.
4. Єгорова Д. Є. Взаємодія біядерних кластерів ренію(III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул : автореф. дис. на здобуття наук. степеня канд. хім. наук / Д. Є. Єгорова. – Дніпропетровськ, 2010. – 18 с.
5. Изменение внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях / А. В. Пивник, Т. Н. Моисеева, И. В. Карпова [и др.] // Гематол. и трансфузиол. – 2000. – **45**, № 4. – С. 14–19.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая Школа, 1990. – 352 с.

7. Михайленко В. М. Нанотехнології – перспективи застосування та ризики для здоров'я людини / В. М. Михайленко, П. М. Михайленко, Л. О. Єлейко // Онкологія. – 2008. – **10**, № 4. – С. 420–426.
8. Новик А. В. Анемія і метаболічні розлади у онкологічних хворих / А. В. Новик // Прак. онкологія. – 2009. – **10**, № 3. – С. 131–140.
9. Предупреждение повреждения миокарда при гемолитической анемии с помощью антиоксидантов / Ф. З. Меерсон, А. Б. Сухомлинов, М. Е. Евсеева [и др.] // Кардиология. – 1983. – **23**, № 6. – С. 94–99.
10. Сибірна Н. О. Методи дослідження системи крові : навч.-метод. посіб. / Н. О. Сибірна, В. А. Бурда, Я. П. Чайка. – Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2005. – 100 с.
11. Andrean Simons L. Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy // J. Cancer Res. Ther. – 2009. – **5** (Suppl 1): S2. – P. 1–7.
12. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review / J. J. Caro, M. Salas, A. Ward [et al.] // Cancer. – 2001. – **91**, №12. – P. 2214–2221.
13. Buentke E. Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells / E. Buentke // Blood Cancer Journal. – 2011. – **1**, № 31. – P. 1–9.
14. Busk M. Aerobic glycolysis in cancers: Implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia / M. Busk // Int. J. Cancer. – 2008. – **122**. – P. 2726–2734.
15. D'Alessandro V. Severe spontaneous acute tumor lysis syndrome and hypoglycemia in patient with germ cell tumor / V. D'Alessandro // Tumori. – 2010. – **96**. – P. 1040–1043.
16. Derek Le Roith. Tumor-induced hypoglycemia / Derek Le Roith // N. Engl. J. Med. – 1999. – **341**. – P. 757–759.
17. Dietary glycemic index, glycemic load and endometrial and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis / H. G. Mulholland, L. J. Murray, C. R. Cardwell, M. M. Cantwell // Br. J. Cancer. – 2008. – **99**, № 3. – P. 434–441.
18. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anemia undergoing radiotherapy: randomized, double-blind, placebo - controlled trial / M. Henke, R. Laszig, C. Rubin [et al.] // Lancet. – 2003. – **362**. – P. 1255–1260.
19. Ganapathy V. Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond / V. Ganapathy, M. Thangaraju, P. D. Prasad // Pharmacol. Ther. – 2009. – **121**. – P. 29–40.
20. Jones R. G. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth / R. G. Jones, C. B. Thompson // Genes & Development. – 2009. – **23**. – P. 537–548.
21. Kataoka T. Malignant Phyllodes Tumor of the Breast with Hypoglycemia: Report of a Case / T. Kataoka, R. Haruta, T. Goto // Jpn. J. Clin. Oncol. – 1998. – **28**, № 4. – P. 276–280.
22. Kellenberger L. D. The role of dysregulated glucose metabolism in epithelial ovarian cancer / L. D. Kellenberger // Journal of Oncology. – 2010. – **32**. – P. 1–13.
23. Macheda M. L. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer / M. L. Macheda // J. of cellular physiology. – 2005. – **202**. – P. 654–662.
24. Michaud D. S. Dietary glycemic load, carbohydrate, sugar, and colorectal cancer risk in men and women / D. S. Michaud // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2005. – **14**. – P. 138–147.
25. Nomellini R. S. Relationship between plasma glucose levels and malignant uterine cervical neoplasias / R. S. Nomellini // Oncology. – 2011. – **5**. – P. 77–82.
26. Plathow C. Tumor cell metabolism imaging / C. Plathow, W. A. Weber // The Journal of Nuclear Medicine. – 2008. – **49**, № 6. – P. 43–63.
27. Shah S. N. Hypoglycemia: prevention, consequences and management / S. N. Shah // J. Indian Med. Assoc. – 2002. – **100**, № 3. – P. 166–177.
28. Shtemenko N. I. Dichlorotetra-m-isobutyrtatodirhenium (III): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – **27**. – P. 2487–2492.
29. Shtemenko N. I. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: Enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko // Chemistry & Biodiversity. – 2008. – **5**. – P. 1660–1667.
30. Shtemenko A. V. Synthesis, characterization, in vivo antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko // Dalton Trans. – 2009. – **26**. – P. 5132–5136.
31. Taylor S. K. Is recombinant human erythropoietin (rh-epo) more than just a treatment of anemia in cancer and chemotherapy? / S. K. Taylor // Medical Hypotheses. – 2003. – **60**, № 1. – P. 89–93.
32. Tennant D. A. Metabolic transformation in cancer / D. A. Tennant // Carcinogenesis. – 2009. – **30**, № 8. – P. 1269–1280.
33. Thews. Erythropoietin Restores the Anemia-induced Reduction in Cyclophosphamide Cytotoxicity in Rat Tumors / Thews // Cancer Research. – 2001. – **61**. – P. 1358–1361.
34. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis / Vaupel P. // Oncologist. – 2008. – **13**, Suppl. 3. – P. 21–26.
35. Wood P. A. Cisplatin-associated anemia: An erythropoietin deficiency syndrome / P. A. Wood, W. Hrushesky // J. Clin. Invest. – 1995. – **95**. – P. 1650–1659.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНЕМИЧЕСКОГО И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА И ПРИМЕНЕНИИ ЦИСПЛАТИНА И КЛАСТЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕНИЯ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ВВЕДЕНИЯ

Резюме

Изучено влияние кластерных соединений рения с органическими лигандами в виде липосом и цисплатина на биохимические показатели крови крыс при канцерогенезе и его коррекции данными соединениями и системой рений–платина. Показано, что система рений–платина имеет значительный антианемический и противоопухолевый эффект, угнетая рост опухоли, что сопровождается также нормализацией исследуемых биохимических показателей крови: уровня гемоглобина, концентрации глюкозы в плазме и эритроцитах, а также уменьшается уровень патологических форм эритроцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: анемия, гипогликемия, кластерные соединения рения, липосомы, эритроциты, карцинома Герена, система рений–платина.

Yu. S. Voronkova, O. D. Skoryk, N. I. Shtemenko
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

CHARACTERISTICS OF THE ANAEMIC AND HYPOGLYCEMIA STATE OF BLOOD AT THE GUERIN'S CARCINOMA GROWTH AND APPLICATION OF CISPLATINUM AND RHENIUM CLUSTER COMPOUNDS AT DIFFERENT FORMS OF INTRODUCTION

Summary

It was studied the influence of rhenium cluster compounds with organic ligands and systems rhenium-platinum on the biochemical indices of blood of rats in the model of tumor growth. It was shown antianaemic and anticancer effects of system rhenium-platinum, and it was accompanied by inhibition of tumor growth, and also normalization of the biochemical indices of blood: level of haemoglobin, concentration of glucose in plasma and erythrocytes, morphological picture of blood.

KEY WORDS: anemia, hypoglycemia, rhenium cluster compounds, liposomes, erythrocytes, Guerin's carcinoma, rhenium-platinum system.

Отримано 20.12.11

Адреса для листування: Ю. С. Воронкова, пров. Вольний, 3, кв. 122, Дніпропетровськ, 49130, Україна, e-mail: yuliya_v@inbox.ru.

АНТИАНГІОГЕННА ДІЯ ЦИКЛОФОСФАНА ВІДНОСНО МЕТАСТАЗУЮЧИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН

Досліджено чутливість двох варіантів карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9), які відрізняються між собою за ангіогенним та метастатичним потенціалом, до дії циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення. Встановлено, що низькометастазуючий варіант LLC/R9 мав високу чутливість до дії циклофосфану, що проявлялося значним інгібуванням росту первинної пухлини та суттєвим зниженням рівня метастатичного ураження легень, тоді як високометастазуючий варіант LLC був нечутливим до його дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карцинома легені Льюїс, циклофосфан, чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії.

ВСТУП. Беручи до уваги високу залежність прогресії солідних злоякісних пухлин від пухлинного ангіогенезу, протипухлинна антиангіогенна терапія (ПАТ) досі не втрачає своєї привабливості та перспективності як концептуально нова стратегія лікування онкологічних хворих, кардинально відмінна від традиційної хіміотерапії. Ключовою відмінністю є перш за все зміна основної мішені дії (замість злоякісної клітини – ендотеліальна) та кінцевого результату терапії (замість спроби прямо знищити злоякісну пухлину – переведення хвороби у хронічний стан). Відповідно до складності та багатофакторності процесу пухлинного ангіогенезу за більше ніж 30 років стрімкого розвитку ПАТ було апробовано різноманітний арсенал протипухлинних засобів – від чисельних таргетних антиангіогенних засобів [7, 11] до використання класичних хіміотерапевтичних препаратів у метрономному низькодозовому режимі введення чи при їх поєднанні [11, 15]. Метрономна низькодозова хіміотерапія з'явилася як альтернативна або доповнювальна терапія до традиційної хіміотерапії. Метрономний низькодозовий режим введення класичних, добре відомих цитостатиків оптимально експлуатує їх антиангіогенні властивості. Той факт, що протипухлинний ефект низькодозової метрономної терапії деяких традиційних цитостатиків, у тому числі циклофосфану, опосередковується переважно через інгібування пухлинного ангіогенезу, було доведено в багатьох роботах та показано переконливу ефективність такого підходу [9, 11].

© О. М. Пяковська, 2012.

Однак, незважаючи на вагомий здобутки, проблема існуючої або виникаючої резистентності торкнулася і ПАТ. На сьогодні механізми її виникнення активно з'ясовують [5, 8, 14]. На заваді успішного використання ПАТ у клінічній практиці є відсутність адекватних експериментальних моделей, що уповільнює визначення біологічних властивостей пухлини, чутливої до ПАТ.

Раніше ми встановили, що два варіанти карциноми легені Льюїс, які мають різний ангіогенний та метастатичний потенціал, проявляють різну чутливість до дії аконітиновмісного рослинного екстракту, для якого показано антиангіогенний механізм протипухлинної дії [3, 10]. Метою даної роботи було перевірити ефективність антиангіогенної терапії циклофосфаном (низькодозовий метрономний режим) відносно цих двох пухлинних моделей.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мишах лінії C57Bl/6 віком 2–2,5 міс., масою 18–23 г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) імені Р. Є. Кавецького НАН України. Всі експерименти на тваринах виконували відповідно до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та дотримуючись правил роботи з лабораторними тваринами.

В роботі було використано два варіанти клітин карциноми легені Льюїс, одержаних з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР імені Р. Є. Кавецького НАН України: LLC – вихідний варіант, LLC/R9 – мо-

дифікований варіант, отриманий у результаті експериментальної прогресії *in vivo* в напрямку формування лікарської резистентності до протипухлинного препарату “Цисплатин” [6, 13].

Для проведення дослідів *in vivo* клітини LLC та LLC/R9 нарощували *in vitro* у поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (ETC) (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37 °C у вологих умовах, 5 % CO₂ та інокулювали мишам внутрішньом'язово у кількості 1x10⁶ клітин в 0,1 мл розчину Хенкса.

Протипухлинну та антиметастатичну ефективність циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення оцінювали на 24 добу після перещеплення пухлин. Для цього мишам з LLC (група 1) та LLC/R9 (група 2) вводили циклофосфан *per os* раз на добу протягом 15 діб у сумарній дозі 200 мг/кг маси тварин. Контролем слугували миші з LLC (контроль 1) та LLC/R9 (контроль 2), яким у такому ж об'ємі та за тією ж схемою вводили воду.

Для оцінки протипухлинної дії циклофосфану у тварин всіх піддослідних груп за рутинною методикою вимірювали розміри первинної пухлини та розраховували її об'єм. Щоб оцінити антиметастатичну дію циклофосфану в мишей, візуально визначали кількість та розмір метастазів у легенях і за загальноприйнятою методикою розраховували загальний об'єм метастатичного ураження легень.

Рівень фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF) у сироватці крові експериментальних тварин визначали за допомогою імуноферментного аналізу, використовуючи набір реагентів для визначення мишачого VEGF (R&D Systems, Англія) згідно з протоколом виробника. Сироватку крові для аналізу одержували рутинним методом не менше ніж з 5 тварин/групу.

Визначення рівня апоптозу в пухлинах оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії згідно з [4]. Для цього клітини, одержані шляхом механічної деградації з тканини пухлин на 24 добу після перещеплення, ресуспен-

дували в гіпотонічному лізуючому буфері (0,1 % цитрат натрію, 0,1 % тритон X-100), який містив 5 мкг/мл йодистого пропідію, та аналізували вміст ДНК на проточному цитофлуориметрі при довжині хвилі аргонного лазера 488 нм. Рівень апоптозу оцінювали за кількістю клітин (у %) з гіподиплоїдним вмістом ДНК в перерахунку на 10⁴ клітин. Тканину пухлин для аналізу вилучали не менше ніж з 5 тварин/групу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті дослідження ефективності циклофосфану відносно LLC та LLC/R9 в режимі антиангіогенної терапії було встановлено, що їх чутливість суттєво відрізняється: варіант LLC є нечутливим до дії циклофосфану, тоді як варіант LLC/R9 проявляє високу чутливість до його дії. Висока чутливість LLC/R9 до дії циклофосфану підтверджувалася вираженням пригнічення росту первинної пухлини, а також високодостовірним зниженням рівня метастатичного ураження легень. Так, на 24 добу після перещеплення об'єм пухлини у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, був майже на 50 % нижчим ($p < 0,05$), ніж відповідний у контролі (табл. 1). Кількість метастазів у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, була більше ніж втричі ($p < 0,05$) меншою, а об'єм метастазів – на 85% ($p < 0,05$) нижчим порівняно з відповідними показниками у контролі. Тоді як суттєвого впливу циклофосфану на ріст і метастазування LLC не було виявлено. Як видно з таблиці 1, показники росту і метастазування у мишей з LLC, які одержували циклофосфан, практично не відрізнялися від відповідних у контролі.

Висока протипухлинна ефективність циклофосфану відносно LLC/R9 реалізовувалася за рахунок індукції апоптозу в пухлині у результаті проведеної терапії. Так, рівень циклофосфаніндукованого апоптозу в пухлинах мишей з LLC/R9 був більше ніж вдвічі вищим порівняно з рівнем апоптозу в пухлинах контрольної групи ($p < 0,05$, табл. 2). Згідно з [2], циклофосфан у режимі антиангіогенної терапії індукує апоптоз ендотеліальних клітин,

Таблиця 1 – Вплив циклофосфану в метрономному режимі введення на ріст і метастазування LLC та LLC/R9

Група тварин	Об'єм первинної пухлини, мм ³	Кількість метастазів	Об'єм метастазів, мм ³
LLC			
Група 1 (n=14)	963,6±143,0	40,4±6,3	111,4±28,1
Контроль 1 (n=14)	850,6±117,7	31,1±5,3	103,7±21,5
LLC/R9			
Група 2 (n=14)	845,3±146,0*	2,8±0,7*	6,2±2,2*
Контроль 2 (n=14)	1594,0±332,0	9,3±2,2	40,1±12,0

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від відповідного у контролі.

Таблиця 2 – Вплив терапії циклофосфаном у метрономному режимі введення на рівень апоптозу в пухлинах LLC та LLC/R9

Група тварин	Рівень апоптозу в пухлині, % від загальної кількості клітин
LLC	
Група 1	41,2±12,8
Контроль 1	31,6±4,8
LLC/R9	
Група 2	56,4±10,0*
Контроль 2	27,4±8,7

який передую апоптозу клітин пухлини. Очевидно, підвищення рівня апоптозу в LLC/R9 після терапії циклофосфаном можна розглядати не тільки як результат його прямої цитотоксичної/цитостатичної дії, але й як наслідок циклофосфаніндукованого апоптозу ендотеліальних клітин. У випадку LLC, на відміну від LLC/R9, суттєвого впливу циклофосфану на рівень апоптозу в пухлині не було встановлено. Так, кількість апоптотичних клітин у пухлинах мишей з LLC, яким проводили терапію циклофосфаном, статистично достовірно не відрізнялася від такої у відповідному контролі.

Значний протипухлинний та антиметастатичний ефект циклофосфану відносно LLC/R9 супроводжувався також зниженням рівня циркулюючого VEGF. Так, у сироватці крові мишей з LLC/R9, яким проводили терапію циклофосфаном, рівень VEGF на 24 добу після пересадки пухлини був в 1,7 раза ($p < 0,05$) меншим порівняно з таким у відповідному контролі (рис.). Оскільки головними продуцентами

VEGF в організмі пухлиноносія є пухлинні клітини, зниження його рівня в сироватці крові мишей з LLC/R9, яким проводили терапію циклофосфаном, можна розглядати і як результат значного зменшення об'єму первинної пухлини. Разом із тим, рівень VEGF у сироватці крові мишей з LLC, яким проводили терапію циклофосфаном, статистично достовірно не відрізнявся від такого у відповідному контролі.

Отже, одержані дані свідчать про те, що варіант LLC/R9, на відміну від LLC, мав високу чутливість до дії циклофосфану в разі його введення у режимі антиангіогенної терапії, що проявлялося значним інгібуванням росту первинної пухлини та суттєвим зниженням рівня метастатичного ураження легень. З попередніх досліджень відомо, що варіант LLC/R9 за своїми біологічними властивостями суттєво відрізняється від варіанта LLC. Однією з головних особливостей варіанта LLC/R9 є його високий ангіогенний потенціал. Зокрема, рівень продукування VEGF клітинами LLC/R9 *in vitro* значно більший, ніж клітинами LLC [6]. Незважаючи на високий ангіогенний потенціал, варіант LLC/R9, порівняно з LLC, характеризується низьким метастатичним потенціалом. Як видно з таблиці 1, кількість та загальний об'єм метастатичного ураження легень у мишей з LLC/R9 втричі ($p < 0,05$) нижчі, ніж у тварин з LLC.

Раніше ми показали, що LLC/R9, на відміну від LLC, проявляє високу чутливість і до аконітиновмісного рослинного екстракту, для якого показано антиангіогенний механізм дії

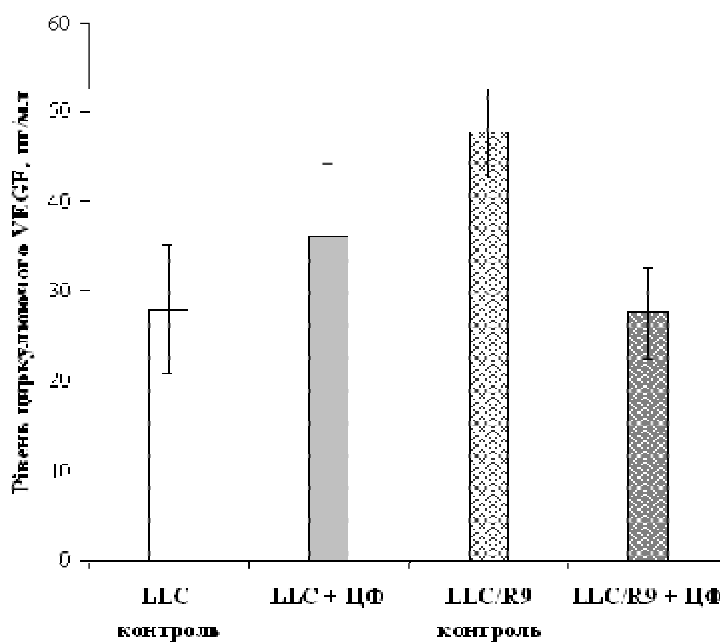


Рис. Вплив циклофосфану в метрономному режимі введення на рівень циркулюючого VEGF у мишей з LLC та LLC/R9 на 24 добу після пересадки пухлини (ЦФ – циклофосфан).

[3, 10]. Як і у випадку циклофосфану в метрономному режимі введення, аконітиновмісний екстракт призводив до вираженого інгібування росту та метастазування LLC/R9 і суттєво не впливав на ріст та метастазування LLC. Той факт, що варіанти пухлин одного генезу мають різну чутливість до ПАТ, вказує на те, що її ефективність значною мірою визначається біологічними властивостями пухлини. Безперечно, останнє включає в себе як наслідки взаємодії пухлини з організмом хазяїна, так і біологічні властивості власне пухлинних клітин та їх адаптивні можливості у відповідь на антиангіогенну терапію [8]. Зокрема, в роботі [1] було показано, що клітини LLC є толерантними до метаболічного стресу, спричиненого їх довготривалою інкубацією без заміни поживного середовища, що моделює дефіцит поживних субстратів, який виникає внаслідок

ефективної дії ПАТ. У будь-якому випадку, беручи до уваги високу чутливість LLC/R9 до інгібування пухлинного ангіогенезу агентами з різним механізмом дії, високу ефективність ПАТ, очевидно, можна очікувати відносно пухлин з високим ангіогенним потенціалом та/або низькою метастатичною активністю.

ВИСНОВКИ. 1. За допомогою двох метастазуючих варіантів експериментальних пухлин одного генезу показано зв'язок між ефективністю циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення та ангіогенним і метастатичним потенціалом пухлини.

2. Високий ангіогенний та низький метастатичний потенціал LLC/R9 корелює з високою чутливістю до дії ПАТ, тоді як низький ангіогенний та високий метастатичний потенціал LLC асоціюється з резистентністю до її дії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture / O. N. Pyaskovskaya, D. L. Kolesnik, A. V. Kolobov [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**, № 4. – P. 269–275.
2. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer / T. Browder, C. E. Butterfield, B. M. Kraling [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – **60**. – P. 1878–1886.
3. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 / G. I. Solyanik, A. G. Fedorchuk, O. N. Pyaskovskaya [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2004. – **26**, № 4. – P. 307–311.
4. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci [et al.] // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – **139**. – P. 271–279.
5. Bergers G. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy / G. Bergers, D. Hanahan // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – **8**. – P. 592–603.
6. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O. N. Pyaskovskaya, O. I. Dasyukevich, D. L. Kolesnik [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2007. – **29**, № 3. – P. 197–202.
7. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer / N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, W. Novotny // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2004. – **3**, № 5. – P. 391–400.
8. Ebos J. M. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to

antiangiogenic therapy / J. M. Ebos, C. R. Lee, R. S. Kerbel // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – **15**, № 16. – P. 5020–5025.

9. Impact of metronomic UFT/cyclophosphamide chemotherapy and antiangiogenic drug assessed in a new preclinical model of locally advanced orthotopic hepatocellular carcinoma / T. C. Tang, S. Man, C. R. Lee [et al.] // *Neoplasia.* – 2010. – **12**. – P. 264–274.
10. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells / L. V. Garmanchouk, O. N. Pyaskovskaya, Yu. V. Yahish [et al.] // *Exp. Oncology.* – 2005. – **27**, № 4. – P. 262–266.
11. Kerbel R. S. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy / R. S. Kerbel, B. A. Kamen // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – **4**, № 6. – P. 423–436.
12. Kerbel R. S. Tumor angiogenesis / R. S. Kerbel // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – **358**. – P. 2039–2049.
13. Solyanik G. I. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion / G. I. Solyanik, O. N. Pyaskovskaya, L. V. Garmanchouk // *Exp. Oncol.* – 2003. – **24**, № 4. – P. 260–265.
14. Strategies for delaying or treating in vivo acquired resistance to trastuzumab in human breast cancer xenografts / J. M. du Manoir, G. Francia, S. Man [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – **12**, № 3, Pt 1. – P. 904–916.
15. Tumors that acquire resistance to low-dose metronomic cyclophosphamide retain sensitivity to maximum tolerated dose cyclophosphamide / U. Emmenegger, G. Francia, A. Chow [et al.] // *Neoplasia.* – 2011. – **13**, № 1. – P. 40–48.

АНТИАНГИОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИКЛОФОСФАНА В ОТНОШЕНИИ МЕТАСТАЗИРУЮЩИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Резюме

Исследована чувствительность двух вариантов карциномы легкого Льюис (LLC и LLC/R9), отличающихся ангиогенным и метастатическим потенциалом, к действию циклофосфана в низкодозовом метронном режиме введения. Установлено, что низкометастазирующий вариант LLC/R9 проявлял высокую чувствительность к действию циклофосфана, что выражалось в значительном угнетении роста первичной опухоли и существенном снижении уровня метастатического поражения легких, тогда как высокометастазирующий вариант LLC оказался нечувствительным к его действию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карцинома легкого Льюис, циклофосфан, чувствительность к противоопухолевой антиангиогенной терапии.

O. M. Pyaskovska
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY
OF NAS OF UKRAINE, KYIV

ANTIANGIOGENIC ACTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE TO EXPERIMENTAL METASTATIC TUMORS

Summary

It was studied sensibility of two Lewis lung carcinoma variants (LLC та LLC/R9) with different angiogenic and metastatic potential to action of cyclophosphamide administered in low-dose metronomic regimen. It was established that LLC/R9, low-metastatic variant, showed high sensitivity to action of cyclophosphamide, that was expressed in considerable inhibition of a primary tumor growth and essential decrease in level of metastatic spread in lung, whereas LLC, high-metastatic variant, did not show sensitivity to its action.

KEY WORDS: Lewis lung carcinoma, cyclophosphamide, sensitivity to antitumor antiangiogenic therapy.

Отримано 03.11.11

Адреса для листування: О. М. Пяковська, Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: pyaskovskaya@gmail.com

**ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ В ДІТЕЙ ІЗ
БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ ТА РЕЦИДИВНИМ ОБСТРУКТИВНИМ
БРОНХІТОМ**

Вивчено особливості метаболізму сполучної тканини в 164 дітей віком 1–17 років, хворих на бронхіальну астму та рецидивний обструктивний бронхіт. З'ясовано, що порушення обміну сполучної тканини залежать від фази і тяжкості захворювання. Доведено наявність зв'язків між рівнями біохімічних маркерів обміну сполучної тканини та основними показниками вентиляційної функції легень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бронхіальна астма, рецидивний бронхіт, обмін сполучної тканини, діти.

ВСТУП. Результатами хронічного запалення в дихальних шляхах при бронхіальній астмі (БА) є характерні структурні й функціональні порушення. В останні роки дослідники активно обговорюють процес морфологічної перебудови (remodeling) бронхіального дерева [7–9]. Основою багатьох морфофункціональних патологічних реакцій органів дихання вважають зміни метаболізму сполучної тканини (СТ), що проявляються порушенням кооперації її структурних елементів [1, 7].

Основним компонентом сполучної тканини є її речовина (матрикс), що містить тканинну (позаклітинну) рідину й макромолекули полісахаридів (протеогліканів, глікопротеїнів та їх структурних компонентів – глікозаміногліканів (ГАГ), що створюють гель). Найбільшу фізіологічну значущість мають такі ГАГ, як гіалуронова кислота, хондроїтинсульфат (ХІС), кератансульфат, гепарин, гепарансульфат і дерматансульфат. ГАГ і протеоглікани, які є обов'язковими компонентами міжклітинного матриксу, відіграють важливу роль у міжклітинних взаємодіях, формуванні й підтримці форми клітин і органів, утворенні каркаса під час формування тканин. Гепарансульфати – компоненти плазматичних мембран клітин, що можуть функціонувати як рецептори й брати участь у клітинній адгезії та міжклітинних взаємодіях. Глікозаміноглікани, що сульфатуються (ГАГС), відіграють роль молекулярного сита в міжклітинному матриксі, перешкоджаючи поширенню патогенних мікроорганізмів. Протеоглікани і ГАГ специфічно взаємодіють з колагеном, еластином, фібронектином, ламініном та іншими

білками міжклітинного матриксу [4, 5]. Міжклітинний матрикс сполучної тканини (МСТ), що оточує клітини, впливає на їх прикріплення, розвиток, проліферацію, організацію і метаболізм. Метаболічна активність СТ також відіграє важливу роль у реалізації бар'єрної функції легень [2, 3, 5, 6].

Метою даної роботи було вивчити особливості метаболізму сполучної тканини в дітей, хворих на бронхіальну астму та рецидивний обструктивний бронхіт.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 164 дитини, хворих на бронхіальну астму та рецидивний обструктивний бронхіт (РОБ), віком від 1 до 17 років. Ураховуючи нозологічну форму і тяжкість захворювання, дітей було поділено на групи: пацієнти з РОБ (1-ша група, n=40), хворі на інтермітуючу БА (2-га група, n=37), персистуючу БА легкого ступеня (3-тя група, n=46), персистуючу БА середньої тяжкості або тяжку (4-та група, n=41) під час загострення захворювання (відповідно, підгрупи: 1А – n=20, 2А – n=20, 3А – n=28, 4А – n=19) та в період ремісії (відповідно, підгрупи: 1Б – n=20, 2Б – n=17, 3Б – n=18, 4Б – n=22). До групи контролю включили 13 практично здорових дітей аналогічного віку без ознак гострих і хронічних захворювань.

Особливості метаболізму СТ визначали за загальною концентрацією сульфатованих ГАГ у сироватці крові з наступним їх фракціонуванням, сумарний вміст ХІС (г/л) – за реакцією з риванолом (метод Ю. Ю. Лапса, Л. І. Слуцького (1969)). Добову екскрецію оксипроліну із сечею визначали спектрофотометрично за мето-

дом А. А. Крель, Л. Н. Фурцевої (1986) з використанням як барвника парадиметиламінобензальдегіду. Метаболізм ГАГ досліджували за рівнем уонових кислот у добовій сечі за реакцією з карбазолом за методом Д. В. Косягіна (1988), функцію зовнішнього дихання (ФЗД) – за допомогою методу комп'ютерної пневмотахографії на апараті "Custo-Vit" (Німеччина). Вимірювали такі параметри: ФЖЕЛ – форсовану життєву ємність легень; ОФВ₁ – об'єм форсованого видиху за 1 с; максимальні об'ємні швидкості 25, 50 і 75 % (MEF-25, MEF-50, MEF-75). В'язкісний дихальний опір (Rfo) вимірювали методом форсованих осциляцій на пневмотахографі "Custo-Vit" (Німеччина) з визначенням в'язкісного дихального опору під час вдиху (Rfo ins) та видиху (Rfo exp).

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних пакетів "EXCELL FOR WINDOWS" і "STATISTICA 7.0. FOR WINDOWS".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Під час аналізу біохімічних показників МСТ зафіксовано зниження рівнів загальних ГАГ у дітей усіх груп (табл. 1). Найбільш суттєве зниження зареєстровано щодо фракцій Ф2 і Ф3, які представлені переважно хондроїтин-4-сульфатами (Ф2) та гепарансульфатами (Ф3) у легеневій тканині. Дефіцит хондроїтин-4-сульфату, який є компонентом судинної стінки, і гепарансульфату (основного компонента судинного глікокалікса) відображає функціональні та структурні пошкодження ендотелію.

Більшість функцій ендотелію реалізується завдяки його взаємодії з макромолекулами МСТ [2, 3, 8, 9]. ГАГ, що синтезуються ендоте-

лієм, входять до складу глікокалікса ендотелію та широко представлені в базальній мембрані судинної стінки [2, 5, 8]. Під час загострення на тлі вентиляційних порушень і альвеолярної гіпоксії ендотеліальна дисфункція та дезорганізація МСТ є патогномонічними в підтримці патологічного процесу дихальних шляхів. При оцінюванні рівнів біохімічних маркерів обміну СТ, таких, як рівні загального ХІС у крові та оксипроліну й уонових кислот у сечі, було відзначено відхилення від нормативних показників. У дітей усіх підгруп зареєстровано вірогідне підвищення рівнів ХІС у крові, найсуттєвіше (до 0,17 г/л) у пацієнтів з тяжким і середньої тяжкості перебігом БА, та зростання концентрації метаболітів ГАГ у сечі за рівнем уонових кислот. Ці дані відображають, з одного боку, що дисфункція МСТ супроводжується дезорганізацією строми легень, до основи якої входять ХІС. З іншого боку, логічно припустити, що найбільш виражена дисфункція МСТ характерна для тяжкого перебігу БА з явною дезорганізацією строми легень. Найменший рівень дезорганізації МСТ відзначено в дітей 2А підгрупи (легка інтермітуюча БА). У пацієнтів цієї підгрупи переважно знижувались рівні Ф3 (гепарансульфати) – без реакції строми легень.

При проведенні кореляційного аналізу між біохімічними маркерами обміну СТ і показниками ФЗД відзначено такі закономірності (табл. 2).

У дітей із РОБ під час загострення зареєстровано сильні й середньої сили прямі кореляції між основними показниками ФЗД і рівнем маркера дезорганізації колагенових

Таблиця 1 – Статистичні характеристики концентрації показників обміну сполучної тканини в сироватці крові та сечі дітей з обструктивними захворюваннями легень під час загострення і групи контролю (Me(Lq;Uq))

Показник	Діти з обструктивними захворюваннями легень під час загострення				Група контролю
	1А підгрупа	2А підгрупа	3А підгрупа	4А підгрупа	
Сироватка крові					
ХІС, г/л	0,12* (0,07;0,13)	0,09* (0,07;0,15)	0,11* (0,08;0,13)	0,17* (0,14;0,20)	0,05 (0,41;0,75)
ГАГ, од.	9,90* (9,50;10,40)	9,75* (7,75;10,60)	8,70* (8,05;9,35)	9,90* (9,40;10,80)	12,70 (12,60;12,90)
Ф1, од.	6,25* (6,20;6,80)	6,20 (5,25;6,75)	5,80 (5,35;6,50)	6,80* (6,50;7,40)	5,90 (5,60;6,10)
Ф2, од.	2,20* (1,70;2,50)	1,90* (1,30;2,50)	1,65* (1,35;1,90)	1,40* (1,20;1,95)	3,80 (3,70;4,00)
Ф3, од.	1,30* (1,10;1,50)	1,35* (1,20;1,50)	1,15* (0,90;1,45)	1,40* (1,40;2,00)	3,00 (2,60;3,15)
Сеча					
Оксипролін, мг/добу	52,0* (44,0;56,0)	58,0* (50,0;88,0)	49,0* (46,0;55,0)	49,0* (46,0;55,0)	23,0 (18,0;24,0)
Уронові кислоти, мг/мл	5,80* (4,70;6,70)	5,10* (4,50;6,50)	5,45* (4,70;6,60)	6,00* (5,60;6,40)	3,90 (3,60;4,60)

Примітка. Тут і в таблиці 4: Me – медіана, Lq – нижній кuartіль, Uq – верхній кuartіль.

Таблиця 2 – Матриця інтеркореляцій показників ФЗД та обміну сполучної тканини в дітей із рецидивним обструктивним бронхітом під час загострення

Оксипролін у сечі	ФЗД	Уронові кислоти
+0,26	ОФВ ₁	-0,6*
+0,50*	MEF-75	-0,5*
+0,90*	MEF-50	-0,46*
+0,564*	MEF-25	-0,56*

Примітка. Тут і в таблицях 3 і 5: * – $p < 0,05$.

волокон (оксипролін у сечі). Також визначено середньої сили зворотні кореляції між показниками ФЗД і рівнем маркера дезорганізації МСТ (уронові кислоти в сечі). Вочевидь, у хворих цієї підгрупи дезорганізація МСТ, у вигляді підвищеної екскреції уронових кислот із сечею, впливає на бронхіальну прохідність шляхом участі у формуванні запального набряку, який відіграє провідну роль у генезі обструктивного синдрому в дітей цієї вікової групи. У пацієнтів 2А підгрупи (легка інтермітуюча астма) кореляційна структура зберігається в тих самих пропорціях, що й у 1А підгрупі, однак з'являються нові прямі зв'язки між рівнем хондроїтин-6-сульфатів (Ф1) і прохідністю проксимальних відділів трахеобронхіального дерева (MEF-75, $r = +0,48$; MEF-50, $r = +0,546$), що, можливо, пов'язано з початковим етапом дезорганізації строми легень.

У пацієнтів з персистуючою БА кількість значущих кореляцій між показниками ФЗД та обміну СТ збільшується.

З'являються негативні кореляційні зв'язки між маркерами дезорганізації МСТ і колагену та показниками в'язкісного дихального опору й ЖЄЛ (табл. 3). Визначено прямий кореляційний зв'язок між рівнями уронових кислот у сечі та середнього тиску в легеневій артерії (РЛА). Такі зміни кореляційної структури вказують на те, що в пацієнтів із персистуючою БА в період загострення, крім дисфункції МСТ, яка пов'язана з порушенням бронхіальної прохідності, приєднуються порушення еластичних властивостей легень, що, очевидно, можна пояснити дезорганізацією колагенових структур (середньої сили зворотні кореляційні зв'язки між рівнем оксипроліну в сечі й показниками ФЗД). У хворих 4А підгрупи прямий кореляційний зв'язок між рівнями уронових кислот у сечі й РЛА ($r = +0,651$; $p < 0,05$) підкреслює роль

дисфункції МСТ у формуванні ендотеліальної дисфункції і транзиторної легеневої гіпертензії у хворих на БА з тяжким перебігом.

Під час ремісії відзначено тенденцію до нормалізації рівнів показників обміну МСТ у дітей 1Б, 2Б і 3Б підгруп (табл. 4), хоча концентрація загальних ГАГ у крові залишається вірогідно нижчою порівняно з нормативами. У пацієнтів цих підгруп нормалізуються рівні ХІС у крові, мають тенденцію до зменшення, однак залишаються достовірно високими концентрації оксипроліну й уронових кислот у сечі, зберігаються статистично значуще низькими рівні Ф2, Ф3. Зазначені зміни, вочевидь, відображають збереження дисфункції ендотелію під час ремісії. У хворих на тяжку й середньої тяжкості БА (4Б підгрупа) у період ремісії зберігаються суттєві біохімічні ознаки дезорганізації МСТ, що проявляються вірогідним підвищенням рівнів ХІС, Ф1, Ф3, оксипроліну й уронових кислот. Це доводить, що під час ремісії у хворих з тяжким перебігом БА не відбувається відновлення морфофункціонального стану СТ.

Під час оцінювання кореляцій у пацієнтів із РОБ у період ремісії відзначено формування нових зв'язків між показниками ФЗД і маркерами обміну МСТ (табл. 5).

Це доводить наявність тісного зв'язку між показниками метаболізму МСТ і станом бронхіальної прохідності. У кореляційній структурі хворих на інтермітуючу БА (2Б підгрупа) під час ремісії зафіксовано значну кількість рогідних інтеркореляцій між рівнями ГАГ, уронових кислот і показниками ФЗД (ГАГ-Rfo exp $r = -0,65$; ГАГ-ЖЄЛ $r = -0,53$; ГАГ-ОФВ₁ $r = -0,40$; ГАГ-MEF-75 $r = -0,54$; ГАГ-MEF-50 $r = -0,41$; ГАГ-MEF-25 $r = -0,42$; ГАГ-MEF-75 $r = -0,54$; уронові кислоти-Rfo $r = +0,71$; уронові кислоти-Rfo exp $r = +0,81$), ураховуючи, що під час ремісії для хворих на

Таблиця 3 – Матриця інтеркореляцій показників ФЗД та обміну сполучної тканини в дітей із персистуючою бронхіальною астмою під час загострення

Оксипролін у сечі	ФЗД	Уронові кислоти
-0,467*	Rfo заг	-0,32
-0,39*	Rfo exp	-0,346*
-0,59*	Rfo ins	-0,17
-0,59*	ЖЄЛ	+0,2

Таблиця 4 – Статистичні характеристики концентрації показників обміну сполучної тканини в сироватці крові та сечі дітей з обструктивними захворюваннями легень під час ремісії (Me(Lq;Uq))

Показник	Діти з обструктивними захворюваннями легень під час ремісії				Група контролю
	1Б підгрупа	2Б підгрупа	3Б підгрупа	4Б підгрупа	
Сироватка крові					
ХІС, г/л	0,07 (0,06;0,09)	0,08 (0,07;0,09)	0,07 (0,04;0,10)	0,11* (0,07;0,12)	0,05 (0,41;0,75)
ГАГ, од.	8,90* (8,40; 9,50)	9,80* (8,10;10,40)	8,85* (7,50;9,30)	10,00* (9,50;10,30)	12,70 (12,60;12,90)
Ф1, од.	5,50 (5,20;6,00)	5,70 (5,30;7,30)	5,85 (5,00;6,20)	6,20* (6,00;6,80)	5,90 (5,60;6,10)
Ф2, од.	2,10* (1,30;2,20)	1,60* (1,30;2,50)	1,95* (1,20;2,20)	2,10* (2,00;2,30)	3,80 (3,70;4,00)
Ф3, од.	1,40* (1,30;1,70)	1,20* (1,10;1,40)	1,40* (1,30;1,60)	1,40* (1,10;1,60)	3,00 (2,60;3,15)
Сеча					
Оксипролін, мг/добу	42,0* (30,5;47,0)	47,50* (45,0;52,5)	42,0* (36,0;60,0)	62,0* (58,0;69,0)	23,0 (18,0;24,0)
Уронові кислоти, мг/мл	5,5* (4,8;6,4)	4,9 (3,2;5,8)	4,8 (2,7;5,3)	5,8* (4,5;6,1)	3,90 (3,60;4,60)

Таблиця 5 – Матриця інтеркореляцій показників ФЗД та обміну сполучної тканини в дітей із рецидивним бронхітом під час ремісії

Уронові кислоти	ФЗД	ХІС
+0,6*	MEF-75	+0,54*
-0,542*	MEF-50	-0,542*
-0,46*	MEF-25	-0,41*

інтермітуючу БА характерне помірне збільшення в'язкісного дихального опору на тлі нормативних швидкісних показників бронхіальної прохідності. Можливо, помірна дезорганізація МСТ під час ремісії призводить до збереження підвищеного бронхіального опору, що є одним з елементів гіперреактивності бронхів.

ВИСНОВКИ. 1. У хворих на рецидивний обструктивний бронхіт і бронхіальну астму спостерігаються порушення обміну сполучної тканини залежно від фази і тяжкості захворювання.

2. У фазу загострення в дітей усіх підгруп відзначено односпрямовані зміни у вигляді зниження рівнів ГАГ і його фракцій та підвищення концентрацій ХІС у крові, оксипроліну й уронових кислот у сечі.

3. Під час ремісії біохімічні показники обміну сполучної тканини у хворих змінювалися різ-

носпрямовано. Відзначено підвищення рівня загальних ГАГ у крові, нормалізацію рівнів ХІС у хворих на рецидивний обструктивний бронхіт, інтермітуючу астму та персистуючу астму легкого ступеня і стійке зниження концентрації гепарансульфатів (Ф3) у пацієнтів усіх груп.

4. У дітей із тяжким перебігом персистуючої бронхіальної астми в період ремісії зберігається підвищення рівнів ХІС у крові, оксипроліну й уронових кислот у сечі порівняно з пацієнтами інших підгруп.

5. Доведено наявність зв'язків між рівнями біохімічних маркерів обміну сполучної тканини та основними показниками вентиляційної функції легень у хворих на бронхіальну астму і рецидивний обструктивний бронхіт.

6. Дисфункція обміну сполучної тканини, яку було визначено, можливо, є одним із механізмів формування як вентиляційних порушень, так і процесів ремоделювання дихальних шляхів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аллергические болезни у детей / под ред. М. Я. Студеникина, И. И. Балаболкина. – М. : Медицина, 1998. – 348 с.
2. Гоніський Я. І. Біохімія людини / Я. І. Гоніський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль, 2001. – 735 с.

3. Грищенко О. В. Роль матрикса соединительной ткани в обеспечении функциональной активности эндотелия у беременных / О. В. Грищенко, А. В. Сторчак // Репродуктивная гинекология. – 2011. – № 1. – С. 36–41.

4. Патологическая физиология : учебник для студентов мед. вузов / [Н. Н. Зайко, Ю. В. Быць, А. В. Атаман и др.]. – К. : Логос, 1996. – 647 с.
5. Серов В. В. Соединительная ткань: функциональная морфология и общая патология / В. В. Серов, А. Б. Шехтер. – М. : Медицина, 1981. – 312 с.
6. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани / Л. И. Слуцкий. – М. : Медицина, 1969. – 375 с.
7. Федосеев Г. Б. Бронхиальная астма / Г. Б. Федосеев, В. И. Трофимов. – СПб. : Нордмедиздат, 2006. – С. 32–33.
8. Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells / J. K. Burgess, P. R. A. Johnson, Qi Ge [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2003. – **167**. – P. 71–77.
9. Siegel G. Connective tissue: more than just a matrix for cells. Comprehensive human physiology (Greger R, Windhorst U, eds.) / G. Siegel. – Berlin–Heidelberg : Springer-Verlag, 1996. – P. 173–224.

В. В. Поляков, А. С. Сенаторова

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ

Резюме

Изучены особенности метаболизма соединительной ткани у 164 детей в возрасте 1–17 лет с бронхиальной астмой и рецидивирующим обструктивным бронхитом. Выяснено, что нарушения обмена соединительной ткани зависят от фазы и тяжести заболевания. Доказано наличие связей между уровнями биохимических маркеров обмена соединительной ткани и основными показателями вентиляционной функции легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит, обмен соединительной ткани, дети.

V. V. Polyakov, H. S. Senatorova

KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

THE FEATURES OF CONNECTIVE TISSUE METABOLISM IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AND RECIDIVATING OBSTRUCTIVE BRONCHITIS

Summary

The features of connective tissue metabolism in 164 children at the age of 1–17 years with bronchial asthma and recidivating obstructive bronchitis were determined. It was found out that disorders of connective tissue metabolism depend on a period and severity of a disease. The presence of correlations between the levels of biochemical markers of connective tissue metabolism and basic lung ventilation function parameters were proved.

KEY WORDS: bronchial asthma, recidivating obstructive bronchitis, connective tissue metabolism, children.

Отримано 19.04.12

Адреса для листування: В. В. Поляков, Харківський національний медичний університет, вул. Муранова, 5, Харків, 61093, Україна, e-mail: doc.polyakov@yahoo.com

СИНТЕЗ ТА ДІУРЕТИЧНА ДІЯ АЛКІЛАМІДІВ 4-ГІДРОКСИ-2-ОКСО-1,2,5,6,7,8-ГЕКСАГІДРОХІНОЛІН-3-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

З метою виявлення нових закономірностей зв'язку "структура–діуретична активність" в ряду амідованих похідних хінолін-3-карбонових кислот здійснено синтез алкіламідів 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонових кислот. Проведені біологічні випробування показали, що введення алкільних груп в амідний фрагмент з одночасним відновленням бензенової частини молекули призводить до спаду діуретичних властивостей хінолін-3-карбоксамідів.

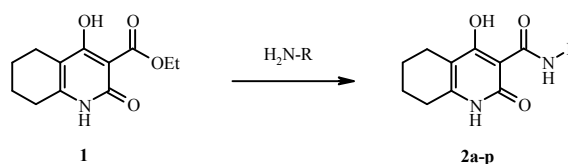
КЛЮЧОВІ СЛОВА: біоізостеричні переміщення, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідро-хінолін-3-карбоксаміди, діуретична активність.

ВСТУП. Запропонований Ірвінгом Ленгмюром ще на початку XX століття термін "ізомери" стосувався виключно "молекул або іонів, які мають однакову кількість атомів та однакову кількість і розташування електронів" [1]. Звідси ізомеричні переміщення означали заміну атома чи їх групи на подібну за розміром або валентністю. Якщо ж при цьому зберігалася й фізіологічна активність, то заміну називали "біоізостеричною". Однак за наших часів термін "біоізостер" став ширшим і тепер стосується також сполук, одержаних шляхом заміни їх фрагментів на, здавалося б, зовсім "несхожі" угруповання. Головна умова – збереження біологічних властивостей базової структури [9]. В цілому концепція біоізостеричних переміщень виявилася досить продуктивною і зараз є одним з найбільш ефективних методів пошуку та створення нових лікарських засобів з покращеними властивостями [4, 5, 7, 8, 10–14].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Після виявлення діуретичних властивостей у 4-R-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів [3] нами розпочато широкі дослідження з пошуку структур-лідів, які були б придатні для подальшого поглибленого вивчення та відповідали б сучасним вимогам до потенційних лікарських препаратів. Одним з фрагментів цієї комплексної роботи і є дане повідомлення, присвячене відновленням аналогам досліджуваного ряду сполук. Слід зазначити, що, хоча заміна хіно-

лінового ядра гексагідрохіноліновим і проведена за методологією біоізостеричних переміщень, однак це зовсім не означає, що така модифікація дійсно виявиться успішною. Дати остаточну відповідь зможе тільки експеримент.

Об'єкти дослідження – алкіламідів 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонової кислоти (**2a-p**) – синтезовано шляхом амідування етилового естеру **1** відповідними первинними алкіламінами в умовах, що визначаються фізичними властивостями амінів, за такою схемою:



2: а R=CH₃; б R=C₂H₅; в R=CH₂CH=CH₂; г R=C₃H₇; д R=*i*-C₃H₇; е R=C₄H₉; ж R=*i*-C₄H₉; з R=*s*-C₄H₉; и R=C₅H₁₁; і R=*i*-C₅H₁₁; к R=C₆H₁₃; л R=C₇H₁₅; м R=C₈H₁₇; н R=C₉H₁₉; о R=C₁₀H₂₁; п R=C₁₁H₂₃; р R=C₁₂H₂₅

Схема.

Одержані алкіламідів 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонової кислоти (**2a-p**) є безбарвними кристалічними речовинами, помірно розчинними в ДМФА та ДМСО, малорозчинними в етанолі й практично нерозчинними у воді, діетиловому естері та гексані (табл. 1). Для підтвердження їх хімічної будови використано спектроскопію ЯМР ¹H (табл. 2). Характерною особливістю спектрів ЯМР ¹H алкіламідів **2a-p** є те, що метиленові ланки гексагідрохінолонового ядра проявля-

Таблиця 1 – Характеристики алкіламідів
4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбоної кислоти (2а-р)

Сполука	Емпірична формула	Т. пл., °С	Знайдено, %			Вирахувано, %			Вихід, %	Діуретична активність, % до контролю
			С	Н	Н	С	Н	Н		
2а	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃	269–271	59,57	6,44	12,52	59,45	6,35	12,60	93	-16
2б	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	260–262	59,89	6,75	11,77	61,00	6,83	11,86	90	+7
2в	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	231–233	62,96	6,62	11,39	62,89	6,50	11,28	95	+1
2г	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	236–238	62,47	7,33	11,07	62,38	7,25	11,19	92	-32
2д	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	263–265	62,45	7,36	11,25	62,38	7,25	11,19	81	-10
2е	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	201–203	63,54	7,52	10,50	63,62	7,63	10,60	88	-31
2ж	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	238–240	63,56	7,69	10,52	63,62	7,63	10,60	92	+9
2з	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	205–207	63,70	7,71	10,68	63,62	7,63	10,60	80	+20
2и	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	182–184	64,84	8,05	10,57	64,73	7,97	10,66	86	-14
2і	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	187–189	64,65	7,90	10,55	64,73	7,97	10,66	89	+11
2к	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₃	166–168	65,82	8,38	9,67	65,73	8,27	9,58	83	+2
2л	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₃	173–175	66,73	8,64	9,06	66,64	8,55	9,14	85	+25
2м	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	170–172	67,39	8,72	8,66	67,47	8,81	8,74	87	-68
2н	C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₃	154–156	68,33	8,95	8,44	68,23	9,04	8,38	85	-32
2о	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃	145–147	68,85	9,18	7,92	68,93	9,26	8,04	90	+31
2п	C ₂₁ H ₃₄ N ₂ O ₃	139–141	69,48	9,56	7,80	69,58	9,45	7,73	86	+18
2р	C ₂₂ H ₃₆ N ₂ O ₃	133–135	70,11	9,53	7,53	70,18	9,64	7,44	93	-8
	Гіпотіазид	–	–	–	–	–	–	–	–	+62

Примітка. “+” – посилення, “-” – пригнічення діурезу відносно контролю, взятого за 100 %.

Таблиця 2 – Спектри ЯМР ¹Н синтезованих сполук, δ, м.д.

Сполука	ОН (1H, c)	NH хіноліну (1H, c)	NH-Alk (1H)	CH ₂ хінолону*		R
				5-CH ₂ (2H, м)	6,7-CH ₂ (4H, м)	
2а	16,13	11,46	10,12 к	2,34	1,65	2,87 (3H, д, CH ₃)
2б	16,21	11,43	10,19 т	2,30	1,66	3,31 (2H, кв, NCH ₂); 1,13 (3H, т, CH ₃)
2в	15,97	11,49	10,36 т	2,31	1,66	5,94 (1H, м, CH); 5,13 (2H, м, =CH ₂); 3,95 (2H, т, NHCH ₂)
2г	16,23	11,48	10,17 т	2,29	1,64	3,23 (2H, к, NCH ₂); 1,52 (2H, м, NCH ₂ CH ₂); 0,88 (3H, т, CH ₃)
2д	16,20	11,42	10,18 т	2,31	1,67	4,05 (1H, м, CH); 1,17 (6H, д, 2CH ₃)
2е	16,21	11,41	10,25 т	2,32	1,67	3,32 (2H, к, NCH ₂); 1,44 (4H, м, CH ₂ CH ₂ CH ₃); 0,91 (3H, т, CH ₃)
2ж	16,18	11,44	10,34 т	2,32	1,67	3,21 (2H, т, NCH ₂); 1,90 (1H, м, CH); 0,91 (6H, д, 2CH ₃)
2з	16,23	11,42	10,20 д	2,30	1,65	3,87 (1H, м, CH); 1,51 (2H, кв, CH ₂ CH ₃); 1,16 (3H, д, NCHCH ₃); 0,87 (3H, т, CH ₂ CH ₃)
2и	16,18	11,44	10,23 т	2,29	1,64	3,28 (2H, к, NCH ₂); 1,50 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,27 (4H, м, (CH ₂) ₂ CH ₃); 0,87 (3H, т, CH ₃)
2і	16,15	11,41	10,22 т	2,29	1,65	3,30 (2H, к, NCH ₂); 1,56 (1H, м, CH); 1,39 (2H, к, NCH ₂ CH ₂); 0,89 (6H, д, 2CH ₃)
2к	16,19	11,46	10,23 т	2,30	1,66	3,28 (2H, к, NCH ₂); 1,50 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,28 (6H, м, (CH ₂) ₃ CH ₃); 0,84 (3H, т, CH ₃)
2л	16,18	11,43	10,21 т	2,29	1,65	3,29 (2H, к, NCH ₂); 1,49 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,27 (8H, м, (CH ₂) ₄ CH ₃); 0,83 (3H, т, CH ₃)
2м	16,20	11,44	10,22 т	2,28	1,66	3,28 (2H, к, NCH ₂); 1,48 (2H, кв, J=NCH ₂ CH ₂); 1,26 (10H, м, (CH ₂) ₅ CH ₃); 0,82 (3H, т, J=CH ₃)
2н	16,18	11,43	10,22 т	2,28	1,66	3,28 (2H, к, NCH ₂); 1,49 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,24 (12H, м, (CH ₂) ₆ CH ₃); 0,83 (3H, т, CH ₃)
2о	16,20	11,43	10,21 т	2,29	1,67	3,29 (2H, к, NCH ₂); 1,50 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,21 (14H, м, (CH ₂) ₇ CH ₃); 0,82 (3H, т, CH ₃)
2п	16,17	11,44	10,22 т	2,30	1,66	3,28 (2H, к, NCH ₂); 1,48 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,22 (16H, м, (CH ₂) ₈ CH ₃); 0,81 (3H, т, CH ₃)
2р	16,15	11,38	10,23 т	2,32	1,68	3,30 (2H, к, NCH ₂); 1,49 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,24 (18H, м, (CH ₂) ₉ CH ₃); 0,82 (3H, т, CH ₃)

Примітка. * – мультиплетний сигнал протонів 8-CH₂-групи хінолону в амідах **2а-р** збігається із сигналами залишкових протонів розчинника (2,50 м.д.).

ються трьома окремими мультиплетами інтенсивністю 2, 2 та 4H кожний, причому перший з них, на жаль, збігся із сигналами залишкових протонів розчинника. Однак це не завадило провести аналіз спектрів – точні віднесення означених сигналів зроблено за допомогою гомоядерного ефекту Оверхаузера [6].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Спектри ЯМР ^1H синтезованих речовин зареєстровано на спектрометрі Bruker AC-300, робоча частота складає 300 МГц, розчинник – $\text{DMSO}-\text{D}_6$, внутрішній стандарт – TMS.

Метиламід 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонової кислоти (**2a**). Розчин 2,37 г (0,01 моль) етилового естеру **1** в 30 мл етанолу насичують газоподібним метиламіном і залишають при кімнатній температурі на 3–4 год. Після цього реакційну суміш розбавляють холодною водою і підкислюють розведеною (1:1) HCl до $\text{pH} \approx 4,5$. Осад метиламиду **2a** відфільтровують, промивають на фільтрі декілька разів холодною водою, сушать. Кристалізують з етанолу.

Етиламід **2b** одержано за аналогічною методикою.

Алкиламід 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонової кислоти **2в-р** (загальна методика). До розчину 2,37 г (0,01 моль) етилового естеру **1** в 20 мл етанолу додають 0,011 моль відповідного алкіламіну і кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 3 год (у випадку *ізо*-пропіламіну тривалість реакції збільшують до 6 год). Наступну обробку реакційної суміші та виділення кінцевого продукту

проводять за методикою попереднього досліджу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вплив синтезованих алкіламідів **2a-р** на сечовивідну функцію нирок вивчали на безпородних білих щурах масою 180–200 г за стандартною методикою [2] при пероральному способі введення (20 мг/кг) та порівняно з гіпотіазидом (40 мг/кг). Реєстрацію діурезу здійснювали через 4 год.

Одержані експериментальні дані (табл. 1) переконливо свідчать про те, що відновлення бензенової частини молекули 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів призводить до практично повної втрати сечогінних властивостей, а в окремих випадках (наприклад октиламід **2m**) – навіть до появи вираженої антидіуретичної дії. Таким чином, є всі підстави стверджувати, що принаймні стосовно впливу на діурез 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолінова та 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолінова молекулярні системи не є біоізостерними.

ВИСНОВКИ. 1. Запропоновано препаративні методики одержання та здійснено синтез серії нових алкіламідів 4-гідрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагідрохінолін-3-карбонової кислоти, будову яких підтверджено спектрами ЯМР ^1H .

2. Вивчення впливу синтезованих речовин на сечовивідну функцію нирок показало, що в цілому після гідрування бензинового фрагмента хінолін-3-карбоксаміди втрачають здатність посилювати діурез.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зефирова О. Н. Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма / О. Н. Зефирова, Н. С. Зефиров // Вестн. Моск. ун-та. – 2002. – **43**, № 4. – С. 251–256. – (Серия “Химия”).
2. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура – М.: Медицина, 2000. – С. 103–104.
3. Украинец И. В. 4-Гидроксихинолоны-2. 121. Синтез и биологические свойства алкиламидов 1-гидрокси-3-оксо-5,6-дигидро-3H-пирроло[3,2,1-*i,j*]хинолин-2-карбоновой кислоты / И. В. Украинец, Н. Л. Березнякова, Е. В. Моспанова // Химия гетероцикл. соединений. – 2007. – № 7. – С. 1015–1022.
4. Devereux M. Quantum Isostere Database: a web-based tool using quantum chemical topology to predict bioisosteric replacements for drug design / M. Devereux, P. L. Popelier, I. M. McLay // J. Chem. Inf. Model. – 2009. – **49**, № 6. – P. 1497–1513.

5. Dihydropyridine neuropeptide Y Y1 receptor antagonists 2. bioisosteric urea replacements / G. S. Poindexter, M. A. Bruce, J. G. Breitenbucher [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2004. – **12**, № 2. – P. 507–521.
6. Gunther H. NMR Spectroscopy: Basis principles, concepts, and applications in Chemistry / H. Gunther. – Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1995. – 602 p.
7. Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT). 2. Modification of fatty acid anilide ACAT inhibitors: bioisosteric replacement of the amide bond / W. H. Roark, B. D. Roth, A. Holmes [et al.] // J. Med. Chem. – 1993. – **36**, № 11. – P. 1662–1668.
8. Investigation of potential bioisosteric replacements for the carboxyl groups of peptidomimetic inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: identification of a tetrazole-containing inhibitor with cellular activity / C. Liljebris, S. D. Larsen, D. Ogg [et al.] // J. Med. Chem. – 2002. – **45**, № 9. – P. 1785–1798.
9. King F. D. Medicinal Chemistry: Principles and

Practice / F. D. King. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2002. – 447 p.

10. Polanski J. A search for new glucophores by isosteric replacement of carboxylic function / J. Polanski, K. Jarzembek, V. Lysiak // Acta Pol. Pharm. – 2000. – Suppl. 57. – P. 80–81.

11. Preparation and evaluation of trisubstituted pyrimidines as phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. 3-Hydroxyphenol analogues and bioisosteric replacements / J. M. Large, J. E. Torr, F. I. Raynaud [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2011. – **19**, № 2. – P. 836–851.

12. Villar H. O. Computational techniques in fragment based drug discovery / H. O. Villar, M. R. Hansen // Curr. Top. Med. Chem. – 2007. – **7**, № 15. – P. 1509–1513.

13. Wagener M. The quest for bioisosteric replacements / M. Wagener J. P. Lommerse // J. Chem. Inf. Model. – 2006. – **46**, № 2. – P. 677–685.

14. Wassermann A. M. Large-scale exploration of bioisosteric replacements on the basis of matched molecular pairs / A. M. Wassermann, J. Bajorath // Future Med. Chem. – 2011. – **3**, № 4. – P. 425–436.

М. Ю. Голик, И. В. Украинец, В. Н. Кравченко, Л. А. Петрушова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

СИНТЕЗ И ДИУРЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АЛКИЛАМИДОВ 4-ГИДРОКСИ-2-ОКСО-1,2,5,6,7,8-ГЕКСАГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

С целью выявления новых закономерностей связи “структура–диуретическая активность” в ряду амидированных производных хинолин-3-карбоновых кислот осуществлен синтез алкиламидами 4-гидрокси-2-оксо-1,2,5,6,7,8-гексагидрохинолин-3-карбоновых кислот. Проведенные биологические испытания показали, что введение алкильных групп в амидный фрагмент с одновременным восстановлением бензольной части молекулы приводит к спаду диуретических свойств хинолин-3-карбоксамидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоизостерические перемещения, 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамиды, диуретическая активность.

M. Yu. Holik, I. V. Ukrainets, V. M. Kravchenko, L. O. Petrushova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

SYNTHESIS AND DIURETIC ACTION OF 4-HYDROXY-2-OXO-1,2,5,6,7,8-HEXAHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID ALKYLAMIDES

Summary

To identify new patterns of “structure–diuretic activity” relations among the amidated derivatives of quinoline-3-carboxylic acids the synthesis of 4-hydroxy-2-oxo-1,2,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid alkylamides were carried out. The conducted biological tests showed that introduction of alkyl groups into the amide fragment with simultaneous hydrogenation of benzene part of molecule leads to a decrease of diuretic properties of the quinoline-3-carboxamides.

KEY WORDS: bioisosteric replacements, 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides, diuretic activity.

Отримано 20.06.11

Адреса для листування: І. В. Українець, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна, e-mail: uiv@kharkov.ua.

О. І. Шлюсар¹, М. Є. Блажеєвський, Д. І. Александрова²
 БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ЧЕРНІВЦІ
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
 ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ², ОДЕСА

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТРИФЛЮОПЕРАЗИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРІЇ У ВИГЛЯДІ S-ОКСИДУ

Описано високочутливий спектрофлуориметричний метод кількісного визначення трифлюоперазину гідрохлориду у вигляді його сульфоксиду, одержаного за допомогою пероксомоносульфату. Положення максимумів збудження ($\lambda_{\text{зд}}$) та емісії ($\lambda_{\text{ем}}$) знаходилися при $\lambda_{\text{зд}}=274$ нм/ $\lambda_{\text{ем}}=407$ нм відповідно. Запропонований метод успішно випробуваний під час визначення трифлюоперазину гідрохлориду в пігулках та розчині для ін'єкцій; результати аналізу узгоджуються з результатами, одержаними при виконанні аналізу за допомогою офіційних методик ((98,40 $\pm$ 3,60) та (99,50 $\pm$ 2,45) % відповідно).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спектрофлуориметрія, трифлюоперазину гідрохлорид, S-окиснення, калію гідрогенпероксомоносульфат.

ВСТУП. Піперазинове N₁₀-алкілзаміщене похідне фенотіазину – трифлюоперазину гідрохлорид (2-трифлюорметил-10-[3-метилпіперазиніл-4]-пропіл]-фенотіазину дигідрохлорид, трифторперазину гідрохлорид (ТФ)) – належить до нейролептичних засобів. За інтенсивністю антипсихотичної дії він переважає аміназин. Проявляє сильну протиблювотну дію, альфа-адреноблокуючу активність, чинить виражену екстрапірамідальну дію. Застосовують, головним чином, для лікування шизофренії, психозів та інших патологічних станів [1].

Найбільш важливою властивістю препаратів цієї групи є надзвичайно легка здатність окиснюватися з утворенням відповідних S-оксидів [15]. Висока біологічна активність похідних фенотіазину, а також їх лабільність вимагають розробки чутливих, швидких у виконанні й достатньо вибіркових методик кількісного визначення їх у лікарських препаратах та біологічних об'єктах, наприклад високочутливим методом флуориметрії [14]. Однак наявні в літературі відомості стосовно флуоресцентних властивостей даної групи лікарських засобів вельми обмежені, а іноді суперечливі. Так, згідно з [18], фенотіазини володіють слабкою власною флуоресценцією, і для проведення аналізу вимагається, щоб препарат був попередньо окиснений. Разом із тим, деякі ав-

тори вважають флуориметрію одним з найбільш чутливих і точних фізико-хімічних методів аналізу фенотіазинів, особливо за присутності продуктів окиснення. Крім того, відомо [17], що на флуоресценцію (ФЛ) похідних фенотіазину впливає природа розчинника.

Основним нормативним методом кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції є кислотно-основне титрування у неводному середовищі [2]. Відомі також інші способи кількісного визначення: алкаліметрія за залишком зв'язаної хлоридної кислоти [3, 4], екстракційна фотометрія (за взаємодією препаратів як слабких основ з кислотними індикаторами) [5], а також інші фізико-хімічні методи, такі, як: потенціометрія [6], спектрофотометрія [7, 8] і вольтамперометрія продуктів їх окиснення [9, 10], ВЕРХ [2, 11, 12, 19], метод кінетики [13, 16].

Кількісне визначення ТФ у пігулках та розчині для ін'єкцій рекомендують здійснювати методом прямої спектрофотометрії за власним світлопоглинанням препарату [2, 3].

Метою даної роботи було порівняльне вивчення флуоресценції трифлюоперазину дигідрохлориду та відповідного S-оксиду ТФ (ТФО), отриманого за допомогою калію гідрогенпероксомоносульфату, а також з'ясування можливості кількісного визначення ТФ у вигляді попередньо одержаного ТФО за оптимальних умов.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як об'єкти дослідження використовували трифлюоперазину дигідрохлорид фармакопейної чистоти і його лікарські форми: пігулки трифтазину по 0,005 г, покриті оболонкою (ФФ “Здоров’я”, Харків, Україна), серія 280899; розчин трифтазину 0,2 % для ін'єкцій (ФФ “Дарниця”, Київ, Україна), серія 210900.

Розчини ТФО готували за точними наважками субстанції ТФО, отриманої за автентичною методикою проф. М. Є. Блажеєвського [20], об'ємно-ваговим методом у спектрально чистих розчинниках – метанолі, 95 % етанолі та двічі дистильованій воді. Усі розчини зберігали при температурі 18–20 °С у темному місці.

Як окисник використовували потрійну калійну сіль кислоти Каро ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$) – “Оксон®” виробництва фірми “DuPont”, “extra pure”. Активною її речовиною є калію гідрогенпероксомоносульфат (KHSO_5). Вибір реагента зумовлений його доступністю, зодовільною розчинністю у воді, порівняно високою окисаційною здатністю ($E^0=1,81 \text{ В}$), а також достатньою стійкістю під час зберігання та застосування.

Приготування $2 \cdot 10^2$ моль/л розчину калію гідрогенпероксомоносульфату. Наважку порошку Оксону®, яка містить 0,615 г основної речовини, кількісно переносять у колбу на 100 мл, розчиняють у 70 мл дистильованої води при перемішуванні й доводять об'єм двічі дистильованою водою до позначки.

Спектри збудження та люмінесценції реєстрували при 20 °С на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian) із ксеноновою жарівкою 150 W. Усі спектри коректували за стандартним зразком родаміну В. Калібрування та запис спектрів ФЛ ТФО здійснювали не менше 3–5 разів, усереднювали і віднімали усереднений спектр розчинників. УФ/ВИД спектри світлопоглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра UV 2401 PC фірми “Shimadzu”. Умови: щілина: 5-5; $\lambda_{365}=274 \text{ нм}$; підсилення 660.

Вивчали люмінесцентні властивості ТФО в метанолі, етанолі та воді.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що у порівняльних умовах ФЛ S-оксиду ТФ значно сильніша, ніж така ТФ. Найвища інтенсивність ФЛ для обох досліджуваних похідних спостерігалась у водному розчині.

На підставі одержаних результатів розроблено прості та чутливі методики спектрофлуориметричного визначення лікарської речовини трифлюоперазину дигідрохлориду у вигляді відповідного S-оксиду в пігулках по

5 мг та розчині для ін'єкцій. Методики основані на утворенні інтенсивно флуоресціюючого ТФО – продукту S-окиснення ТФ калію гідрогенпероксомоносульфатом. Схему окиснення трифлюоперазину калію гідрогенпероксомоносульфатом наведено на рисунку 1.

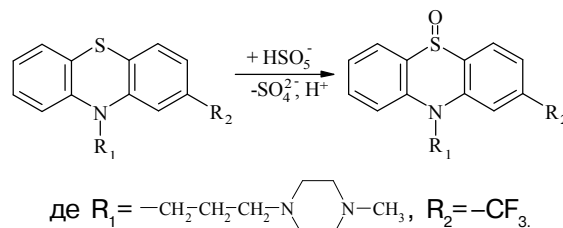


Рис. 1. Схема окиснення трифлюоперазину дигідрохлориду калію гідрогенпероксомоносульфатом.

До водного розчину проби аналіту додавали розчин Оксону® і витримували декілька хвилин. Після відповідного розбавлення вимірювали інтенсивність ФЛ одержаного розчину. На рисунку 2 наведено спектри люмінесценції ТФО, одержаного за посередництва калію гідрогенпероксомоносульфату у водних розчинах. Оптимізовано положення максимумів збудження (λ_{365}) та емісії ($\lambda_{\text{ем}}$), які знаходилися при $\lambda_{365}=274 \text{ нм}$ / $\lambda_{\text{ем}}=407 \text{ нм}$. Градуювальний графік для кількісного визначення ТФ у вигляді ТФО представлено на рисунку 3. Як видно, лінійність зберігалась в інтервалі від 0,05 до 4,0 мкг/мл ($I_{\text{фл}}=192,31c+2,8$, $r=0,999$).

Розчин РСЗ 2,0 мг/мл трифлюоперазину дигідрохлориду. В мірній колбі на 100 мл розчиняють наважку порошку субстанції трифлюоперазину дигідрохлориду, яка містить 200,0 мг основної речовини, у 170 мл двічі дистильованої води, доводять об'єм до позначки і ретельно перемішують.

Методика визначення вмісту трифлюоперазину дигідрохлориду в 0,2 % розчині для ін'єкцій. 1,00 мл 0,2 % розчину трифлюоперазину для ін'єкцій вміщують у мірну колбу

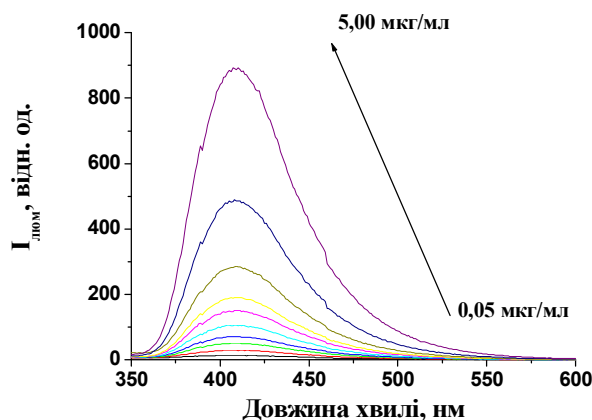


Рис. 2. Спектри люмінесценції ТФО у водних розчинах. $\lambda_{\text{ек}}=274 \text{ нм}$.

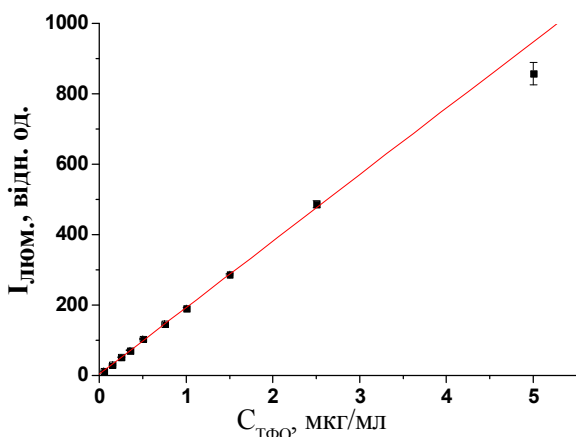


Рис. 3. Градувальний графік для кількісного визначення ТФ у вигляді ТФО.

на 100 мл, додають 0,2 мл $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину калію гідрогенпероксомоносульфату, доводять об'єм двічі дистильованою водою до позначки і ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають 10 мл одержаного розчину, переносять у мірну колбу на 1000 мл, доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою і ретельно перемішують. Інтенсивність ФЛ отриманого розчину вимірюють при $\lambda_{36}=274$ нм/ $\lambda_{ем}=407$ нм. Паралельно за аналогічних умов аналізують розчин РС3 трифлюоперазину.

Масову частку трифлюоперазину дигідрохлориду (W) у розчині для ін'єкцій, у відсотках, розраховують за формулою:

$$W = \frac{0,2000 \cdot I_1 \cdot 100 \cdot 100}{I_0 \cdot 100 \cdot 100},$$

де I_1 – інтенсивність люмінесценції в досліді з досліджуванним розчином, відн. од.;

I_0 – інтенсивність люмінесценції в досліді з розчином робочого стандартного зразка (РС3);

0,2000 – вміст трифлюоперазину дигідрохлориду в 100 мл розчину робочого стандартного зразка (РС3), г;

100, 100 – кратність розбавлення.

Розчин РС3 0,050 мг/мл трифлюоперазину дигідрохлориду. В мірній колбі на 1000 мл розчиняють наважку порошку субстанції трифлюоперазину дигідрохлориду, яка містить 50,0 мг основної речовини, у 100 мл двічі дистильованої води, доводять об'єм до позначки і ретельно перемішують.

Методика визначення вмісту трифлюоперазину дигідрохлориду в пігулках по

5 мг. Точну наважку близько 0,2 г порошку розтертих пігулок трифлюоперазину, що відповідає масі однієї пігулки, змішують із 20 мл 0,1 моль/л розчину хлоридної кислоти, збовтують протягом 20 хв, фільтрують через фільтр “червона стрічка”, залишок на фільтрі ретельно ополіскують трічі порціями по 20 мл двічі дистильованою водою. Об'єднавши фільтрати, кількісно переносять розчин у мірну колбу на 100 мл, додають 1,0 мл $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину калію гідрогенпероксомоносульфату, розчин ретельно збовтують впродовж 2 хв, доводять об'єм двічі дистильованою водою до позначки і знову ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають 10 мл одержаного розчину, переносять у мірну колбу на 1000 мл, доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою і ретельно перемішують. Інтенсивність ФЛ одержаного розчину вимірюють при $\lambda_{36}=274$ нм/ $\lambda_{ем}=407$ нм. Паралельно за аналогічних умов аналізують розчин РС3 трифлюоперазину.

Вміст препарату (X) у пігулці, в міліграмах, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_{РС3} \cdot I_X \cdot \bar{a} \cdot 100}{I_0 \cdot m},$$

де I_X – інтенсивність люмінесценції у досліді з досліджуванним розчином пігулок, відн. од.;

I_0 – інтенсивність люмінесценції в досліді з розчином робочого стандартного зразка (РС3);

$m_{РС3}$ – вміст препарату в розчині РС3, мг/мл;

m – наважка порошку розтертих пігулок, взятих для аналізу, г;

$\bar{a}$ – середня маса пігулки, г.

Одержані результати кількісного визначення трифлюоперазину дигідрохлориду у 0,2 % розчині для ін'єкцій та пігулках по 5 мг у вигляді S-оксиду ТФ методом спектрофлуориметрії показано в таблицях 1 і 2.

Як видно, під час здійснення визначення 0,2–0,5 мкг/мл трифлюоперазину дигідрохлориду за новоопрацьованими методиками методом спектрофлуориметрії $RSD \leq 3,0$ %.

ВИСНОВКИ. Опрацьовано методики та показано можливість кількісного визначення трифлюоперазину дигідрохлориду у 0,2 % розчині для ін'єкцій та пігулках по 5 мг методом спектрофлуориметрії у вигляді S-оксиду, одержаного за допомогою калію гідрогенпероксомоносульфату. При визначенні 0,2–0,5 мкг/мл трифлюоперазину дигідрохлориду $RSD \leq 3,0$ %.

Таблиця 1 – Результати кількісного визначення трифлюоперазину в розчині для ін'єкцій у вигляді S-оксиду методом спектрофлуориметрії ($P=0,95$)

Досліджуваний розчин складу	Взято		Знайдено		Метрологічні характеристики
	розчину	визначуваної речовини	визначуваної речовини		
			г	%	
“Трифтазин” (ФФ “Дарниця”, Київ, Україна), серія 210900 Трифлюоперазину дигідрохлориду* 0,002 г, допоміжних речовин – достатня кількість для одержання 1 мл розчину	1,00	0,00197**	0,00201	100,5	$\bar{X}$ =0,00199 (99,50 %) S =0,39·10 ⁻⁴ $S_{\bar{X}}$ =0,18·10 ⁻⁴ $\Delta\bar{x}$ =0,49·10 ⁻⁴ RSD =1,96 % ε =±2,46 % Δ =+1,96
	1,00	0,00197	0,00197	100,0	
	1,00	0,00197	0,00202	101,0	
	1,00	0,00197	0,00204	102,0	
	1,00	0,00197	0,00194	97,0	

Примітка. * – визначувана речовина; ** – точний вміст трифлюоперазину дигідрохлориду вказано у сертифікаті якості.

Таблиця 2 – Результати кількісного визначення трифлюоперазину дигідрохлориду в пігулках у вигляді S-оксиду методом спектрофлуориметрії ($P=0,95$)

Взято трифлюоперазину дигідрохлориду, мг	Знайдено		Метрологічні характеристики
	мг	%**	
“Трифтазин” – пігулки по 0,005 г, покриті оболонкою ФФ “Здоров’я”, Харків, Україна, серія 280899			
4,8*	5,1	102,0	$\bar{X}$ =4,92 (98,40 %) S =±0,15 S $\bar{X}$ =±0,07 $\Delta \bar{x}$ =±0,18 RSD=3,01 ε =±3,66 % δ =+2,50%
	4,9	98,0	
	5,0	100,0	
	4,9	98,0	
	4,7	94,0	

Примітка. * – вміст встановлено за фармакопейною методикою [3]; ** – за 100 % взято регламентований вміст трифлюоперазину в препараті (в розрахунку на одну пігулку).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ / К. Байерман ; пер. с англ. – М. : Мир, 1987. – 429 с.
- Блажеєвський М. Є. Мікротитриметричне визначення похідних фенотіазину в лікарських формах з використанням пероксикислотного окиснення / М. Є. Блажеєвський // Фармац. журн. – 2001. – № 6. – С. 55–65.
- Блажеєвський М. Є. Непряме полярографічне визначення похідних фенотіазину у вигляді S-оксидів, одержаних за посередництвом пероксикарбонових кислот / М. Є. Блажеєвський // Журн. орган. та фармац. хімії. – 2005. – 3, вип. 2(10). – С. 61–65.
- Блажеєвський М. Є. Синтез, властивості та застосування S-оксидів похідних фенотіазину як вагінальних контрацептивів / М. Є. Блажеєвський // Сучасні технології органічного синтезу та медичної хімії : тез. доп. Всеукр. наук.-практ. конф., м. Харків, 4 квіт. 2003 р. – Х., 2003. – С. 21.
- Блажеєвський М. Є. Спектрофотометричне визначення 10-алкілпохідних фенотіазину в лікарських формах з використанням пероксикислотного окиснення / М. Є. Блажеєвський // Фармац. журн. – 2003. – № 1. – С. 64–73.
- Гайдук О. В. Новая каталитическая реакция для определения производных фенотиазина / О. В. Гайдук, Р. П. Панталер, А. Б. Бланк // Журн. аналит. химии. – 2004. – 59, № 7. – С. 768–772.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків : PIPEG, 2001. – Доповнення I. – 2004. – 520 с.
- Малахова С. В. Количественное определение нонахлазина флуориметрическим методом / С. В. Малахова, П. Л. Сенов // Фармация. – 1976. – 25, № 6. – С. 34–37.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства : пособие для врачей / М. Д. Mashkovskiy. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая волна, 2005. – 1200 с.
- Панкратов А. Н. Спектрофотометрическое, вольтамперометрическое и квантово-химическое исследование реакции окисления фенотиазина / А. Н. Панкратов, И. М. Учаева, А. Н. Степанов // Журн. общей химии. – 1994. – 64, вып. 9. – С. 1527–1533.
- Туркевич М. Фармацевтична хімія (стероїдні гормони, їх синтетичні замінники і гетероциклічні сполуки як лікарські засоби) : підручник / М. Туркевич, О. Владзімірська, Р. Лесик. – Вінниця : НОВА КНИГА, 2003. – 464 с.
- Хвещук П. Ф. Изучение флуоресцентных свойств производных фенотиазина / П. Ф. Хвещук,

A. B. Рудакова // Журн. прикл. химии. – 1994. – **67**, № 10. – С. 1675–1678.

13. Basavaiah K. Use of extractive spectrophotometry and ion-pair formation with chromeazurol S for the assay of some phenothiazine antipsychotic drugs in pharmaceutical formulations / K. Basavaiah, J. Manjunatha Swamy, G. Krishnamurthy // Chem. Anal. – 1999. – **44**, № 6. – P. 1049–1054.

14. Derivative spectrophotometric, thin layer chromatographic-densitometric and high performance liquid chromatographic determination of trifluoperazine hydrochloride in presence of its hydrogen peroxide induced-degradation product / A. El-Gindy, B. El-Zeany, T. Awad, M. M. Shabana // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – **27**, № 1–2. – P. 9–18.

15. Diehl G. Post-column oxidative derivatization for the liquid chromatographic determination of phenothiazines / G. Diehl, U. Karst // Chromatogr. A. – 2000. – **890**, № 2. – P. 281–287.

16. Differential-Pulse Polarographic Determination of Some N-Substituted Phenothiazine Derivatives in

Dosage Forms and Urine Through Treatment with Nitrous Acid / F. Belal, S. M. El-Ashry, I. M. Shehata [et al.] // Microchimica Acta. – 2000. – **135**, № 3–4. – P. 147–154.

17. Efficient oxidizing agents for determination of 2,10-disubstituted phenothiazines / H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuzmicka, J. Karpinska, K. Mielech-Lukasiewicz // Anal. Sci. – 2005. – **21**, № 10. – P. 1149–1153.

18. European pharmacopoeia. – 6th-ed. Council of Europe. – Strasbourg : EDQM, 2007. – 2199 p.

19. Gala B. Use of a stopped-flow/T-format spectrofluorimeter for simultaneous kinetic / B. Gala, A. Gomez-Hens, D. Perez-Bendito // Anal. Chimica Acta. – 1995. – **310**, № 3. – P. 453–459.

20. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography / Einosuke Tanaka, Takako Nakamura, Masaru Terada [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2007. – **854**, № 1–2. – P. 116–120.

О. И. Шлюсар¹, Н. Е. Блажевский, Д. И. Александрова²
БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ЧЕРНОВЦЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ О. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ², ОДЕССА

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИФЛЮОПЕРАЗИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ В ВИДЕ S-ОКСИДА

Резюме

Описан высокочувствительный спектрофлуориметрический метод количественного определения трифлюоперазина гидрохлорида в виде его сульфоксида, полученного с помощью пероксомоносульфата. Положения максимумов возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) и эмиссии ($\lambda_{\text{эм}}$) находились при $\lambda_{\text{возб}}=274$ нм/ $\lambda_{\text{эм}}=407$ нм соответственно. Предложенный метод с успехом апробирован во время определения трифлюоперазина гидрохлорида в таблетках и растворе для инъекций; результаты анализа согласуются с результатами, полученными при выполнении анализа с помощью официальных методик ((98,40±3,60) и (99,50±2,45) % соответственно).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спектрофлуориметрия, трифлюоперазина гидрохлорид, S-окисление, калия гидрогенпероксомоносульфат.

O. I. Shliuser¹, M. Ye. Blazheyevskiy, D. I. Aleksandrova²
BUKOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY¹, CHERNIVTSI
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV
O. V. BOHATSKYI PHYSICAL AND CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE², ODESSA

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRIFLUOPERAZINE BY SPECTROFLUORIMETRIC METHOD AS ITS SULPHOXIDE IN DRUG

Summary

A highly sensitive spectrofluorimetric method is described for determination of trifluoperazine hydrochloride as its sulphoxide. The method involves the use of peroxomonosulphate as an oxidant. The produced fluorescence shows excitation and emission maxima around 274 and 407 nm, respectively. The calibration is linear for 0,05–3 mg of analyte. The proposed method was successfully applied to the determination of trifluoperazine hydrochloride in tablets and injection solution; the obtained results were in agreement with those given the official methods. The percentage recovery was (98,40±3,60) and (99,50±2,4) % respectively.

KEY WORDS: spectrofluorimetry, trifluoperazine hydrochloride, S-oxidation, potassium hydrogenperoxomonosulphate, drug.

Отримано 10.10.11

Адреса для листування: О. І. Шлюсар, вул. Ентузіастів, 8, кв. 87, Чернівці, 58000, Україна.

ОСОБЛИВОСТІ ПОРУШЕНЬ МІНЕРАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ХВОРИХ ІЗ КАЛЬЦИНОЗОМ КЛАПАНІВ СЕРЦЯ НА ДОДІАЛІЗНОМУ ТА ДІАЛІЗНОМУ ЕТАПАХ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

Вивчено динаміку показників мінерального метаболізму у хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН) за умов кальцинозу клапанів серця (ККС). Визначено важливу роль вторинного гіперпаратиреозу в механізмах формування зазначених пошкоджень серця як у додіалізних пацієнтів, так і у хворих, які перебувають на хронічному гемодіалізі (ГД), причому порушення фосфорно-кальцієвого обміну та параметрів його регуляції були більш вираженими у пацієнтів із ККС на діалізному етапі ХХН. Показано, що клапанний кальциноз поєднується з низькою мінеральною щільністю кісткової тканини у ГД-хворих.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічна хвороба нирок, додіалізний етап, гемодіаліз, кальциноз клапанів серця, гіперпаратиреоз, гіперфосфатемія, мінеральна щільність кісткової тканини.

ВСТУП. В останні роки проблема кальцинозу клапанів серця (ККС) у хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН) набуває особливого значення, оскільки зустрічається надто часто, відіграє суттєву роль у формуванні, перебігу серцево-судинної патології та виникненні фатальних подій – розвитку тяжких серцевих дисфункцій, порушень серцевого ритму, серцевої недостатності, артеріальних емболій і раптової смерті [6, 23]. Відповідно до сучасних тенденцій, одними з найважливіших факторів ризику кардіоваскулярного кальцинозу за хронічного пошкодження нирок є розлади мінерального метаболізму [16]. Проте повідомлення щодо ролі порушеного фосфорно-кальцієвого обміну та параметрів його регуляції в реалізації механізмів ККС у хворих, які перебувають на хронічному гемодіалізі (ГД), досить суперечливі [4, 15, 20], у додіалізних пацієнтів – поодинокі [4], а роботи, присвячені дослідженню перебігу зазначених процесів за умов клапанного кальцинозу залежно від етапу ХХН у порівняльному аспекті, взагалі відсутні. Недостатньо вивченим залишається питання зв'язку ККС та структурно-функціонального стану кістки (СФСК) у пацієнтів із ХХН, хоча відомо про паралелізм і патогенетичну взаємозалежність атеросклеротичного пошкодження серця й судин та остеопорозу [12].

Метою даного дослідження стало визначення особливостей та ролі порушень фосфорно-кальцієвого метаболізму в механізмах ККС у хворих на додіалізному і діалізному

етапах ХХН та встановлення залежності клапанного кальцинозу та мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) у ГД-пацієнтів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження було включено 149 (чоловіки/жінки, 69/80; вік – $(48,5 \pm 13,4)$ року; швидкість клубочкової фільтрації (MDRD формула) – $(49,8 \pm 28,5)$ мл/хв на $1,73 \text{ м}^2$) пацієнтів на додіалізному етапі ХХН (I стадія: 7,4 %, II стадія: 25,5 %, III стадія: 40,9 %, IV стадія: 19,5 %, V стадія: 6,7 %) та 94 (чоловіки/жінки, 52/42; вік – $(46,4 \pm 11,2)$ року; тривалість ГД – $(28,9 \pm 32,4)$ місяця) хворих на програмному ГД, які перебували на лікуванні в нефрологічному та гемодіалізному відділеннях Тернопільської університетської лікарні. На додіалізному етапі ХХН переважали пацієнти з хронічним пієлонефритом (37,6 %), на діалізному – з хронічним гломерулонефритом (47,9 %). ГД хворим виконували за стандартною програмою (3 рази на тиждень по 4–4,5 год) на апаратах “Штучна нирка” фірми “Gambro” (Швеція) з використанням напівсинтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера. Забезпечена доза діалізу (коефіцієнт Kt/V), розрахована за формулою натурального логарифму [14], складала не менше 1,2.

Стан мітрального, аортального (АК) клапанів (норма, ущільнення, кальциноз), наявність клапанних дисфункцій, морфометричні та функціональні параметри серця вивчали шляхом проведення доплер-ЕхоКС-дослідження на ультразвуковій системі “HDI-1500” (США) та апараті “Aloka SSD 2000” (Японія) за допо-

могою секторального механічного датчика з частотою 3,5 МГц згідно з рекомендаціями Американського ехокардіографічного товариства. СФСК поперекового відділу хребта (L_1-L_4) досліджували у 72 ГД-хворих методом двофотонної рентгенівської абсорбціометрії за допомогою денситометра DPX-A фірми "Lunar Corp." (США). Досліджували та аналізували такі денситометричні параметри: BMD (bone mineral density) – МЩКТ (г/см²) проєкційної густини; T score (Т-критерій) – число стандартизованих відхилень від пікової МЩКТ. Значення МЩКТ (за Т-критерієм) від -1,0 до 1,0 вважали нормальними, від -1,0 до -2,5 – остеопенією, менше -2,5 – остеопорозом. МЩКТ понад 1,0 розцінювали як остеосклероз [10].

Усім хворим проводили загальноклінічне обстеження, зокрема вивчали анамнез, клінічну симптоматику, використовували стандартні лабораторні й інструментальні тести. З метою дослідження мінерального метаболізму визначали сироватковий вміст загального кальцію (Ca), фосфату (P), активність лужної фосфатази (ЛФ), рівень іонізованого кальцію (Ca^{++}) в крові. Концентрацію інтактного паратгормону (іПТГ) в сироватці крові визначали за допомогою набору DRG® Intact-PTH ELISA, застосовуючи ферментнопідсилений "двоступеневий" сендвіч-тип імуноаналізу.

Дослідження виконано з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, а також рекомендацій Комітету з біоетики при Президії НАМН України.

Для статистичного аналізу даних використовували пакет прикладних програм "STATISTICA" (StatSoft, USA, v6.0). Застосовували методи непараметричної статистики – U-критерій Манна-Уїтні для порівняння показників у двох групах, χ^2 -критерій Пірсона для порівняння частотних величин. Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$. При описуванні кількісних ознак було наведено середні значення та їх стандартні відхилення ($M \pm SD$), якісних – проценти (%).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. ККС виявлено у 44,7 % хворих на хронічному ГД та у 28,2 % додіалізних пацієнтів, що значимо частіше ($\chi^2=6,93$, $p=0,009$) та узгоджується з [4].

Виявлений у даному дослідженні характер порушень фосфорно-кальцієвого метаболізму та параметрів його регуляції в пацієнтів із клапанним кальцинозом як на додіалізованому, так і на діалізованому етапах ХХН (табл. 1, 2) підтверджує домінуючу думку [22] про кардіоваскулярний кальциноз як активний регуляторний процес, у якому беруть участь генетичні чин-

ники, здатні активувати або пригнічувати механізми кальцинозу. Враховуючи динаміку показників Ca^{++} , Ca, P, найімовірніше, в генезі вторинного гіперпаратиреозу (ВГПТ) за умов додіалізації ХХН і ККС важливу роль відіграють порушення в обміні P та, можливо, дефіцит кальцитріолу (КТ) внаслідок ефектів FGF-23 (fibroblast growth factor 23) – кісткового морфогенетичного білка, який, згідно з останніми даними [8, 16], підвищується на ранніх стадіях ХХН і є активним учасником процесів кальцинозу. Гіперфосфатемія, крім прямого впливу на механізми кальцинозу, безпосередньо стимулює паращитоподібні залози, пригнічує синтез КТ у ниркових канальцях, призводить до зниження експресії Ca-чутливих рецепторів паращитоподібних залоз, відтак – сприяє прогресуванню ВГПТ [1, 16]. Характерним проявом надмірності іПТГ у ГД-хворих, можливо, є його безпосередній ефект на процеси клапанного кальцинозу, оскільки значимих змін основних мікроелементів мінерального метаболізму чи їх тенденцій нами зареєстровано не було, що перекликається з [5] та вказує на тяжкість і глибину гіперпаратиреозу в патогенезі ККС даної категорії хворих. Зростання активності ЛФ як одного з остеобластних фенотипічних маркерів у пацієнтів із клапанним кальцинозом за ХХН підтверджує розвиток у них ВГПТ. Роль гіперпаратиреозу в механізмах кальцифікованого аортального стенозу в загальній популяції показано в [18].

Відомо, що при реалізації механізмів підвищеної концентрації іПТГ на формування кардіоваскулярного кальцинозу мають місце активація експресії остеогенних факторів CBFA1/RUNX2 (core-binding factor subunit 1 α /runt-related transcription factor), які трансформують гладеньком'язові клітини до остеобластоподібних, стимуляція ендотеліальної експресії атерогенних факторів, що сприяють прогресуванню атеросклерозу, а також порушення вазореактивності [11]. Наявність зв'язку гіперпродукції іПТГ та ендотеліальної дисфункції [19], а також залежності клапанного кальцинозу зі станом останньої, зокрема системою оксиду азоту (NO) [2, 13], дозволяє сьогодні припустити, що за умов ВГПТ та ХХН мінералізація інтерстиціальних клітин та макрофагів клапанів серця відбувається не без участі системи NO. Крім того, експериментально доведено [21] роль гіперпаратиреозу у формуванні кальцинозу АК через механізм активації ядерного фактора транскрипції каппа В (NF- κ B).

Особливо цікавими були дані, отримані нами при порівнянні показників фосфорно-

Таблиця 1 – Показники фосфорно-кальцієвого обміну в додіалізних хворих залежно від наявності/відсутності кальцинозу клапанів серця (M±SD)

Показник	Відсутність кальцинозу (n=107)	Наявність кальцинозу (n=42)	Z	p
Ca ⁺⁺ , ммоль/л	0,92±0,22	0,86±0,21	Z=1,571	0,116
Ca, ммоль/л	2,18±0,19	2,12±0,21	Z=1,353	0,176
P, ммоль/л	1,39±0,48	1,52±0,49	Z=1,935	0,053
iПТГ, нг/л	124,9±138,3	168,9±180,4	Z=2,589	0,010
ЛФ, мккат/л	1,38±0,47	1,82±0,86	Z=2,385	0,017

Таблиця 2 – Показники фосфорно-кальцієвого обміну та денситометрії у гемодіалізних хворих залежно від наявності/відсутності кальцинозу клапанів серця (M±SD)

Показник	Відсутність кальцинозу (n=52)	Наявність кальцинозу (n=42)	Z	p
Ca ⁺⁺ , ммоль/л	1,04±0,12 (n=41)	0,99±0,15 (n=34)	Z=1,209	0,227
Ca, ммоль/л	2,21±0,09	2,20±0,08	Z=0,560	0,576
P, ммоль/л	2,11±0,50	2,06±0,53	Z=0,107	0,915
iПТГ, нг/л	381,4±406,3	684,5±654,7	Z=2,761	0,006
ЛФ, мккат/л	2,05±0,96	2,89±1,88	Z=2,921	0,003
BMD, г/см ²	1,11±0,16 (n=39)	1,04±0,18 (n=33)	Z=1,650	0,099
T, ум. од.	-0,76±1,29 (n=39)	-1,35±1,41 (n=33)	Z=1,798	0,072

кальцієвого балансу в групах хворих із ККС залежно від етапу ХХН. У ГД-хворих із клапанним кальцинозом (n=42) величини Ca⁺⁺ (Z=2,849, p=0,004), P (Z=4,339, p<0,001), iПТГ (Z=4,129, p<0,001), ЛФ (Z=3,566, p<0,001) були вищими відносно додіалізних пацієнтів із ККС (n=42), а значення Ca у згаданих вище групах не відрізнялись (Z=1,307, p=0,191). Відомо, що порушення мінерального метаболізму та параметрів його регуляції на діалізованому етапі ХХН прогресують порівняно з додіалізісним періодом [3] і, очевидно, можуть відігравати за цих умов домінуючу роль у формуванні клапанного кальцинозу. Значимо більший вміст Ca⁺⁺ у ГД-пацієнтів із ККС відносно додіалізних хворих із клапанним кальцинозом можна пояснити широким застосуванням на ГД діалізуючого розчину з високим вмістом Ca⁺⁺ і тривалим прийманням хворими карбонату Са як фосфатзв'язувального засобу [3, 7].

Про активний перебіг процесів клапанного кальцинозу за ХХН свідчить також встановлене нами вперше зниження МЩКТ поперекового відділу хребта у пацієнтів із ККС, які перебували на хронічному ГД (табл. 2). Більше того, частка ГД-хворих із наявністю остеопорозу (остеопенія та остеопороз) станів у групі кальцинозу мала тенденцію до збільшення (69,7 vs. 48,7 %, $\chi^2=3,24$, p=0,072) порівняно з групою без кальцинозу. Зазначена динаміка денситометричних параметрів узгоджується з даними авторів [4], які спостерігали значиме зменшення МЩКТ передпліччя у ГД-пацієнтів

із клапанним кальцинозом, пояснюючи зв'язок кісткової патології та ККС наявністю спільних для цих станів факторів ризику – високого рівня iПТГ, похилого віку і тривалістю діалізного лікування. Варто відзначити, що в механізмах прогресування атеросклеротичного пошкодження, а отже, кальцинозу важливу роль відіграє розвиток хронічного запалення [17], яке, у свою чергу, індукує резорбцію кісткової тканини [9]. Взагалі розподіл пацієнтів (n=72), які перебували на програмному ГД, за даними СФСРК поперекового відділу хребта, відбувся таким чином: нормальна МЩКТ – 26,4 %, остеопенія різних ступенів тяжкості – 33,3 %, остеопороз – 25,0 % та остеосклероз – 15,3 %.

ВИСНОВКИ. 1. ККС виявляють у близько третини пацієнтів на додіалізованому етапі ХХН і в близько половини хворих, які перебувають на хронічному ГД.

2. Клапанний кальциноз за ХХН поєднується з розвитком ВГПТ, який переважає у ГД-пацієнтів порівняно з додіалізісними хворими.

3. ККС на діалізованому етапі ХХН пов'язаний із зниженням МЩКТ.

4. Наявність комплексу порушень фосфорно-кальцієвого метаболізму та параметрів його регуляції за ХХН і ККС обґрунтовує доцільність вторинної профілактики гіперпаратиреозу як у додіалізних, так і в ГД-хворих, що й стане предметом наших подальших досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Взаимосвязь уровней витамина D, паратгормона, кальция, фосфатов крови у пациентов с хронической болезнью почек, не получающих терапию, замещающую функцию почек / А. В. Смирнов, М. М. Волков, О. В. Галкина [и др.] // Тер. архив. – 2009. – № 8. – С. 49–52.
2. Гоженко А. І. Функціональна активність ендотелію у хворих із кальцинозом клапанів серця на програмному гемодіалізі / А. І. Гоженко, І. Р. Мисула, О. Б. Суслас // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2009. – № 4. – С. 21–24.
3. Иванов Д. Д. Лекции по нефрологии. Диабетическая болезнь почек. Гипертензивная нефропатия. Хроническая почечная недостаточность / Д. Д. Иванов. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2010. – 200 с.
4. Кальциноз сердечных клапанов у пациентов с хронической болезнью почек / М. М. Волков, А. В. Смирнов, В. А. Добронравов [и др.] // Клиническая медицина. – 2009. – № 6. – С. 31–35.
5. Кальциноз структур сердца у больных на программном гемодиализе: связь с факторами риска и показателями внутрисердечной гемодинамики / В. Ю. Шило, Г. Е. Гендлин, Ю. Н. Перекокин [и др.] // Нефрология и диализ. – 2003. – **5**, № 1 (Прилож. 1). – С. 58–67.
6. Кардіоваскулярні ускладнення у хворих на хронічну хворобу нирок / [М. О. Колесник, І. І. Лапчинська, В. К. Ташук та ін.]. – К. : ТОВ “Поліграф-плюс”, 2010. – 224 с.
7. Кулизький М. В. Кальцій, фосфор та паратгормоні залози – стан системи та шляхи його корекції / М. В. Кулизький // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2007. – № 4. – С. 66–73.
8. Механизмы нарушения фосфорно-кальциевого гомеостаза в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных хронической болезнью почек. Роль фактора роста фибробластов-23 (FGF-23) и Klotho / Л. Ю. Милованова, Л. В. Козловская, Ю. С. Милованов [и др.] // Тер. архив. – 2010. – № 6. – С. 66–72.
9. Насонов Е. Л. Остеопороз и заболевания сердечно-сосудистой системы / Е. Л. Насонов // Кардиология. – 2002. – № 3. – С. 80–82.
10. Сміян С. І. Місце денситометрії в діагностиці остеопорозу / С. І. Сміян // Ліки України. – 2008. – № 4. – С. 151–154.
11. Фосфорно-кальциевый обмен и состояние сердечно-сосудистой системы у пациентов с ранними стадиями хронической болезни почек / А. В. Смирнов, М. М. Волков, В. А. Добронравов [и др.] // Тер. архив. – 2010. – № 6. – С. 25–28.
12. Ярема Н. І. Мінеральна щільність кісткової тканини і атерогенність ліпідів у хворих з есенціальною артеріальною гіпертензією / Н. І. Ярема, Б. І. Рудик // Укр. кардіол. журн. – 2004. – № 5. – С. 42–45.
13. Cardiac valve calcification and endothelial dysfunction in predialysis patients with chronic kidney disease / O. B. Susla, I. R. Mysula, A. I. Gozhenko [et al.] // Program and Abstract book of the WCN 2011 Satellite Symposium 8th Conference on Kidney Disease in Disadvantaged Populations: Disparities in Renal Disease – Moving Towards Solutions. – Victoria BC, Canada, 2011. – P. 90.
14. Daugirdas J. T. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: An analysis of error / J. T. Daugirdas // J. Am. Soc. Nephrol. – 1993. – № 4. – P. 1205–1213.
15. Heart valve calcification in patients with end-stage renal disease: analysis for risk factors / F. Tarras, M. Banjelloun, M. Zamd [et al.] // Nephrology (Carlton). – 2006. – **11**, № 6. – P. 494–496.
16. Kendrick J. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification / J. Kendrick, M. Chonchol // Am. J. Kidney Dis. – 2011. – **58**, № 5. – P. 826–834.
17. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vivo and in vitro / M.-M. Zhao, M.-J. Xu, Y. Cai [et al.] // Kidney Int. – 2011. – **79**, № 10. – P. 1071–1079.
18. Parathyroid hormone and vitamin D levels are independently associated with calcific aortic stenosis / K. Linhartova, J. Veselka, G. Sterbakova [et al.] // Circ. J. – 2008. – **72**, № 2. – P. 245–250.
19. Serum fetuin-a concentration and endothelial dysfunction in chronic kidney disease / K. Caqlar, M. I. Yilmaz, M. Saqlam [et al.] // Nephron. Clin. Pract. – 2008. – **108**, № 3. – P. 233–240.
20. Strobecki P. Cardiac valve calcification and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients / P. Strobecki, G. Odrowaz-Sypniewska, J. Manitus // Ren. Fail. – 2005. – **27**, № 6. – P. 733–738.
21. Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats / M. Shuvy, S. Abedat, R. Beeri [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2008. – **79**, № 3. – P. 492–499.
22. Valdivielso J. M. Vascular calcification: types and mechanisms / J. M. Valdivielso // Nefrologia. – 2011. – **31**, № 2. – P. 142–147.
23. Valvular calcification and its relationship to atherosclerosis in chronic kidney disease / Y. Leskinen, T. Paana, H. Saha [et al.] // J. Heart Valve Dis. – 2009. – **18**, № 4. – P. 429–438.

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ МИНЕРАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ С КАЛЬЦИНОЗОМ КЛАПАНОВ СЕРДЦА НА ДОДИАЛИЗНОМ И ДИАЛИЗНОМ ЭТАПАХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Резюме

Изучена динамика показателей минерального метаболизма у больных хронической болезнью почек (ХБП) в условиях кальциноза клапанов сердца (ККС). Определена важная роль вторичного гиперпаратиреоза в механизмах формирования указанных повреждений сердца как у додиализных пациентов, так и у больных, находящихся на хроническом гемодиализе (ГД), причем нарушения фосфорно-кальциевого обмена и параметров его регуляции были более выраженными у пациентов с ККС на диализном этапе ХБП. Показано, что клапанный кальциноз сочетается с низкой минеральной плотностью костной ткани у ГД-больных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническая болезнь почек, додиализный этап, гемодиализ, кальциноз клапанов сердца, гиперпаратиреоз, гиперфосфатемия, минеральная плотность костной ткани.

О. В. Susla
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

CHARACTERISTICS OF MINERAL METABOLISM DISTURBANCES IN PATIENTS WITH CARDIAC VALVE CALCINOSIS UNDER PREDIALYSIS AND DIALYSIS STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

Summary

A study has been conducted on dynamics of indices of mineral metabolism in patients with chronic kidney disease (CKD) under the conditions of cardiac valve calcinosis (CVC). The important role of secondary hyperparathyroidism in mechanisms of the indicated heart damages formation in predialysis patients as well as in patients undergoing chronic haemodialysis (HD) was ascertained, and disturbances of phosphorus-calcium metabolism and parameters of its regulation were more pronounced in patients with CVC under the dialysis stage of CKD at that. It was shown that a valve calcinosis combines with low bone mineral density in HD-patients.

KEY WORDS: chronic kidney disease, predialysis stage, haemodialysis, cardiac valve calcinosis, hyperparathyroidism, hyperphosphatemia, bone mineral density.

Отримано 05.04.12

Адреса для листування: О. В. Сусла, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: oleksandrsusla@rambler.ru

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ЇЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ЗА ПРИСУТНОСТІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

Досліджено стан системи прооксиданти–антиоксиданти у печінці при її ішемічно-реперфузійному ураженні на фоні введення попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту. Встановлено, що профілактичне введення попередника синтезу оксиду азоту сприяє зменшенню порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов ішемії-реперфузії печінки. Блокування синтезу оксиду азоту, особливо за рахунок інгібування конститутивної NO-синтази, призводить до ще більшої активації процесів ліпопероксидації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: система прооксиданти–антиоксиданти, ішемічно-реперфузійне ураження, синтез оксиду азоту.

ВСТУП. Феномен оксидативного стресу при відновленні кровотоку після періоду ішемії (“кисневий парадокс”) полягає в тому, що, з одного боку, поява молекулярного кисню необхідна для відновлення нормальної функції органа, а з іншого – саме реоксигенація є критичним фактором у стрімкому розвитку вільнорадикальних процесів у ішемізованих клітинах [19, 23]. При перенесенні електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій утворюються активні форми кисню (АФК), серед яких найбільш реакційноздатним є супероксиданіон $O_2^{\cdot-}$ [20]. Відомо, що деякі ферментні системи за критичних умов ішемії також здатні генерувати $O_2^{\cdot-}$, наприклад ксантиноксидаза чи фермент, який каталізує утворення оксиду азоту (NO), NO-синтаза (NOS) [25]. Остання продукує супероксиданіон при роз’єднанні процесів метаболізму NO або при недостатності субстрату аргініну чи кофактора тетрагідробіоптериду [26]. У свою чергу, NO взаємодіє з $O_2^{\cdot-}$ і утворює потужний оксидант – пероксинітрит (NOO[•]), що проявляє виражену цитотоксичну дію. NOO[•] індукує пошкодження ДНК, мутації клітин та інгібує функції багатьох ферментів [3]. Отже, NO може бути чинником порушення рівноваги перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи. З огляду на це, цікавим є вивчення впливу модулаторів синтезу NO на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу при ішемії-реперфузії (ІР) печінки.

© О. М. Олещук, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170–210 г. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Щурів рандомізували на 5 груп по 6 тварин: 1-ша група – контрольна (несправжньооперовані тварини – лапаротомія); 2-га – ІР (ішемія серединної та лівої латеральної частки печінки на 45 хв, за якою слідував двогодинний період реперфузії при кімнатній температурі); 3-тя – попередник NO L-arginine (LA)+ІР; 4-та – не-селективний блокатор NOS N-nitro-L-arginine (L-NAME)+ІР; 5-та – селективний блокатор iNOS та антиоксидант мелатонін (Mel)+ІР. LA вводили в дозі 25 мг/кг, а L-NAME та Mel – 10 мг/кг і.п., повторно 3 дні, останній раз за 10 хв до ІР.

У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- [6, 14], церулоплазміну (ЦП) [7], молекул середньої маси (МСМ) [12]. Про стан системи прооксиданти–антиоксиданти судили за вмістом у гомогенатах печінки ТБК-активних продуктів (ТБК) [1], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [4], відновленого глутатіону (GSH) [18], активністю каталази (КАТ) [9], супероксиддисмутази (СОД) [13], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [5], цитохромоксидази (ЦХО) [11]. Всі отримані результати було оброблено методом варіаційної статис-

тики з використанням t-критерію Стюдента (Microsoft Excel XP) та методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) за допомогою програми "Origin 7.5" (OriginLab Corp., USA).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. IP-ураження супроводжувалось активацією процесів ліпопероксидації у печінці, на що вказувало вірогідне зростання концентрації ГПЛ (в 1,72 раза) і ТБК (в 1,7 раза), зменшувалась активність КАТ та СОД у гомогенатах печінки (на 36 і 61 % відповідно). Відомо, що виснаження пулу відновленого глутатіону є одним із факторів зниження протекторної функції антиоксидантної системи за умов IP (табл. 1) [17]. Вміст NO_2 у сироватці крові зменшувався на 51,7 %, а вміст NO_3 у крові не змінювався відносно контрольної групи.

Попереднє профілактичне введення впродовж 3 днів LA сприяло нормалізації прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) ГПЛ та ТБК у печінці вірогідно знижувався порівняно з групою IP. Рівень GSH зростав у 1,4 раза. Активність антиоксидантних ферментів КАТ та СОД підвищувався на 23 і 54 % (табл. 1). В сироватці крові вірогідно знижувався вміст ЦП на 12 % порівняно з групою IP. Вміст NO_2 зростав на 75,2 %, вміст NO_3 у крові був вищим на 28,2 % порівняно з контрольною групою тварин. Відновлення кровотоку після періоду ішемії пов'язане з накопиченням не знешкоджених печінкою токсичних продуктів катаболізму білків, ендо- та екзо-

токсинів – середньомолекулярних пептидів. Зафіксовано збільшення рівня обох фракцій MCM: пептидних (MCM_{254}) до $(0,56 \pm 0,01)$ ум. од. та нуклеотидних (MCM_{280}) до $(0,31 \pm 0,01)$ ум. од. Воно було вірогідним щодо їх рівня в особин контрольної групи – $(0,42 \pm 0,02)$ та $(0,21 \pm 0,01)$ ум. од. відповідно ($p < 0,01$).

Блокування синтезу NO шляхом введення препарату L-NAME, який інгібує як конститутивну (cNOS), так і індукцибельну (iNOS) форми NOS при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки, призвело до поглиблення патологічного процесу. Про це свідчили активізація процесів ПОЛ порівняно з групою IP, збільшення вмісту в печінці ТБК і ГПЛ (в 1,3 та 1,2 раза відповідно). Вміст GSH, активність КАТ та СОД у гомогенатах печінки вірогідно знижувалися (табл. 1), вміст ЦП у сироватці крові підвищувався (табл. 2), що вказувало на наростання віднорадикального окиснення та виснаження системи антиоксидантного захисту при пригніченні активності NOS. Рівень нітрит- та нітрат-аніона в сироватці крові при введенні блокатора синтезу NO збільшувався на 45 та 13 % порівняно з групою IP. Рівень середньомолекулярних пептидів залишався на рівні ураження.

Застосування селективного блокатора iNOS мелатоніну призводило до часткового поліпшення стану печінки, про що свідчило вірогідне зниження вмісту в печінці ТБК і ГПЛ (в 1,4 та 1,3 раза відповідно). Вміст GSH, активність КАТ і СОД у тварин даної групи вірогідно зростали, відповідно, на 18,4, 29,7 та 53,6 % (табл. 1). Спостерігалась тенденція до

Таблиця 1 – Показники стану ПОЛ та антиоксидантної системи печінки ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – IP	3-тя група – IP+LA	4-та група – IP+L-NAME	5-та група – IP+Mel
КАТ, мкат/кг	$4,47 \pm 0,12$	$2,87 \pm 0,27$ $p < 0,0025$	$3,21 \pm 0,2$ $p_1 < 0,05$	$1,75 \pm 0,07$ $p_1 < 0,05$	$3,72 \pm 0,22$ $p_1 < 0,05$
СОД, ум. од./г	$5,61 \pm 0,25$	$2,16 \pm 0,16$ $p < 0,001$	$3,59 \pm 0,08$ $p < 0,05$	$1,35 \pm 0,06$ $p_1 < 0,05$	$1,60 \pm 0,15$ $p_1 < 0,05$
ГПЛ, ум. од./г	$3,53 \pm 0,29$	$6,10 \pm 0,26$ $p < 0,001$	$4,93 \pm 0,18$ $p_1 < 0,05$	$8,07 \pm 0,42$ $p_1 < 0,001$	$4,80 \pm 0,1$ $p_1 < 0,01$
ТБК, ммоль/кг	$3,04 \pm 0,24$	$5,18 \pm 0,33$ $p < 0,002$	$3,66 \pm 0,07$ $p_1 < 0,005$	$6,73 \pm 0,43$ $p_1 < 0,05$	$3,79 \pm 0,17$ $p_1 < 0,01$
GSH, ммоль/кг	$4,07 \pm 0,09$	$2,82 \pm 0,04$ $p < 0,005$	$3,84 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$	$2,12 \pm 0,08$ $p_1 < 0,05$	$3,84 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$

Таблиця 2 – Вміст середньомолекулярних пептидів та церулоплазміну в сироватці крові ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – IP	3-тя група – IP+LA	4-та група – IP+L-NAME	5-та група – IP+Mel
MCM_1 , ум. од./л	$0,42 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,01$ $p < 0,01$	$0,48 \pm 0,01$ $p_1 < 0,01$	$0,59 \pm 0,02$ $p_1 > 0,1$	$0,51 \pm 0,01$ $p_1 < 0,05$
MCM_2 , ум. од./л	$0,21 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$ $p < 0,01$	$0,28 \pm 0,01$ $p < 0,05$	$0,34 \pm 0,02$ $p_1 > 0,05$	$0,51 \pm 0,01$ $p_1 < 0,05$
ЦП, мг/л	$230,4 \pm 5,3$	$281,5 \pm 7,2$ $p < 0,01$	$246,5 \pm 8,7$ $p_1 < 0,05$	$323,8 \pm 9,9$ $p_1 < 0,05$	$256,7 \pm 13,8$ $p_1 > 0,1$

зменшення вмісту ЦП у сироватці крові порівняно з групою ІР. Вміст молекул середньої маси достовірно знижувався порівняно з групою ІР (табл. 2).

Встановлено, що ІР-ураження супроводжувалося вірогідним зменшенням активності ферментів мітохондрій ЦХО та СДГ (табл. 3). За умов надмірного синтезу NO спостерігається незворотне пригнічення мітохондріального дихання через утворення пероксинітриду [16]. Це зумовлює зниження синтезу внутрішньоклітинного АТФ та зростання продуктування $O_2^{\cdot-}$ електронотранспортною системою, що, у свою чергу, призводить до деполяризації мітохондріальної мембрани та ініціації каскаду апоптозу [22]. Застосування LA сприяло вірогідному підвищенню активності мітохондріальних ферментів ЦХО і СДГ (на 18,7 та 6,9 % відповідно). При блокуванні синтезу NO препаратом L-NAME спостерігалась тенденція до зниження активності СДГ, а Mel вірогідно збільшував активність досліджуваних ферментів мітохондрій ЦХО і СДГ, відповідно, на 7,2 та 13,5 % (табл. 3).

Результати проведених нами досліджень дозволяють припустити, що порушення енергозабезпечення мітохондрій зумовлене зростанням за умов реперфузії концентрації АФК, причому важливу роль тут відіграють токсичні продукти метаболізму NO. Виконані нами дослідження показали, що застосування попередника NO L-аргініну призводить до підвищення активності ферментів мітохондрій, мелатонін вірогідно не змінює їх активність, а при введенні L-NAME активність досліджуваних ферментів мітохондрій залишається на рівні ураження, пінеальний гормон мелатонін сприяє відновленню функціонування дихального ланцюга мітохондрій, що, ймовірно, зумовлено вираженими антиоксидантними властивостями останнього [2] (табл. 3).

Під час ішемії-реперфузії NO проявляє, на думку ряду дослідників, деякі позитивні ефекти. Послаблення NO-залежних процесів, таких, як вазодилатація, відбувається внаслідок захоплення концентраціями супероксиду, що зростають, значної кількості наявного NO і належить до найдетальніше вивчених взаємодій між NO і супероксидом. При перевищенні наномольного рівня концентрацій NO стає потужним перехоплювачем супероксиду [8]. Це призводить до послаблення АФК-залежних механізмів передачі й активації тих, що зумовлені утворенням ONOO-. При концентрації NO, яка відповідає рівню СОД у тканині, він може конкурувати з останньою, тобто функціонувати як внутрішньоклітинна пастка супероксиду [10]. Враховуючи поліпшення функціонального стану печінки при введенні L-Arginine та Mel, можна припустити, що eNOS виконує проєктивну функцію, а iNOS відповідальна за ураження печінки при її ішемії-реперфузії. Результати проведених нами досліджень узгоджуються з даними V. G. Lee et al. [24].

Таким чином, результати виконаних досліджень дозволяють говорити про проєктивну роль NO в період ранньої реперфузії. Попереднє профілактичне введення L-аргініну сприяє пригніченню процесів ліпопероксидації та активації антиоксидантної системи у печінці. Блокатори синтезу оксиду азоту сприяють погіршенню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу і стану печінки при ІР. Слід вказати на те, що прояви ураження є більш вираженими, якщо блокується конститутивна форма ферменту. Інгібітори NOS з високою специфічністю до індукцйбельної ізоформи iNOS, на відміну від неселективних інгібіторів NOS, а особливо мелатонін, який має виражену антиоксидантну дію [21], певною мірою усувають негативний вплив ішемії-реперфузії [15].

Таблиця 3 – Показники активності мітохондріальних ферментів у печінці ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – ІР	3-тя група – ІР+LA	4-та група – ІР+L-NAME	5-та група – ІР+Mel
ЦХО, ммоль/(кг·хв)	8,80 $\pm$ 0,24	6,72 $\pm$ 0,19 $p < 0,05$	7,98 $\pm$ 0,19 $p_1 < 0,01$	6,98 $\pm$ 0,13 $p_1 > 0,05$	7,61 $\pm$ 0,11 $p_1 < 0,01$
СДГ, ммоль/(кг·хв)	8,23 $\pm$ 0,12	6,93 $\pm$ 0,12 $p < 0,05$	7,41 $\pm$ 0,05 $p_1 < 0,05$	6,48 $\pm$ 0,07 $p_1 > 0,05$	7,42 $\pm$ 0,09 $p_1 < 0,05$

ВИСНОВКИ. 1. Профілактичне введення попередника синтезу оксиду азоту сприяє зменшенню порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов ішемії-реперфузії печінки.

2. Блокування синтезу оксиду азоту, особливо за рахунок інгібування конститутивної

NO-синтази, призводить до ще більшої активації процесів ліпопероксидації.

Перспективи подальших досліджень. Встановлення ролі системи L-Arginine–NO в патогенезі ішемії-реперфузії дозволить проводити пошук ефективних засобів профілактики уражень печінки при відновленні органного кровотоку.

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. Барабой В. А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В. А. Барабой // Укр. біохім. журн. – 2000. – **72**, № 3. – С. 5–11.
3. Вплив L-аргініну та інгібіторів NO-синтази на стан антиоксидантної системи тромбоцитів за умов цукрового діабету першого типу / Н. Сибірна, О. Вовк, В. Бурда [та ін.] // Вісник Львів. ун-ту. – 2004. – **38**. – С. 50–56.
4. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкородная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
5. Ещенко Н. Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // Методы биохимических исследований. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207–212.
6. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
7. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
8. Куровська В. О. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічно-реперфузійних ушкодженнях головного мозку / В. О. Куровська, В. П. Пішак, С. С. Ткачук // Бук. мед. вісник. – 2008. – **12**, № 4. – С. 143–149.
9. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
10. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани / М. С. Волин, К. А. Девидсон, П. М. Камински [и др.] // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 958–965.
11. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – 390 с.
12. Среднемолекулярные пептиды спинномозговой жидкости при гнойных менингитах / В. В. Оськина, К. И. Чекалина, Н. И. Габриэлян [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – № 2. – С. 23–25.
13. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–684.
14. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. Davie, J. Glogowski [et al.] // *Analyt. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
15. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver / M. Isobe, T. Katsuramaki, K. Hirata [et al.] // *Transplantation.* – 1999. – **68**. – P. 803–813.
16. Cassina A. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport / A. Cassina, R. Radi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – **308**. – P. 309–16.
17. Effect of artificial cells on hepatic function after ischemia-reperfusion injury in liver // E. J. Chang, S. H. Lee, K. C. Mun [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2004. – **36**, № 7. – P. 1959–1961.
18. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.
19. Grace P. A. Ischemia-reperfusion injury / P. A. Grace // *Brit. J. Surg.* – 1994. – **81**. – P. 637–647.
20. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the “oxygen paradox”: Reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase / C. L. Myers, S. J. Weiss, M. M. Kirsh [et al.] // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* – 1985. – **17**. – P. 675–684.
21. Reiter R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free radicals / R. J. Reiter // *News Physiol. Sci.* – 2000. – **15**. – P. 246–250.
22. The effect of nitric oxide on cell respiration A key to understanding its role in cell survival or death / B. Beltran, A. Mathur, M. R. Duchon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P. 14602–14607.
23. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury / W. Jasseem, S. V. Fuggle, M. Rela [et al.] // *Transplantation.* – 2002. – **27**, № 73. – P. 493–499.
24. The roles of iNOS in liver ischemia-reperfusion injury / V. G. Lee, M. L. Johnson, J. Baust [et al.] // *Shock.* – 2001. – **16** (5). – P. 355–360.
25. Ullrich V. Superoxide as a messenger of endothelial function / V. Ullrich, M. Bachschmid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **278**. – P. 1–8.
26. Xia Y. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages / Y. Xia, J. L. Zweier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 6954–6958.

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЕЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ В ПРИСУТСТВИИ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

Резюме

Исследовано состояние системы прооксиданты–антиоксиданты в печени при ее ишемическо-реперфузионном поражении на фоне введения предшественников и блокаторов синтеза оксида азота. Установлено, что профилактическое введение предшественника синтеза оксида азота способствует уменьшению нарушений прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в условиях ишемии-реперфузии печени. Блокирование синтеза оксида азота, особенно за счет ингибирования конститутивной NO-синтазы, приводит к еще большей активации процессов липопероксидации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: система прооксиданты–антиоксиданты, ишемическо-реперфузионное поражение, синтез оксида азота.

O. M. Oleshchuk
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AT ISCHEMIC-REPERFUSION OF LIVER OF RATS AT THE PRESENCE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

Summary

Prooxidant-antioxidant balance at ischemic-reperfusion of liver of rats at the presence of nitric oxide synthesis precursors and blocks was investigated. It was found that the prophylactic injection of nitric oxide synthesis precursor reduces violations of prooxidant-antioxidant homeostasis under the conditions of ischemic-reperfusion of liver. Blocking the nitric oxide synthesis, especially due to inhibition of constitutive NO-synthase, leads to aggravation of peroxidation injury.

KEY WORDS: prooxidant-antioxidants system, ischemic-reperfusion lesion, nitric oxide synthesis.

Отримано 16.02.12

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

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ У ФОРМІ ЖЕЛЕ

У дослідженнях на статевонезрілих щурах з нормальним імунним статусом встановлено виражені імуностимулювальні властивості рослинного желе. Визначено найбільш ефективну дозу лікарського засобу, при застосуванні якої препарат активує клітинну та гуморальну ланки імунітету. За умов імунодефіциту доведено імунокоригувальну дію препарату. Результати доклінічних випробувань свідчать про перспективність подальших досліджень з метою створення засобу для корекції імунного статусу в дітей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: імунотропні властивості, ехінацея пурпурова, желе.

ВСТУП. Зростання темпів науково-технічного прогресу, погіршення екологічної ситуації, підвищення напруженості життя та посилення дії факторів, що чинять патогенний вплив на імунітет (стреси, СНІД, наслідки аварії на ЧАЕС), визначають проблему фармакологічної корекції імунологічної реактивності зростаючого організму як одну з найбільш важливих і актуальних для вітчизняної педіатрії [5, 11].

На жаль, номенклатуру сучасних імуностимулювальних препаратів складають перш за все синтетичні засоби, на фоні застосування яких імовірно надмірно втручання у функцію імунної системи і, як наслідок, виснаження останньої.

У площині окресленої проблеми особливий інтерес викликають препарати рослинного походження, які вигідно відрізняються від синтетичних аналогів біологічною спорідненістю до тканин організму, м'якою дією та низькою токсичністю [3].

В останні роки пильну увагу фітохіміків, фармакологів і технологів привертає ехінацея пурпурова як перспективне джерело для створення нових імуномодулюючих засобів, що підтверджується наявністю на фармацевтичному ринку України досить широкого асортименту препаратів на основі лікарської рослини як вітчизняного, так і закордонного виробництва. Однак більшість лікарських засобів представлена спиртовмісними ліками, застосування яких обмежене в окремих пацієнтів, що зумовлює доцільність розробки імуно-

тропних засобів, перш за все для педіатрії, на основі рослин роду *Echinacea*, зокрема ехінацеї пурпурової [16].

У ході проведених раніше досліджень розроблено оригінальну дитячу лікарську форму – желе та встановлено оптимальний склад нового препарату ехінацеї пурпурової [8, 10].

Метою даної роботи було визначити ефективність імунотропного препарату у формі желе, створеного на основі екстракту ехінацеї пурпурової та пектину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на статевонезрілих нелінійних щурах віком 1 місяць, що є оптимальним для вивчення ліків, призначених для використання в педіатрії, дотримуючись правил роботи з лабораторними тваринами відповідно до існуючих вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [2, 12].

Імунодефіцит у статевонезрілих щурів моделювали шляхом внутрішньочеревного однократного введення гідрокортизону ацетату (Hydrocortison-Richter, Будапешт–Угорщина) у дозі 250 мг/кг [14].

Тварин поділили на групи: інтактну, контрольну (тварини, які внутрішньошлунково отримували воду очищену), референтну (тварини, яким перорально з профілактичною метою вводили настойку ехінацеї в дозі 1,0 мл/кг протягом 2-х тижнів), дослідну (тварини, які за аналогічною схемою отримували желе з ехінацеєю в дозах 1,0; 1,5 і 2,0 г/кг).

© Л. В. Яковлева, О. Д. Немятих, О. Ю. Кошова, 2012.

Характер впливу потенційного лікарського засобу на функціональну активність гуморальної ланки імунітету в щурят з нормальним імунним статусом оцінювали за рівнем гемаглютининів (ГА) у сироватці крові та кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці. Щурят імунізували тимусозалежним антигеном, а саме еритроцитами барана (ЕБ, 3 % розчин у дозі 1 мл/100 г маси щурят внутрішньочеревно одноразово). На 5-ту добу після імунізації визначали титри гемаглютининів у сироватці крові експериментальних тварин методом серійних розведень у полістиролових планшетах [1, 4].

Кількість АУК у селезінці щурят визначали за допомогою методу локального гемолізу в гелі, що оснований на здатності лімфоїдних клітин експериментальних тварин, які імунізовані чужорідними еритроцитами, виділяти антиеритроцитарні антитіла, що викликають лізис еритроцитів за присутності комплементу. За числом макроскопічно видимих зон гемолізу навколо антитілоутворюючих клітин підраховували кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган [15].

Вплив желе на неспецифічну резистентність організму оцінювали в тесті фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН) крові з латексом за фагоцитарним індексом (Fi), що відображає відсоток фагоцитуючих нейтрофілів, фагоцитарним числом (Fu), яке вказує на середню кількість часточок латексу, що поглинуті одним нейтрофілом, та індексом фагоцитарної активності (IFA), який є добутком фагоцитарного індексу на фагоцитарне число [6].

При визначенні рівня реалізації імунотропних властивостей оригінального лікарського засобу на тлі імунодефіциту препарат вводили за 5 діб до відтворення модельованої патології та протягом всього періоду експерименту до дня визначення показників імунної відповіді. Загальний термін введення склав 11 діб. Імунізацію тварин проводили за вищенаведеною схемою через добу після введення гідрокортизону ацетату (ГК). Для оцінки визначення

ступеня імунодефіциту на 5-ту добу після імунізації визначали титри ГА та масові коефіцієнти (МК) органів імуногенезу (тимуса і селезінки).

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм "Statistica 6,0". Для отримання статистичних висновків застосовували непараметричний критерій Манна-Уїтні та параметричний метод Ньюмана-Кейлса. При порівнянні статистичних вибірок було взято рівень значущості $p < 0,05$ [7, 9, 13].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження впливу желе з ехінацеєю на гуморальну ланку імунітету статевонезрілих щурів з нормальним імунним статусом виявило, що введення препарату ехінацеї реалізується підвищенням титрів гемаглютининів у сироватці крові. Останнє вказує на імуностимулювальні властивості препарату. Виражену здатність підсилювати утворення антитіл желе реалізує в дозі 2,0 г/кг, достовірно збільшуючи титри у сироватці імунізованих тварин (табл. 1).

Вивчення насиченості селезінки клітинами показало, що під впливом досліджуваного лікарського засобу, введеного в розроблених режимах дозування, відбувається збільшення кількості спленоцитів на 16 %, що може свідчити про активацію продукції імунокомпетентних клітин у дослідній групі порівняно з інтактними щурятами. При цьому звертає на себе увагу негативна кореляція в референтній та дослідній серіях експериментів.

Порівняльний аналіз фагоцитарної активності нейтрофілів крові як одного з ключових показників функціонального стану імунної системи виявив, що введення лікарського засобу, розробленого на основі комбінації рослинних біологічно активних речовин, у дозах 1,5 та 2,0 г/кг протягом 2-х тижнів сприяє достовірному підвищенню фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа і реалізується збільшенням індексів IFA на 17 та 29 % порівняно з інтактною серією дослідів. При цьому референтний препарат проявляє помірну тен-

Таблиця 1 – Вплив желе з ехінацеєю на гуморальний імунітет щурят

Група тварин	Доза	Титри ГА, Log_2 (Me (LQ; UpQ))	АУК на селезінку
Інтактна	–	13 (13; 13)	18022±1404
Референтна	1,0 мл/кг	13 (13; 13)	15678±957*
Дослідна	1,0 г/кг	13 (13;14)	18196±1356**
	1,5 г/кг	13 (13;17)	20924±1355**
	2,0 г/кг	19,8 (19; 20)*/**	20930±1342**

Примітка. Тут і в таблиці 2: * – різниця вірогідна порівняно з групою інтактних тварин; ** – різниця вірогідна порівняно з референтною групою тварин.

денцію до підвищення F_i та F_u , що віддзеркалюється достовірним зростанням значень інтегрального показника на 26 % (табл. 2).

Отже, результати даної серії дослідів дають підстави стверджувати, що досліджуваний лікарський засіб оригінального складу на високому рівні реалізує здатність стимулювати гуморальну та клітинну ланки імунітету в здорових тварин.

Дані щодо імуноотропної дії препарату рослинного походження в щурят з імунодефіцитом наведено в таблицях 3 та 4. Отримані результати свідчать про те, що введення гідрокортизону ацетату тваринам контрольної групи

проявляється розвитком патологічного стану, що віддзеркалюється достовірним зниженням титрів ГА та супроводжується чіткою тенденцією до зменшення МК селезінки і тимуса. Останнє є вельми закономірним результатом цитотоксичної дії великих доз гідрокортизону [3].

Профілактичне ж введення лікарського засобу, розробленого на основі комбінації рослинних біологічно активних речовин, сприяє відновленню імунореактивності у тварин. Ефективність оригінального препарату в розрізі антитілогенезу проявляється збереженням титрів ГА відносно рівня щурят інтактною групи. При цьому збільшення дози желе з

Таблиця 2 – Вплив желе з ехінацеєю на фагоцитарну активність нейтрофілів крові щурят з нормальним імунним статусом

Група тварин	Доза	Показник			
		F_i	F_u	IFA	
		Median (Q25–Q75)		Mean±St.er.	A, %
Інтактна	–	69,5 (63–73)	2,86 (2,61–3,38)	209,33±9,22	–
Референтна	1,0 мл/кг	86,5 (70–91)*	3,13 (2,88–3,43)	264,17±9,22*	26,2
Дослідна	1,5 г/кг	85,5 (84–87)*	2,93 (2,88–2,95)*	245,50±7,31*	17,3
	2,0 г/кг	87,0 (75,0–88,0)	3,10 (2,78–3,73)*/**	270,00±24,32*/**	29,0

Таблиця 3 – Вплив желе з ехінацеєю на титри ГА в сироватці крові щурят з імунодефіцитом

Група тварин	Доза	Титри ГА, Log_2 (Me (Q25–Q75))
1-ша серія		
Інтактна	–	8 (6; 9)
Контрольна	–	4 (3; 5)*
Референтна	1,0 мл/кг	6 (5; 7)*/**
Дослідна	1,5 г/кг	6 (5,5; 7,5)**
2-га серія		
Інтактна	–	13,5 (12; 13)
Контрольна	–	9 (9; 10)*
Референтна	1,0 мл/кг	13 (10; 13)**
Дослідна	2,0 г/кг	14 (10; 14)**

Примітка. Тут і в таблиці 4: * – різниця вірогідна порівняно з групою інтактних тварин; ** – різниця вірогідна порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 4 – Динаміка масових коефіцієнтів органів імуногенезу щурят з імунодефіцитом

Група тварин	Доза	Масові коефіцієнти	
		селезінки	тимуса
1-ша серія			
Інтактна	–	0,70±0,09	0,26±0,01
Контрольна	–	0,35±0,05*	0,05±0,01*
Референтна	1,0 мл/кг	0,41±0,06*	0,07±0,01*
Дослідна	1,5 г/кг	0,49±0,10*	0,10±0,01*/**
2-га серія			
Інтактна	–	0,93±0,07	0,36±0,01
Контрольна	–	0,52±0,05	0,10±0,02*
Референтна	1,0 мл/кг	0,67±0,12	0,18±0,04*/**
Дослідна	2,0 г/кг	0,67±0,12	0,22±0,02*/**

ехінацією до 2 г/кг позитивно впливає на значення оцінюваного показника за досліджуваних умов експерименту.

Слід зазначити, що під впливом препарату відзначається також попередження змін у МК селезінки і тимуса. Так, на фоні застосування желе у дозі 1,5 г/кг значення коефіцієнтів, порівняно з контролем, відновлюються на 40 та 50 %, а при збільшенні дози – в 1,3 та 2,2 раза, відповідно.

Таким чином, аналіз отриманих даних дозволяє констатувати, що застосування желе з комплексом біологічно активних речовин ехінацеї пурпурової та пектину реалізується підсиленням імунної відповіді як у здорових тварин, так і в щурят за умов імунодефіциту.

ВИСНОВКИ. 1. Результати проведених досліджень свідчать про виражену імуностимулювальну дію желе з ехінацією за умов профілактичного застосування у статевонезрілих щурів з нормальним імунним статусом. Найбільшу активність потенційний лікарський засіб реалізує в дозі 2 г/кг.

2. На експериментальній моделі імунодефіциту в щурят рослинне желе проявляє імунокоригувальні властивості шляхом попередження змін у масових коефіцієнтах тимуса і селезінки, а також через відновлення антитілогенезу.

3. Все вищезазначене підкреслює перспективність подальших досліджень з метою створення імуотропного лікарського засобу природного походження для педіатрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів / [Г. М. Бутенко, О. П. Терешіна, Ю. М. Максимов та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 102–114.
2. Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів, призначених для застосування в педіатрії : методичні рекомендації / [М. Ф. Денисова, Н. С. Нікітіна, І. П. Дзюба та ін.]. – К., 2002. – 27 с.
3. Дранник Г. М. Імуотропні препарати / Г. М. Дранник, Ю. Я. Гриневич, Г. М. Дизик. – К. : Здоров'я, 1994. – 288 с.
4. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
5. Клиническая иммунология : учебник для студентов медицинских вузов / под ред. А. В. Караулова. – М. : Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
6. Лабораторные методы оценки иммунного статуса // Справочник медицинской и лабораторной технологии и диагностики / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – Т. 2.
7. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 320 с.
8. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загория, В. П. Георгиевского, Е. П. Безуглой. – К. : Морион, 1999. – С. 508–545.
9. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. : Ремедиум, 2000. – С. 349–354.
10. Пат. України на корисну модель № 53209, МПК А61К 36/00. Лікувально-профілактичний засіб на основі ехінацеї у формі желе / Дмитрієвський Д. І., Немятих О. Д. – Заявл. 16.04.10 ; опубл. 27.09.10, Бюл № 18.
11. Петров Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – М. : Медицина, 1983. – 368 с.
12. Фармакологическое изучение возрастных особенностей в действии лекарственных средств, предлагаемых для клинического изучения в педиатрической практике : методические рекомендации / [И. В. Маркова, В. А. Гусель, Н. И. Западнюк и др.]. – М., 1988. – 77 с.
13. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных : учебник / А. А. Халафян. – 3-е изд. – М. : ООО "Бином-Пресс", 2007. – 512 с.
14. Швец В. Н. Органы кроветворения мышей после однократного введения гидрокортизона / В. Н. Швец, В. В. Португалов // Бюл. эксперим. биологии. – 1979. – № 1. – С. 12–16.
15. Ierne K. N. Plaque formation by single antibody – producing cells / K. N. Ierne, A. A. Nordin // Science. – 1963. – **140**. – P. 405–406.
16. Tierra M. Echinacea: an effective alternative to antibiotics / M. Tierra // J. Herb. Pharmacother. – 2007. – **7**, № 2. – P. 79–89.

Л. В. Яковлева, О. Д. Немытых, Е. Ю. Кошова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ В ФОРМЕ ЖЕЛЕ

Резюме

В исследованиях на неполовозрелых крысах с нормальным иммунным статусом установлены выраженные иммуностимулирующие свойства растительного желе. Определена наиболее эффективная доза лекарственного средства, при применении которой препарат активизирует клеточное и гуморальное звенья иммунитета. В условиях иммунодефицита доказано иммунокорригирующее действие препарата. Результаты доклинических испытаний свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований с целью создания средства для коррекции иммунного статуса у детей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **иммуотропные свойства, эхинацея пурпурная, желе.**

L. V. Yakovlieva, O. D. Nemyatykh, O. Yu. Koshova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
LUHANSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

RESEARCH OF IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF ECHINACEA PURPUREA DRUG IN JELLY FORM

Summary

By researches on immature rats with normal immune status there were determined expressed immune stimulating properties of herbal jelly. The most effective dose of drug was detected, at application of which this drug activates the cellular and humorous links of immunity. In the conditions of immunodeficit the immunocorrection action of drug was well-proven. Results of preclinical trial indicate the pharmacological efficiency of jelly and perspectives of further researches aimed at creation of drug for the correction of immune status in children.

KEY WORDS: **immunotropic properties, echinacea purpurea, jelly.**

Отримано 19.09.11

Адреса для листування: О. Д. Немытых, Луганський державний медичний університет, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1г, Луганськ, 91045, Україна.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А ЗЛОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено фізико-хімічні властивості карбоксипептидази А (КА) злоякісного новоутворення молочної залози. Молекулярна маса КА становила 42 601 Да. Температурний оптимум КА встановлено при 37 °С, оптимум рН – у ділянці рН від 5,0 до 5,5. Негативний вплив іонів двовалентних металів на активність КА знижується в ряді $Cu > Cd > Ca > Mg > Co > Pb > Mn > Ba > Zn = Hg > Ni > Fe$. За дією більшості досліджуваних металів і температурною залежністю карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози подібна, а за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Zn^{++} і Ca^{++} , відрізняється від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карбоксипептидаза А, молочна залоза, фізико-хімічні властивості.

ВСТУП. Культури пухлинних і трансформованих клітин молочної залози, за літературними даними, містять підвищену кількість різних протеолітичних ферментів, роль яких у процесах канцерогенезу на сьогодні мало досліджено, адже протеази не тільки беруть участь у різних етапах багатоступінчастого процесу канцерогенезу, але й втягнуті в складний ланцюг взаємозв'язків ракової клітини із сусідніми нормальними тканинами і різними регуляторними та захисними системами організму [1, 2, 8, 9].

Одні дослідники вважають, що карбоксипептидаза А індукує диференціацію проліферативних клітин [24], диференціацію мукозних клітин у серозні [12], інші – вказують на зв'язок між карбоксипептидазою А і процесами малігнізації [31] та інвазії [14, 28].

Метою роботи було дослідити фізико-хімічні властивості карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Матеріалом для дослідження були резектовані зразки злоякісного новоутворення молочної залози жінок, які не отримували медикаментозного дооперативного лікування. Патоморфологічний діагноз – помірно диференційована форма інфільтруючого протокового раку молочної залози – було верифіковано за Міжнародною класифікацією ВООЗ із визначенням морфологічного стану пухлинної тканини [5]. Згідно

з договором про сумісні дослідження, обласний онкологічний диспансер м. Одеси надав матеріал для дослідження та провів гістологічну верифікацію.

З гомогенату зразків, за допомогою поетапного фракціонування $(NH_4)_2SO_4$ [7], діалізу за присутності 2 мМ Zn^{++} [7] та гель-хроматографії і сефадексу – G 75 ("Pharmacia", Швеція) [7], було отримано пептидазу, яка гідролізувала специфічний для карбоксипептидази А синтетичний субстрат – карбобензоксиглутамілфеніланін [29]. Активність карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ синтетичного субстрату карбобензоксиглутамілфеніланіну за методом Bradshaw [29].

Молекулярну масу карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали з використанням маркерних білків з відомою молекулярною масою: білок сироватки крові людини – 66 500 Да, овальбумін – 43 000 Да, хімотрипсиноген А – 25 000 Да, лізоцим – 17 500 Да та РНК-аза – 13 700 Да за методом Ендрюса [7].

Температурний оптимум карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину карбобензоксиглутамілфеніланіну за 30-хвилинної інкубації ферменту при температурі від 20 до 60 °С. За 100 % (контроль) було взято найвищі показники каталітичної активності ферменту, що були встановлені при температурі 37 °С.

Оптимум рН карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину карбобензоксиглутамілфенілаланіну при 37 °С з використанням стандартних буферних розчинів з рН 3,0, 4,0, 5,2, 7,4 та 9,0. За 100 % (контроль) було взято максимальну активність ферменту, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

Вплив металів на активність карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози визначали при інкубації ферменту за присутності 0,05 мМ розчинів іонів двовалентних металів: ртуті (Hg^{++}), заліза (Fe^{++}), нікелю (Ni^{++}), барію (Ba^{++}), магнію (Mg^{++}), кадмію (Cd^{++}), міді (Cu^{++}), кобальту (Co^{++}), кальцію (Ca^{++}), свинцю (Pb^{++}), марганцю (Mn^{++}), цинку (Zn^{++}) при температурі 37 °С. За 100 % (контроль) було взято активність карбоксипептидази А, отриману при інкубації ферменту без додавання іонів двовалентних металів.

Результати дослідження оброблено статистично з визначенням коефіцієнта Стюдента [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Молекулярна маса карбоксипептидази А, яку було отримано з тканини злякислого новоутворення молочної залози, становила 42 601 Да (рис. 1).

Відповідно до літературних даних, карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози відрізнялася за молекулярною масою від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів. Виділений фермент мав більшу молекулярну масу, ніж карбоксипептидаза А підшлункової залози людини і ссавців [26]; підшлункової залози великої рогатої худоби [6]; епідермальних клітин дводенних щурів [23]; морського кільчастого черв'яка [11]; легень людини [19]; кісткового мозку мишей

[10]; мозку людини [22]; немалігнізованої тканини яєчників і доброякісного та злякислого новоутворень яєчників людини [4]. Карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози мала меншу молекулярну масу, ніж карбоксипептидаза А концентрованої сечі людини [27] і мононуклеарних клітин периферичної крові людини [15].

Залежність активності карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози від температури описували типовою куполоподібною кривою, а найвищі показники каталітичної активності було встановлено при температурі 37 °С, що збігається з температурним оптимумом карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [27], карбоксипептидаза А-подібного ферменту нирок щурів [21], водоемульсійної моделі карбоксипептидази А [30] (рис. 2).

Встановлено, що при зменшенні температури нижче встановленого температурного оптимуму (37 °С) активність карбоксипептидази А була нижчою, порівняно з контролем, на 15,0 % при 30 °С та на 36,0 % при 20 °С. Збільшення температури вище встановленого температурного оптимуму (37 °С) призводило до зниження активності карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози: на 23,0 % при 40 °С, на 36,0 % при 50 °С та на 45,0 % при 60 °С порівняно з контролем (рис. 2). Втрата активності карбоксипептидази А при зміні температурних умов середовища може бути викликана денатурацією білкової частини ферменту, втратою металу [3, 20, 30].

Оптимум рН карбоксипептидази А тканини злякислого новоутворення молочної залози було виявлено в ділянці рН від 5,0 до 5,5, а крива, яка описує залежність активності ферменту від рН середовища, мала куполоподібну форму (рис. 3).

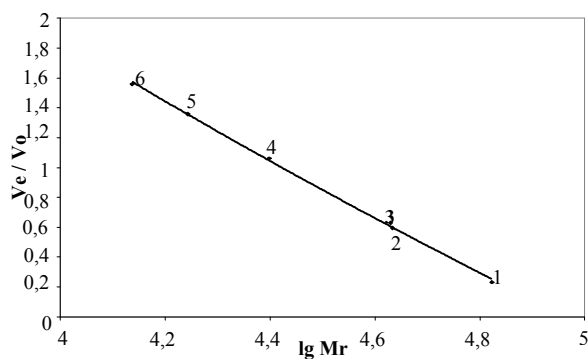


Рис. 1. Молекулярна маса карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: 1 – альбумін сироватки крові людини (66 500 Да); 2 – овальбумін (43 000 Да); 3 – карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози (42 601 Да); 4 – хімотрипсिन (25 000 Да); 5 – лізоцим (17 500 Да); 6 – РНК-аза (13 700 Да).

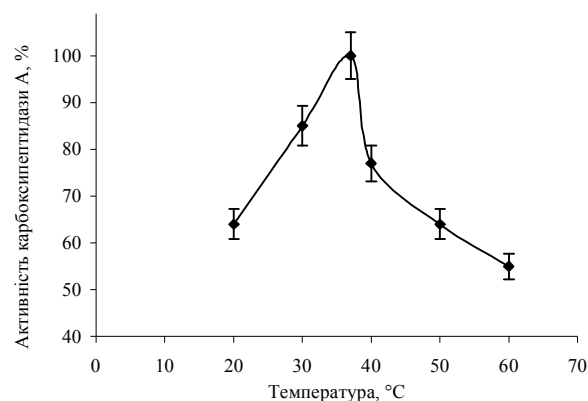


Рис. 2. Вплив температури на активність карбоксипептидази А тканини злякислого новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А, отриману при 37 °С.

Отримані результати вивчення оптимуму рН карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози відрізняються від літературних даних щодо рН-залежності карбоксипептидази А підшлункової залози бика [6] карбоксипептидази А-подібного ферменту епідермальних клітин дводенних шурів [23], карбоксипептидази А-подібного ферменту нирок шурів [22], карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [28], оптимум рН яких перебуває в ділянці рН від 6,0 до 8,5.

Підвищення (рН 4,0 і 3,0) або зниження (рН 7,4 і 9,0) концентрації іонів водню (H^+) в середовищі призводило до зменшення активності карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози, порівняно з контролем, на 52,0 і 64,0 % в умовах кислого середовища та на 42,0 і 60,0 % в умовах лужного середовища (рис. 3).

Отримані результати свідчать про те, що в умовах кислого середовища інактивація карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози відбувається швидше, ніж у лужному середовищі, що збігається з результатами Skidgel, Davis і Erdos [27], які встановили втрату активності від 60,0 % і більше для карбоксипептидази А концентрованої сечі людини при закисленні рН середовища.

За результатами дослідження впливу іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози було встановлено, що інкубація ферменту з розчинами всіх досліджуваних металів призводила до зниження активності карбоксипептидази А порівняно з контролем, а їх негативний вплив змінювався в ряді: $Cu > Cd > Ca > Mg > Co > Pb > Mn > Ba > Zn = Hg > Ni > Fe$ (рис. 4).

Найменший негативний вплив для карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози спостерігався при інкубації

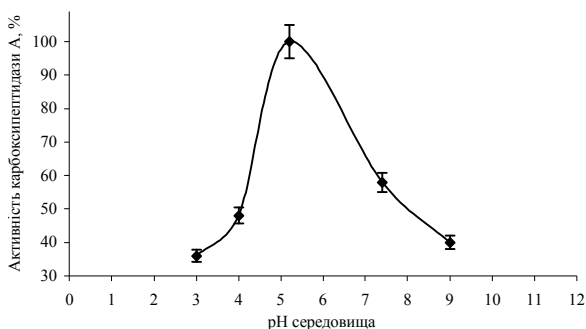


Рис. 3. Вплив рН середовища на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

ферменту з іонами Fe^{++} . Зниження активності ферменту, порівняно з контролем, було незначним – 9,0 %. Присутність в інкубаційному середовищі іонів Ni^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} і Pb^{++} призводила до втрати від 25,0 до 35,0 % активності досліджуваного ферменту порівняно з контролем (рис. 4).

При інкубації карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози з Co^{++} або Mg^{++} було встановлено значне, порівняно з контролем, зниження активності ферменту – на 49,0 і 50,0 %. Та найбільший негативний вплив іонів металів спостерігався при дії Ca^{++} , Cd^{++} та Cu^{++} – втрата активності карбоксипептидази А становила майже 80,0 – 90,0 %, що частково збігається з результатами досліджень інших авторів [11, 16, 25] (рис. 4).

Отримані результати дослідження впливу іонів двовалентних металів збігаються з даними літератури, які свідчать про негативну дію більшості з них, що можна пояснити абсорбцією металу на поверхні молекули ферменту, що приводить до зміни просторової конформації [11, 13, 17, 20]. Однак результати впливу таких металів, як Ca^{++} і Zn^{++} , що є активаторами карбоксипептидази А, виділеної з інших біологічних об'єктів, відрізняються від літературних даних щодо їх позитивного впливу, який сприяє стабілізації структури карбоксипептидази А [4, 11, 17, 18, 20].

Одержані результати свідчать про те, що за дією більшості досліджуваних металів і температурною залежністю карбоксипептидази А тканини подібна до карбоксипептидази А інших біологічних об'єктів, однак відрізняється за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Ca^{++} і Zn^{++} , які знижували пептидазну активність ферменту.

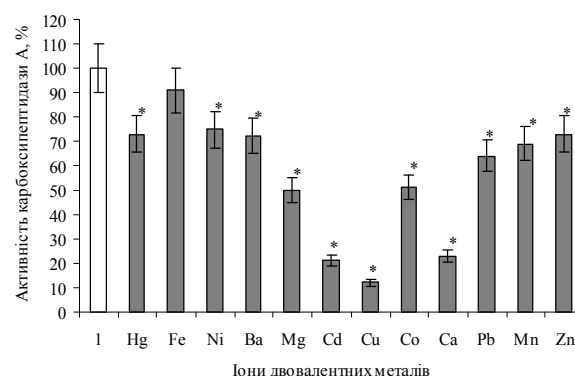


Рис. 4. Вплив іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: 1 – контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А без додавання іонів двовалентних металів; * – вірогідне зниження активності карбоксипептидази А відносно контролю ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ. 1. Молекулярна маса карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози становить 42 601 Да.

2. Температурний оптимум карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози встановлено при 37 °С.

3. Оптимум pH карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози встановлено в ділянці pH від 5,0 до 5,5.

4. Активність карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози знижується за присутності $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Mn} > \text{Ba} > \text{Zn} = \text{Hg} > \text{Ni} > \text{Fe}$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веремеєнко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике / К. Н. Веремеєнко // Врач. дело. – 1994. – № 1. – С. 8–13.
2. Веремеєнко К. Н. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей / К. Н. Веремеєнко, Д. И. Зоболотный, А. И. Кизим // Журн. АМН Украины. – 1987. – **8**, № 2. – С. 217–237.
3. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – К.: Вища школа, 1978. – 260 с.
4. Вовчук И. Л. Физико-химические свойства карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевой тканей яичника женщин / И. Л. Вовчук, С. А. Петров // Материали IX Українського біохімічного з'їзду (24–27 жовтня 2006 р.). – Харків: Харківський нац. ун-т ім. В. Н. Каразіна, 2006. – С. 35.
5. Всемирная Организация Здравохранения // Материали ежегодных отчетов. – СПб., 1981. – 286 с.
6. Неорганическая биохимия / под ред. Г. Эйхгорна. – М.: Мир, 1978. – Т. 1. – С. 504–560.
7. Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Высш. Школа, 1967. – 326 с.
9. Тарутинов В. И. Рак молочной железы / В. И. Тарутинов // Лікування та діагностика. – 1998. – № 2. – С. 22.
10. Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing / F. Henningsson, J. Ledin, C. Lunderius [et al.] // Biol. Chem. – 2002. – **383**, № 5. – P. 793–801.
11. A novel metallocarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases / M. Alonso-del-Rivero, S. A. Trejo, M. Rodriguez de la Vega [et al.] // FEBS J. – 2009. – **276**, № 17. – P. 4875–4890.
12. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization and use as a differentiation marker / W. E. Serafin, E. T. Dayton, P. M. Gravalles [et al.] // J. Immunol. – 1987. – **139**, № 11. – P. 3771–3776.
13. Carboxypeptidase A: native, zinc-removed and mercury-replaced forms / H. M. Greenblatt, H. Feinberg, P. A. Tucker, G. Shoham // Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. – 1998. – **54**, № 3. – P. 289–305.
14. Carboxypeptidase 4 gene variants and early-onset intermediate-to-high risk prostate cancer / P. L. Ross, I. Cheng, X. Liu [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – **9**. – P. 69.
15. Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131 / G. Birkus, R. Wang, X. Liu [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – **51**, № 2. – P. 543–550.
16. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na^+/K^+ ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium / G. E. Eriyaremu, S. O. Asagba, E. C. Onyeneke, M. A. Adaikpoh // Biometals. – 2005. – **18**, № 1. – P. 1–6.
17. Funakoshi T. Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas / T. Funakoshi, K. Kuromatsu, S. Kojima // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. – 1996. – **92**, № 2. – P. 245–252.
18. Hedemann M. S. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs / M. S. Hedemann, B. B. Jensen, H. D. Poulsen // J. Anim. Sci. – 2006. – **84**, № 12. – P. 3310–3320.
19. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, B. U. Wintroub // J. Clin. Invest. – 1989. – **83**, № 5. – P. 1630–1636.
20. Li X. Zinc-mediated thermal stabilization of carboxypeptidase A / X. Li, B. Solomon // Biomol. Eng. – 2001. – **18**, № 4. – P. 179–183.
21. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney / R. Igic, S. Garber, M. Sekosan [et al.] // Peptides. – 2003. – **24**, № 8. – P. 1237–1240.
22. Lyons P. J. Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase / P. J. Lyons, M. B. Callaway, L. D. Fricker // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**, № 11. – P. 7054–7063.
23. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell / M. Kikuchi, K. Fukuyama, K. Hirayama, W. Epstein // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – **991**, № 1. – P. 19–24.
24. Scher W. Proteases act synergistically with low molecular weight inducers to stimulate mouse erythroleukemia cell differentiation / W. Scher, B. W. Scher, S. Waxman // Exp. Hematol. – 1983. – **6**, № 11. – P. 490–498.
25. Shimada H. Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse / H. Shimada, T. Funakoshi, M. P. Waalkes // Toxicol Sci. – 2000. – **53**, № 2. – P. 474–480.
26. Single – step isolation and resolution of pancreatic carboxypeptidase A and B / T. J. Bazzone, M. Sokolovsky, L. B. Cueni, B. L. Vallee // Biochem. – 1979. – **18**, № 20. – P. 4362–4366.
27. Skidgel R. A. Purification of a human urinary carboxypeptidase distinct from carboxypeptidases A, B

or N / R. A. Skidgel, R. M. Davis, E. G. Erdos // Anal. Biochem. – 1984. – **140**, № 2. – P. 520–531.

28. Tanco S. Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing / S. Tanco, X. Zhang, C. Morano [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – **285**, № 24. – P. 18385–18396.

29. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R. S. Bradshaw, L. H. Ericsson, K. A. Walsh,

H. Neurath // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1969. – **63**. – P. 1389–1394.

30. Thompson J. S. Structure and function of carboxypeptidase A alpha in supercooled water / J. S. Thompson, H. Gehring, B. L. Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. – 1980. – **77**, № 1. – P. 132–136.

31. Vovchuk I. L. Estrogens, trypsin-like proteinases and carboxypeptidases A and B at womb body tumors / I. L. Vovchuk, S. S. Chernadchuk, S. A. Petrov // Biomed Khim. – 2007. – **53**, № 2. – P. 205–211.

Е. А. Филиппова, И. Л. Вовчук
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Исследовано физико-химические свойства карбоксипептидазы А (КА) злокачественного новообразования молочной железы. Молекулярная масса КА составляла 42 601 Да. Температурный оптимум КА установлен при 37 °С, оптимум pH – в области pH от 5,0 до 5,5. Негативное влияние ионов двувалентных металлов на активность КА снижается в ряде Cu>Cd>Ca>Mg>Co>Pb>Mn>Ba>Zn=Hg>Ni>Fe. По действию большинства исследуемых металлов и температурной зависимости карбоксипептидаза А злокачественного новообразования молочной железы сходна, а по молекулярной массе, оптимуму pH и действию таких ионов, как Zn²⁺ и Ca²⁺, отличается от карбоксипептидазы А с других биологических объектов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбоксипептидаза А, молочная железа, физико-химические свойства.

К. А. Filiptsova, I. L. Vovchuk
I. I. MECHNYKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CARBOXYPEPTIDASE A OF THE MALIGNANT TUMOR TISSUE OF THE MAMMALIAN GLAND

Summary

Physicochemical properties of carboxypeptidase A (CA) of the malignant tumor tissue of mammalian gland were studied. Molecular mass of this CA is 42 601 Da. Optimum of temperature of this CA is presented at 37 °C, optimum pH – in region of the pH 5,0–5,5. The negative influence of bivalent metal ions on the activity of this CA is reduced in series: Cu>Cd>Ca>Mg>Co>Pb>Mn>Ba>Zn=Hg>Ni>Fe. By the influence majority of bivalent metal ions and optimum of temperature this carboxypeptidase A of the malignant tumor tissue of mammalian gland is not differentiation, and by the molecular mass, optimum pH and influence of this metal ions, as the Zn²⁺ and Ca²⁺, – is differentiation of the carboxypeptidase A from the other of biological objects.

KEY WORDS: carboxypeptidase A, mammalian gland, physicochemical properties.

Отримано 05.01.12

Адреса для листування: К. А. Філіппова, Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, пров. Шампанський, 2, Одеса, 65058, Україна, e-mail: kafil-bio@mail.ru

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПАРОДОНТИТУ НА ФОНІ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ

Метою роботи було дослідити, як супутнє ураження печінки впливає на перебіг ліпополісахаридного запалення тканин пародонта. Дослідження проведено на білих щурах, яким у тканини пародонта вводили бактеріальний ліпополісахарид. Гепатит викликали шляхом введення тваринам алілового спирту протягом місяця. Ліпополісахаридне запалення пародонта супроводжувалося активацією окиснювальних процесів (у тканинах пародонта і крові зростав вміст ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих білків, знижувалася активність супероксиддисмутази, зменшувався рівень церулоплазміну і відновленого глутатіону, мала виражену тенденцію до зниження загальна антиоксидантна активність крові) й нітрооксидативним стресом (у крові й тканинах пародонта збільшувався вміст NO_x). У тварин з пародонтитом, що розвивався на фоні гепатиту, явища оксидативного та нітрооксидативного стресу були значно вираженішими, ніж у щурів, яким аліловий спирт не вводили. Також при поєднаній патології достовірно сильніше пригнічувалися показники антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пародонтит, хронічний гепатит, оксидативний та нітрооксидативний стрес.

ВСТУП. Захворювання пародонта широко розповсюджені й можуть уражати до 90 % населення. Етіологічним фактором пародонтиту є патогенні мікроорганізми. Відомо, що захворювання пародонта можуть бути пов'язані із серцево-судинними і легеневиими хворобами, діабетом, патологією шлунково-кишкового тракту, але причинно-наслідкові зв'язки не встановлені [9, 16–18, 20]. Важливе місце в патології людини за своїм соціальним і медичним значенням займає хронічний гепатит, що характеризується тенденцією до зростання захворюваності, тяжкістю лікування і серйозним прогнозом. Існують дані, які підтверджують, що захворювання печінки є фактором ризику запальних захворювань ротової порожнини [12, 15, 19, 21]. Механізми, що лежать в основі впливу хвороб печінки на патогенез пародонтиту, особливості перебігу поєднаної патології, можливості корекції порушень метаболізму при пародонтиті, поєднаному з гепатитом, на сьогодні все ще потребують детальнішого вивчення. Усе вищенаведене визначає актуальність дослідження патогенетичних аспектів розвитку запальних захворювань пародонта, асоційованих із хронічним гепатитом.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті біохімічні механізми розвитку ліпополісахаридного запалення тканин пародонта на фоні хронічного токсичного гепатиту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 40 безпородних щурах-самцях масою 150–

180 г, яких утримували на стандартній дієті. Усіх тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури, в яких викликали гепатит шляхом внутрішньочеревного введення алілового спирту в дозі 10 мг/кг протягом 2-х тижнів; 3-тя – тварини, в яких викликали запалення пародонта (протягом 2-х тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду *E. Coli* (ЛПС)); 4-та – щури, яким після закінчення курсу введення алілового спирту вводили ліпополісахарид протягом 2-х тижнів у вищезазначених дозах. Для підтвердження гепатиту на 15-й день експерименту в сироватці крові щурів 2-ї групи визначали активність АЛАТ і АсАТ за загальноприйнятою методикою, використовуючи комерційний комплект реактивів. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. У гомогенаті тканин пародонта та крові визначали рівень нітратів і нітритів (NO_x) [10], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисномодифікованих білків (ОМБ) [5], активність супероксиддисмутази (СОД) [8], каталази (КТ) [4] та вміст відновленого глутатіону (ГSH) [13]. У плазмі крові також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидантну активність (ЗАА) [11].

Результати виражали як середнє±SEM з 10 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядалися як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Перебіг будь-яких запальних захворювань, у тому чис-

лі тканин пародонта, тісно пов'язаний із порушеннями захисних систем організму, зокрема системи антиоксидного захисту, а також з розвитком оксидативного та нітрооксидативного стресу. Тому оцінка стану антиоксидної системи, процесів вільнорадикального окиснення і системи оксиду азоту набуває важливого значення як у вивченні механізмів формування, так і в розробці методів лікування пародонтиту.

Про інтенсивність процесів ліпопероксидації ми судили за вмістом у сироватці крові й пародонті ТБК-АП. Надмірне утворення вільних радикалів призводить також до окисної модифікації білків. Інтенсивність даного процесу оцінювали за вмістом у тканинах альдегідо- і кетоніохідних, що утворюються при дії активних радикалів на амінокислотні залишки в молекулах білків. З даних, наведених у таблиці, видно, що введення в тканини ясен ЛПС призводило до достовірного (в 1,4 раза) збільшення вмісту ТБК-АП як у плазмі крові, так і в пародонті. Моделювання гепатиту також призводило до різкого зростання рівня ТБК-активних продуктів в плазмі крові. Введення тваринам ЛПС викликало окисну модифікацію як нейтральних, так і лужних амінокислот. Вміст у тканинах пародонта 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніохідних нейтрального характеру), підвищився в 1,6 раза порівняно зі здоровими тваринами, а таких, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетоніохідні основного характеру), зріс у 2,0

рази. У плазмі крові обидва показники також достовірно збільшувались. У щурів з гепатитом інтенсивність окисної модифікації білків була особливо виражена в плазмі крові (вміст $ОМБ_{310}$ і $ОМБ_{430}$ зростав, відповідно, у 2,2 і 2,5 раза), а в тканинах пародонта ці зміни виявилися недостовірними. Найбільшою мірою явища оксидативного стресу проявилися в щурів, у яких моделювали ліпополісахаридне запалення пародонта на фоні гепатиту. В цієї групи тварин, порівняно з інтактними щурами, активність процесів ліпопероксидації зростала у 2,3 раза в крові та в 1,7 раза у тканинах пародонта. Концентрація модифікованих вільними радикалами білків під впливом ЛПС і алілового спирту підвищувалася в 2,7 раза в крові й більше ніж у 3 рази в яснах щурів.

Отже, можемо стверджувати, що оксидативний стрес є одним з тих фундаментальних механізмів, що відіграють важливу роль у патогенезі запалення ясен, викликаного токсинами грамнегативної мікрофлори. Особливо активізуються вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта за умов, коли токсична дія ліпополісахариду проявляється на тлі гепатиту, викликаного некрозогенною отрутою – аліловим спиртом.

Відомо, що в патогенезі багатьох запальних захворювань важливу роль відіграє оксид азоту. В роботі [7] було показано, що при пародонтиті в тканинах ясен активність індукбельної NO-синтази різко зростає. Як свідчать результати, наведені в таблиці, введення в

Таблиця – Показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в плазмі крові й тканині пародонта щурів з ліпосахаридним запаленням пародонта на фоні гепатиту

Показник	Група тварин			
	контроль	аліловий спирт	ЛПС	ЛПС+аліловий спирт
Плазма крові				
NO_x , ммоль/л	2,75±0,15	4,80±0,25*	3,85±0,18*	6,30±0,46**
ТБК-АП, мкмоль/л	42,60±3,04	84,70±6,32*	58,60±3,40*	98,30±5,45**
$ОМБ_{310}$, мкмоль/мг білка	0,94±0,07	2,05±0,20*	1,28±0,08*	2,60±0,22**
$ОМБ_{430}$, мкмоль/мг білка	0,50±0,02	1,25±0,08*	0,85±0,06*	1,68±0,14**
КТ, мкат/л	0,44±0,03	0,68±0,03*	0,55±0,04	0,65±0,06*
ЦП, г/л	0,26±0,01	0,36±0,03*	0,22±0,02	0,38±0,03**
GSH, ммоль/л	3,20±0,18	1,15±0,13*	2,70±0,20	0,70±0,07**
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	58,30±4,10	37,30±2,15*	47,34±3,12	25,30±2,50**
Тканини пародонта				
NO_x , ммоль/кг	0,96±0,05	1,18±0,10	1,64±0,12*	2,54±0,20**
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,75±0,20	2,94±0,20	3,95±0,22*	4,85±0,22**
$ОМБ_{310}$, мкмоль/мг білка	3,62±0,25	3,90±0,25	5,95±0,40*	9,86±0,65**
$ОМБ_{430}$, мкмоль/мг білка	2,65±0,22	2,88±0,20	5,36±0,40*	7,44±0,52**
СОД, од.	0,26±0,02	0,19±0,02	0,15±0,01*	0,09±0,01**
КТ, мкат/мг білка	1,25±0,10	1,22±0,10	1,05±0,09	0,72±0,03**
GSH, ммоль/кг	184,4±10,40	168,2±9,60	118,5±7,20*	85,60±5,30**

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з показниками інтактних тварин; # – зміни достовірні порівняно з показниками тварин із пародонтитом.

тканини ясен ЛПС підвищувало вміст нітритів і нітратів у крові й тканинах пародонта, відповідно, в 1,4 і 1,7 раза. Аліловий спирт також викликав зростання вмісту NO_x у сироватці крові (в 1,7 раза), проте достовірно не змінював даного показника в тканинах пародонта. Моделювання ліпополісахаридного запалення ясен на фоні гепатиту спричиняло різке підвищення продукції оксиду азоту (вміст нітритів і нітратів у крові зріс у 2,3 раза, а в тканинах пародонта – у 2,6 раза). З огляду на такі результати, можна стверджувати, що порушення обміну NO , поряд з оксидативним стресом, є однією з ключових ланок патогенезу пародонтиту, який перебігає на фоні гепатиту. Очевидно, під впливом ЛПС відбувається гіперекспресія індукцибельної NO -синтази в пародонті, в результаті чого синтезується надмірна кількість оксиду азоту. Відомо, що NO також може виконувати корисну функцію при пародонтиті як неспецифічний фактор захисту від бактерій. Вироблення макрофагами NO при запаленні пародонта стимулює разом з іншими радикалами реакції фагоцитозу [14]. Одночасно дефіцит NO сприяє розмноженню збудників у тканинах пародонта, що призводить до хронізації патологічного процесу. Різке збільшення рівня NO_x в пародонті при дії ЛПС на фоні гепатиту можна пояснити тим фактом, що під впливом алілового спирту уражається печінка, в результаті чого утворюється велика кількість ендотоксинів, що стимулюють вироблення цитокінів, які здатні стимулювати iNOS , в тому числі й у пародонті.

Активність радикальних реакцій у біологічних тканинах залежить не тільки від швидкості формування вільних радикалів, але і від здатності захисних систем їх перехоплювати і гасити. З літературних даних відомо, що при пародонтиті відбуваються виражені порушення системи антиоксидного захисту в біологічних рідинах ротової порожнини [3, 6]. Як видно з вказаних у таблиці даних, після введення ЛПС активність одного з основних антиоксидних ферментів організму – СОД , що відповідає за знешкодження супероксиданіонрадикала і

тим самим блокує ланцюг ліпопероксидації ще на стадії ініціації, зменшилася в тканинах ясен у 1,7 раза. Активність КТ мала тенденцію до зниження, а вміст ГSH зменшувався в 1,5 раза. Необхідно відмітити, що гепатит не супроводжувався достовірними змінами показників антиоксидної системи у тканинах пародонта. У плазмі крові після введення ЛПС активність показників антиоксидної системи достовірно не змінювалася, хоча і прослідковувалася чітка тенденція до її зниження. У щурів з гепатитом мало місце достовірне збільшення активності КТ і вмісту ЦП у сироватці крові, рівень ГSH , а також ЗАА плазми крові, навпаки, різко зменшувалися. Відомо, що велика кількість КТ міститься в гепатоцитах. Можливо, підвищення активності ферменту в крові є результатом його посиленого виходу з печінки внаслідок цитолізу гепатоцитів під впливом алілового спирту. Аліловий спирт, метаболізуючись у печінці, призводить до утворення реактивного метаболіту акролеїну. Зниження вмісту ГSH , яке ми спостерігаємо після введення токсину, може бути наслідком токсичного впливу акролеїну на сульфгідрильні групи.

Максимальні зміни показників функціонування антиоксидної системи, як і параметрів, що характеризують інтенсивність окиснювальних процесів, зафіксовано у тварин з ліпополісахаридним запаленням на тлі гепатиту. В цьому випадку вміст ГSH знижувався у крові в 4,5 раза, а ЗАА плазми – більше ніж у 2,3 раза. Різко зменшувались активність СОД (у 2,9 раза) і вміст ГSH у пародонті (в 2,2 раза). Отже, можна припустити, що активація окиснювальних процесів при пародонтиті на фоні гепатиту визначається пригніченням функціонального стану системи антиоксидного захисту.

ВИСНОВОК. У патогенезі ліпополісахаридного запалення тканин пародонта важлива роль належить активації окиснювальних процесів і гіперпродукції оксиду азоту. Перебіг пародонтиту суттєво погіршується при хронічному ураженні печінки аліловим спиртом.

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. 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.

4. Метод определения активности каталазы /

- М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
5. Мешишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мешишен // Буковинський мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
6. 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.
7. 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.
8. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чабба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
9. Amano A. Cardiovascular diseases and periodontal diseases / A. Amano, H. Inaba // Clin. Calcium. – 2012. – 22, № 1. – P. 43–48.
10. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridhour, 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. Dalgic B. Pyogenic liver abscess and peritonitis due to *Rhizopus oryzae* in a child with Papillon-Lefevre syndrome / B. Dalgic, A. Bukulmez, S. Sari // Eur. J. Pediatr. – 2011. – 170, № 6. – P. 803–805.
13. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
14. Evaluation of the activity of leukocytes during experimental periodontitis in the monkey / G. Gagnot, J. F. Michel, E. Legall [et al.] // J. Biol. Buccale. – 1988. – 16 (1). – P. 25–30.
15. Hepatitis B and C virus infections among patients with gingivitis and adult periodontitis: seroprevalence and public health importance / A. G. Farghaly, G. A. Mansour, N. H. Mahdy, A. Yousri // J. Egypt. Public Health Assoc. – 1998. – 73, № 5–6. – P. 707–735.
16. Herring M. E. Periodontal disease and control of diabetes mellitus / M. E. Herring, S. K. Shah // J. Am. Osteopath. Assoc. – 2006. – 106 (7). – P. 416–421.
17. Nagata T. Relationship between diabetes and periodontal disease / T. Nagata // Clin. Calcium. – 2009. – 19 (9). – P. 1291–1298.
18. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients / E. C. Gebara, C. Pannuti, C. M. Faria [et al.] // Oral Microbiol. Immunol. – 2004. – 19, № 4. – P. 277–280.
19. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults / M. Furuta, D. Ekuni, T. Yamamoto [et al.] // Acta Odontol. Scand. – 2010. – 68, № 1. – P. 27–33.
20. Shrihari T. G. Potential correlation between periodontitis and coronary heart disease—an overview / T. G. Shrihari // Gen. Dent. – 2012. – 60, № 1. – P. 20–24.
21. Stage of hepatocellular carcinoma is associated with periodontitis / N. Tamaki, A. Takaki, T. Tomofuji [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2011. – 38, № 11. – P. 1015–1020.

В. В. Щерба, М. М. Корда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ПАРОДОНТИТА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

Резюме

Целью работы было исследовать, как сопутствующее поражение печени влияет на течение липополисахаридного воспаления тканей пародонта. Исследование проведено на белых крысах, которым в ткани пародонта вводили липополисахарид. Гепатит вызывали путем введения животным аллилового спирта на протяжении месяца. Липополисахаридное воспаление пародонта сопровождалось активацией окислительных процессов (в тканях пародонта и крови возрастало содержание ТБК-активных продуктов и окислительномодифицированных белков, понижалась активность супероксиддисмутазы, уменьшался уровень церулоплазмينا и восстановленного глутатиона, имела выраженную тенденцию к снижению общая антиоксидантная активность крови) и нитрооксидативным стрессом (в крови и тканях пародонта увеличивалось содержание NO_x). У животных с пародонтитом, который развивался на фоне гепатита, явления оксидативного и нитрооксидативного стресса были значительно более выражены, чем у крыс, которым аллиловый спирт не вводили. Также при сочетанной патологии достоверно сильнее угнетались показатели антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, хронический гепатит, оксидативный и нитрооксидативный стресс.

PATHOGENETIC PECULIARITIES OF PERIODONTITIS IN CHRONIC HEPATITIS

Summary

The aim of the study was to investigate how chronic hepatitis affects the lipopolysaccharide inflammation of periodontal tissues. The study was conducted on white rats. Lipopolysaccharide was injected into the periodontal tissue. Hepatitis was caused by allyl alcohol administered for 1 month. Lipopolysaccharide inflammation of gum tissue was accompanied by oxidative and nitrooxidative stress (the content of NO_x, TBA-active products and oxidative-modified proteins in periodontal tissues and blood was increased). Superoxide dismutase activity decreased in the periodontal tissues, catalase activity did not change significantly in periodontium and slightly increased in plasma, and ceruloplasmin level decreased in the blood. There was also a significant decrease in reduced glutathione content in both tissues. Total antioxidant activity of blood had a pronounced downward trend. In animals with periodontitis, which developed on the background of hepatitis, the oxidative and nitrooxidative stress was much more pronounced than in rats without hepatitis. Also, in combined pathology the parameters of antioxidant system deteriorated much more noticeable.

KEY WORDS: **periodontitis, chronic hepatitis, oxidative and nitrooxidative stress.**

Отримано 02.04.12

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

БІЛКОВИЙ ОБМІН У ВАГІТНИХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ЦИТРАТУ НАНОХРОМУ

Досліджували вплив цитрату нанохрому в дозі 10 мкг Cr^{3+} /кг маси тіла на інтенсивність білкового обміну в організмі вагітних щурів-самок. Встановлено, що за дії нанохрому збільшується вміст загального білка та знижується активність амінотрансфераз у крові. У всіх тканинах самок дослідної групи знижується активність аспартатамінотрансферази, а аланінамінотрансферази – у нирках, мозку, м'язах і плодах, однак зростає у печінці, селезінці, легенях і серці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: щур, хром, білковий обмін, амінотрансфераза.

ВСТУП. У стані вагітності в організмі тварин проходить низка адаптаційно-приспосувальних процесів, які направлені на забезпечення адекватного її перебігу, росту і розвитку плода. Значна перебудова життєдіяльності організму вагітних супроводжується біохімічними змінами метаболізму, зокрема інтенсифікацією білкового обміну. Білки, які накопичуються в організмі при вагітності, витрачаються на ріст матки і молочних залоз, побудову організму зростаючого плода, частина з них відкладається як запас, що витрачається після родів у зв'язку з годуванням груддю.

З літератури відомо, що хром (Cr^{3+}) – есенціальний елемент для організму людини і тварин, який активує ензими і стабілізує білки та нуклеїнові кислоти, сприяє росту і регенерації тканин, підвищує імунітет [7]. При додаванні Cr^{3+} до раціону щурів зростає вміст амінокислот у тканинах, а також посилюється їх включення в білки тканини серця [6]. В експериментах *in vitro* встановлено, що Cr^{3+} збільшує синтез РНК у клітинах печінки мишей [5]. Це підтверджує те, що Cr^{3+} має вплив на експресію генів. Зв'язуючись із хроматином, він викликає збільшення ініціювання локусів і, отже, інтенсифікацію синтезу РНК. Отже, дія Cr^{3+} пов'язана з індукцією синтезу білка в ядрі та ядерною активацією хроматину [4]. Однак вплив наночастинок хрому, біологічна активність яких є значно вищою, ніж звичайних сполук, на ці процеси не з'ясовано. Тому метою досліджень було з'ясувати вплив цитрату нанохрому на інтенсивність перебігу білкового обміну в організмі вагітних щурів-самок.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 12 білих щурах-самках лінії Вістар © Р. Я. Іскра, 2012.

масою 180–200 г, які перебували у віварії Інституту біології тварин НААН за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Самок поділили на дві групи: контрольну і дослідну, по 6 тварин у кожній. Від початку спаровування щурам-самкам дослідної групи, на відміну від контрольної, до води, яку випоювали, протягом 20 діб додавали розчин цитрату нанохрому в дозі 10 мкг Cr^{3+} /кг маси тіла. Розчин цитрату нанохрому було одержано методом електроімпульсної нанотехнології [1]. Через 20 діб після спаровування здійснювали забій самок під ефірним наркозом згідно з етичними вимогами. Матеріалом для досліджень були кров та тканини самок, в яких досліджували вміст білка та активність аланін- (АлАТ) та аспартатамінотрансфераз (АсАТ) [2]. Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою методів варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать результати проведених досліджень, за дії цитрату нанохрому в крові вагітних самок збільшувався вміст білка на 4,5 % (табл. 1). Це, очевидно, свідчить про позитивний вплив даної сполуки на білоксинтезувальну функцію організму, що особливо важливо у період вагітності та розвитку плода.

Важливою діагностичною ознакою порушень метаболізму в організмі є вміст амінотрансфераз у крові. Підвищення їх активності в крові дозволяє розпізнавати патологічні стани, що супроводжуються некрозом тканин. Проведені дослідження показали, що активність амінотрансфераз у крові вагітних самок за дії наноцитрату хрому дещо знижувалась. Зокрема, активність АлАТ зменшувалась на 3,5 %, АсАТ – на 12,6 % (табл. 1). Це може свід-

Таблиця 1 – Показники білкового обміну в крові щурів-самок за дії цитрату нанохрому ($M \pm m$, $n=6$)

Показник крові	Контрольна група	Дослідна група
Загальний білок, г/л	70,75±0,73	74,05±1,24*
Аланінамінотрансфераза, Е/л	77,60±4,70	74,87±4,64
Аспаратамінотрансфераза, Е/л	108,62±12,12	94,92±5,36

Примітка. У цій і наступній таблицях достовірність відмінностей показників порівняно з контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

чити про оптимізацію перебігу реакцій дезамінування в організмі, а також зниження рівня вивільнення амінотрансфераз у кров'яне русло з тканин під впливом цитрату нанохрому.

У ході досліджень було встановлено, що за дії цитрату нанохрому активність АлАТ – ензиму, який каталізує реакцію перенесення аміногрупи з аланіну на α -кетоглутарову кислоту з утворенням піровиноградної і глутамінової кислот, зростала у печінці (на 27,4 %), селезінці (на 30,0 %), легенях (на 36,7 %), серці (на 48,1 %), проте знижувалась у нирках (на 21,3 %), мозку (на 26,3 %), м'язах (на 70,8 %) та плодах (на 64,0 %) (табл. 2).

Така різностороння дія цитрату нанохрому може свідчити про тканинспецифічний його вплив на обмін білків. Найбільше значення має активність амінотрансфераз у печінці, оскільки їх зміни пов'язані з можливістю розвитку під час вагітності таких ускладнень, як прееклампсія, холестаза вагітних і гостра жирова дистрофія печінки. Тому зростання активності АлАТ у печінці, очевидно, вказує на посилення процесів переамінування в цьому органі, відсутність порушень внутрішньої структури гепатоцитів і підвищення проникності клітинних мембран, що властиво при патологіях.

Зменшення активності АлАТ у деяких тканинах може бути наслідком інгібування даного

ензиму іонами хрому, отже, можна припустити, що реакція переамінування аланіну при цьому перебігає повільніше, що призводить до зниження утворення пірувату та глутамату, який є одним з основних учасників системи знешкодження аміаку в організмі.

АсАТ – ензим, який каталізує реакцію перенесення аміногрупи від аспарагінової кислоти на α -кетоглутарову з утворенням щавлево-оцтової і глутамінової кислот, забезпечує надходження субстратів у цикл трикарбонових кислот [3].

За дії цитрату нанохрому активність АсАТ, порівняно з контролем, знижувалась у всіх тканинах тварин дослідної групи на 7–22 %, проте у плодах не змінювалась (табл. 2). Зменшення активності ензиму свідчить про інгібування процесів розпаду амінокислот, аспартату зокрема, що, відповідно, призводило до послаблення інтенсивності циклу трикарбонових кислот. Таким чином, зниження активності ензиму АсАТ у крові та тканинах самок на тлі зменшення співвідношення АсАТ/АлАТ вказує на стимулювальний вплив цитрату нанохрому на інтенсифікацію білкового обміну в досліджуваних тканинах. Однак дія хрому на активність цих ензимів у тканинах плодів відрізняється від дорослих тварин і потребує додаткового вивчення.

Таблиця 2 – Активність амінотрансфераз у тканинах щурів за дії цитрату нанохрому ($M \pm m$, $n=6$)

Тканина	Група	Аланінамінотрансфераза, Е/л	Аспаратамінотрансфераза, Е/л
Печінка	К	0,25±0,025	2,16±0,067
	Д	0,34±0,028*	1,86±0,035**
Нирки	К	1,98±0,067	2,74±0,009
	Д	1,56±0,059**	2,24±0,053***
Селезінка	К	0,21±0,008	2,36±0,027
	Д	0,30±0,015*	1,84±0,006***
Легені	К	0,19±0,033	2,24±0,068
	Д	0,30±0,018*	1,89±0,055**
Мозок	К	0,33±0,070	2,29±0,0
	Д	0,24±0,039	2,13±0,080
Серце	К	0,14±0,052	2,27±0,017
	Д	0,27±0,006**	1,99±0,045*
М'язи	К	0,48±0,042	2,10±0,026
	Д	0,14±0,014***	1,81±0,098*
Плід	К	0,50±0,031	1,84±0,131
	Д	0,18±0,044**	1,84±0,079

ВИСНОВКИ. Результати проведених експериментальних досліджень свідчать про інтенсифікацію білкового обміну в організмі вагітних щурів-самок за дії цитрату нанохрому. Встановлено, що наночастинки хрому підвищують вміст білка, проте знижують активність амінотрансфераз у крові. Активність АсАТ зменшу-

ється у всіх тканинах самок дослідної групи, а АлАТ – у нирках, мозку, м'язах і плодах.

Перспективи подальших досліджень.

Планується дослідження білкового обміну в нащадків, народжених від щурів-самок, яким випоювали цитрат нанохрому в період вагітності й лактації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пат. 29856 UA. МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів "Еро-зійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів" / Косінов М. В., Каплуненко В. Г. – Опубл. 25.01.08; Бюл. № 2/2008.
2. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. А. Макар та ін.]. – Львів : Видавництво "ВМС", 2004. – 399 с.
3. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis / G. J. Park, B. P. Lin, M. C. Ngu [et al.] // J. Gastroenterol Hepatol. – 2000. – **15**(4). – P. 386–390.

4. Okada S. Effect of chromium (III) on nuclear RNA-synthesis / S. Okada, H. Tsukada, M. Tezuka // Biological Trace Element Research. – 1989. – **21**. – P. 35–39.
5. Okada S. Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium (III) in mouse liver / S. Okada, M. Susuki, H. Ohba // Journal of Inorganic Biochemistry. – 1983. – **19**. – P. 95–103.
6. Roginski E. F. Effects of chromium (III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet / E. F. Roginski, W. Mertz // Journal of Nutrition. – 1969. – **97**. – P. 525–530.
7. Vincent J. B. The Nutritional Biochemistry of Chromium(III). – Department of Chemistry The University of Alabama Tuscaloosa / J. B. Vincent, USA, 2007. – 277 p.

Р. Я. Искра

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ НААН, ЛЬВОВ

БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТРАТА НАНОХРОМА

Резюме

Исследовали влияние цитрата нанохрома в дозе 10 мкг Cr^{3+} /кг массы тела на интенсивность белкового обмена в организме беременных крыс-самок. Установлено, что при действии нанохрома увеличивается содержание общего белка и уменьшается активность аминотрансфераз в крови. Во всех тканях самок опытной группы снижается активность аспартатаминотрансферазы, а аланинаминотрансферазы – в почках, мозге, мышцах и плодах, однако возрастает в печени, селезенке, легких и сердце.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: крыса, хром, белковый обмен, аминотрансфераза.

R. Ya. Iskra

INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF NAAS, LVIV

PROTEIN METABOLISM IN PREGNANT RATS UNDER THE ACTION OF CITRATE NANOCHROMIUM

Summary

The effect of citrate nanochromium in dose of 10 μg Cr^{3+} /kg body weight on the intensity of protein metabolism in pregnant female rats was studied. It is established that the action of nanochromium increases total protein content and reduces the activity of amino transferase levels. In all tissues of female experimental group there are reduced aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase – in kidneys, brain, muscle and foetus and increased in liver, spleen, lungs and heart females.

KEY WORDS: rat, chromium, protein metabolism, aminotransferases.

Отримано 20.02.12

Адреса для листування: Р. Я. Искра, Институт биологии тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна, e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ МЕТИЛУВАННЯ, ТРАНССУЛЬФУВАННЯ
ТА УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В НИРКАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ЦИСПЛАТИНОВОЇ НЕФРОПАТІЇ**

За умов пошкодження нирок цисплатином реєструють гіпергомоцистеїнемію та гіперцистеїнемію, а також зниження рівня гідроген сульфїду в сироватці крові. У гомогенатах нирок визначається зменшення активності ензимів циклу метилування, транссульфування та продукування H_2S . Можливо, нефротоксична дія цисплатину опосередковується через вказані метаболічні мішені.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цисплатин, нефротоксичність, гомоцистеїн, цистеїн, гідроген сульфід.

ВСТУП. В останні роки, у зв'язку з широким застосуванням медикаментів, частота уражень нирок зросла й досягла 10–20 % від усієї ниркової патології. Одним із цитостатиків, які найчастіше використовують при лікуванні злоякісних пухлин, є цисплатин. До побічних ефектів препарату відносять ототоксичність, гастротоксичність, мієлосупресію та алергічні реакції [22], але найбільш виразним із побічних ефектів цисплатину є його нефротоксичність [12]. Незважаючи на активні зусилля протягом багатьох років, щоб знайти менш токсичні, але не менш ефективні альтернативні препарати, цисплатин і досі широко застосовують. Одним із напрямків у вдосконаленні цитостатичної терапії цисплатином є використання засобів, що зменшують нефротоксичність препарату.

На сьогодні відомо, що нирки пошкоджуються цисплатином через різноманітні молекулярні механізми: процеси метаболічної активації, ініціювання оксидативного стресу, розвиток імунних та запальних реакцій, пошкодження мітохондрій та індукцію апоптозу [12]. Але остаточного уявлення про нефротоксичність препарату досі не сформовано, що заважає пошуку оптимальних шляхів корекції ускладнень.

Нефротоксичність цисплатину, як і інших ксенобіотиків, може реалізовуватись через порушення гемодинаміки. Токсиканти можуть впливати як на утворення вазоконстрикторів та вазодилаторів, так і на чутливість ниркових судин до цих вазорегуляторних молекул. Відомо,

що викликана цисплатином нефротоксичність супроводжується змінами чутливості адренорецепторів [14]. Нещодавно було з'ясовано, що до регуляції ниркового кровотоку залучені сірковмісні амінокислоти гомоцистеїн (ГЦ), цистеїн та їх біологічно активний метаболіт гідроген сульфід (H_2S) [7]. Останнім часом також виявлено, що високі концентрації гомоцистеїну викликають виражені морфологічні зміни в нирках, зокрема значні пошкодження гломерулярного апарату, судин, меншою мірою – тубулярні порушення [9, 10]. Можливо, нефротоксична дія цисплатину опосередковується і через вказані метаболічні мішені, однак детальних досліджень у цьому напрямку не проводили.

Метою даної роботи було оцінити стан процесів транссульфування, метилування та утворення гідроген сульфїду в нирках щурів за цисплатинової нефропатії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті використано 30 білих щурів-самців масою 200–250 г, які перебували на стандартному сухому раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами, виробництва НВП Ф.У.Д. (м. Київ). Тварин поділили на дві групи (по 15 тварин у кожній). Цисплатинову нефропатію викликали в щурів (2-га група) шляхом одноразового інтраперитонеального введення препарату в дозі 7 мг/кг маси тіла за 72 год до виведення тварин з експерименту. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин. Евтаназію щурів здійснювали під легким ефірним наркозом шляхом дислокації шийних хребців

© М. М. Йолтухівський, 2012.

відповідно до міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами, згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). При проведенні біохімічних досліджень застосовували пост'ядерний гомогенат нирок, сироватку та сечу тварин.

Активність H_2S -синтезуючих ферментів цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ) (КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтази (ЦБС) (КФ 4.2.1.22) та цистеїнамінотрансферази (ЦАТ) (КФ 2.6.1.3) у пост'ядерному гомогенаті нирок оцінювали за приростом сульфід аніона, який визначали за реакцією утворення метиленового синього, як описано [6].

Цистатіоназну активність ЦГЛ визначали за утворенням цистеїну в реакції розщеплення цистатіоніну [23], а цистатіонінсинтазну активність ЦБС – за утворенням цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну із серином [21]. Рівень серину та цистатіоніну в гомогенаті нирок досліджували методом тонкошарової хроматографії на целюлозі [21]. Активність сульфатоксидази (КФ 1.8.3.1), γ -глутамілцистеїнсинтази (КФ 6.3.2.2) визначали за описаними методиками [27, 28]. S-аденозилгомоцистеїнгідролазну (АГГ) (КФ 3.3.1.1) активність визначали в реакції гідролізу S-аденозилгомоцистеїну за приростом сульфгідрильних груп [24]. Активність метіонаденозилтрансферази (МАТ) (КФ 2.5.1.6) визначали за приростом неорганічного фосфату [13], а бетаїноггомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ) (КФ 2.1.1.5) – за зниженням вмісту сульфгідрильних груп [17]. Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) у гомогенатах нирок встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніона (NO_2^-) [16]. Вміст метаболітів оксиду азоту – нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Гріса [4].

Для оцінки процесів оксидативного стресу визначали активність тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) в пост'ядерному гомогенаті нирок, вміст SH-груп протеїнів та відновленого глутатіону в сироватці [11, 25]. Рівень загального цистеїну в сироватці крові (сума цистеїну та цистину) визначали за реакцією з нінгідринним реактивом [18]. Загальний рівень ГЦ у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням набору фірми "Axis-Shield". Вміст протеїну в сироватці крові, гомогенаті нирок та сечі визначали мікробіуретовим методом [5]. Вміст H_2S у сироватці крові визначали за реакцією утворення тіоніну з використанням n-фенілендіаміну [1, 2]. Вміст креатиніну в сироватці крові та сечі визначали

за методом Яффе із застосуванням набору фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна). Кліренс креатиніну розраховували за відомими формулами [8]. Активність γ -глутамілтрансферази (ГГТ) (КФ 2.3.2.2) у сечі оцінювали за швидкістю вивільнення 4-нітроаніліну з γ -глутамілнітроаніліду з використанням стандартного набору фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна). Фосфоліпідний спектр визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40, застосовуючи систему розчинників хлороформ-метанол-вода у співвідношенні за об'ємом 65:30:5. Ідентифікацію індивідуальних фосфоліпідів після їх хроматографічного розділення проводили методом свідків, за допомогою якісних реакцій на холін, етаноламін та за величинами R_f , відомими з літератури [3].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стюдента. У роботі використано цисплатин (EBEWE, Австрія), DL-гомоцистеїн, L-цистеїн, аденозин, S-аденозилгомоцистеїн, $Na_2S \cdot 9H_2O$, дитіотреїтол (Sigma, США), набір "Homocysteine EIA" (Axis-Shield, Великобританія). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії хч.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Через 3 доби після інтраперитонеального введення щурам цисплатину реєстрували збільшення вмісту креатиніну та сечовини в плазмі крові в 3,3 і 6,1 рази відповідно, зменшення екскреції креатиніну із сечею в 1,7 рази, а також зниження кліренсу креатиніну в 3,4 рази. Крім цього, відмічали підвищення активності ГГТ у сечі в 3,2 рази (табл. 1). Такі зміни фільтраційної та азотовидільної функцій нирок, а також порушення канальцевої реабсорбції підтвердили формування у тварин дослідної групи цисплатинової нефропатії.

Встановлено, що розвиток цисплатинової нефропатії супроводжувався формуванням гіпергомоцистеїнемії та гіперцистеїнемії. Так, у тварин дослідної групи відмічали достовірне зростання рівня загального ГЦ на 88 %, загального цистеїну – на 27 % (особливо виразним було зростання фракції непротеїнового цистеїну – 45 %). На цьому тлі спостерігали зниження на 20 % вмісту H_2S (біологічно активного похідного гомоцистеїну та цистеїну) в сироватці крові щурів з цисплатиновою нефропатією (табл. 1).

Вірогідною причиною гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) може бути зниження активності ферментів, що метаболізують ГЦ. Так, відмічали порушення процесів транссульфування ГЦ у нир-

Таблиця 1 – Вплив цисплатину на вміст метаболітів у сироватці крові, сечі та нирках, а також активність γ -глутамілтрансферази в сечі ($M \pm m$, $n=15$)

Показник	Контроль	Цисплатинова нефропатія
Сироватка крові		
Загальний цистеїн, мкмоль/л	127 $\pm$ 3,64	161 $\pm$ 6,70*
Непротеїновий цистеїн, мкмоль/л	43,8 $\pm$ 1,64	63,5 $\pm$ 3,31*
Протеїнозв'язаний цистеїн, мкмоль/л	83,1 $\pm$ 2,59	97,5 $\pm$ 8,14
Загальний ГЦ, мкмоль/л	6,42 $\pm$ 0,22	12,1 $\pm$ 0,58*
Гідроген сульфід, мкмоль/л	78,5 $\pm$ 2,59	64,0 $\pm$ 4,28*
Протеїнозв'язані SH-групи, мкмоль/л	8,87 $\pm$ 0,09	7,57 $\pm$ 0,14*
NO ²⁺ +NO ³⁻ , мкмоль/л	43,8 $\pm$ 1,13	35,8 $\pm$ 0,93*
Сечовина, ммоль/л	4,62 $\pm$ 0,25	28,1 $\pm$ 1,18*
Креатинін, мкмоль/л	110 $\pm$ 5,34	364 $\pm$ 12,8*
Кліренс креатиніну, мл/хв	0,94 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,01*
Сеча		
Креатинін, ммоль/л	4,96 $\pm$ 0,11	2,95 $\pm$ 0,13*
Активність ГГТ, нмоль/хв·мл	0,88 $\pm$ 0,05	2,84 $\pm$ 0,08*
Пост'ядерні гомогенати нирок		
Відновлений глутатіон, мкмоль/г тканини	1,56 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,05*
ФЕА, мкг/мг протеїну	57,8 $\pm$ 2,0	72,4 $\pm$ 2,55*
ФХ, мкг/мг протеїну	68,1 $\pm$ 1,6	49,9 $\pm$ 1,71*
ФХ/ФЕА	1,19 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,04*

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

ках, а саме достовірне зменшення цистатіонін-синтазної активності ЦБС та цистатіоназної активності ЦГЛ на 28,7 і 24,7 % відповідно. Введення цисплатину викликало істотне зменшення активності ензимів циклу метилування ГЦ. Зокрема, у нирках щурів, які отримували цисплатин, активність БГМТ, МАТ та АГГ зменшилась у 2,2, 1,5 і 3,1 раза відповідно (табл. 2). Як відомо, зниження активності АГГ призводить до накопичення в клітинах S-аденозилгомоцистеїну – потужного інгібітора метилтрансферазних реакцій. Про

глибокі порушення процесів метилування в нирках щурів із цисплатиновою нефропатією свідчили зміни фосфоліпідного спектра. Відмічали зростання рівня фосфатидилетаноламіну (ФЕА) на 25,3 % та зменшення – фосфатидилхоліну (ФХ) на 26,7 % порівняно з інтактною групою. Співвідношення ФХ/ФЕА знижувалось в 1,7 раза, що вказує перш за все на пригнічення метилтрансферазних реакцій у нирках (табл. 2).

Окрім ГГЦ, у тварин дослідної групи реєстрували також гіперцистеїнемію, причиною

Таблиця 2 – Вплив цисплатину на активність ензимів обміну сірковмісних амінокислот, а також продукування H₂S і NO в нирках щурів ($M \pm m$, $n=15$)

Показник активності ферментів (нмоль/хв на 1 мг протеїну)	Контроль	Цисплатинова нефропатія
Транссульфування ГЦ		
Цистатіонін- β -синтаза (цистатіонінсинтазна активність)	15,7 $\pm$ 0,47	11,2 $\pm$ 0,65*
Цистатіонін- γ -ліаза (цистатіоназна активність)	15,8 $\pm$ 0,50	11,9 $\pm$ 0,37*
Метилування ГЦ		
Бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза	2,45 $\pm$ 0,23	1,11 $\pm$ 0,08*
Метіонінаденозилтрансфераза	3,19 $\pm$ 0,09	2,16 $\pm$ 0,09*
S-аденозилгомоцистеїнгідролаза	4,90 $\pm$ 0,23	1,59 $\pm$ 0,12*
Метаболізм цистеїну		
Сульфітоксидаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	7,40 $\pm$ 0,37	5,48 $\pm$ 0,33*
γ -глутамілцистеїнсинтетаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	3,48 $\pm$ 0,19	2,91 $\pm$ 0,20*
Продукція H ₂ S		
Цистатіонін- β -синтаза	2,18 $\pm$ 0,09	1,50 $\pm$ 0,18*
Цистатіонін- γ -ліаза	1,61 $\pm$ 0,07	1,17 $\pm$ 0,12*
Цистеїнаміотрансфераза	2,54 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,29*
Інші		
Тіоредоксинредуктаза	5,49 $\pm$ 0,34	4,30 $\pm$ 0,35*
NO-синтаза [#]	10,7 $\pm$ 0,66	7,95 $\pm$ 0,58*

Примітка * – $p < 0,05$ відносно групи контролю; # – активність визначали у пмоль/хв на 1 мг протеїну.

якої, найімовірніше, було порушення обміну цистеїну в цистеїнсульфінатному шляху та в шляху синтезу глутатіону. Відзначали зменшення активності сульфітоксидази та гамма-глутамілцистеїнсинтетази на 25,9 і 16,4 % відповідно (табл. 2). Інші тіол-сульфідні порушення та формування окислювального стресу проявлялись зниженням активності тіоредоксинредуктази на 21,7 % та відновленого глутатіону на 44,0 % у пост'ядерному гомогенаті нирок, а також зменшенням вмісту в сироватці крові протеїнозв'язаних SH-груп на 14,7 % (табл. 1, 2).

Було оцінено зміни продукції H_2S у гомогенатах нирок щурів дослідної групи. Встановлено, що введення цисплатину достовірно порушує здатність нирок до продукування H_2S . Зокрема, утворення H_2S у реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном з участю ЦБС зменшилось на 31,2 %, у реакції розщеплення цистатіоніну з участю ЦГЛ – на 27,2 %, а в реакції трансамінування цистеїну з участю ЦАТ – на 30,3 % (табл. 2).

Для оцінки продукції нітроген оксиду як одного з регуляторів ниркового кровотоку ми визначали активність NO-синтази в нирках щурів та вміст метаболітів NO в сироватці крові. За умов цисплатинової нефропатії активність NO-синтази знижувалась на 25,7 %, а вміст нітритів та нітратів у сироватці крові зменшувався на 18,3 % (табл. 1, 2).

Виявлену нами залежність між порушенням стану нирок та показниками обміну сірковмісних метаболітів підтвердили результати кореляційного аналізу.

При цьому показники клубочкової фільтрації тісно корелювали з вмістом гомоцистеїну, гідроген сульфідну та метаболітами NO в сироватці крові, а маркери канальцевого пошкодження – з рівнем цистеїну, тіольних груп у сироватці крові та співвідношенням ФХ/ФЕА в нирках (табл. 3).

Отримані нами дані свідчать про те, що цисплатинова нефропатія супроводжується порушеннями в нирках процесів транссуль-

фування і метилування ГЦ, метаболізму цистеїну, а також продукування газотрансмітерів H_2S і NO. Виникає питання, за рахунок яких механізмів реалізується вплив цисплатину на процеси метаболізму сірковмісних амінокислот. Викликаний цисплатином окислювальний стрес може призводити до зниження активності ряду ферментів. Так, зменшення активності МАТ призводить до дефіциту S-аденозилметіоніну. Це, у свою чергу, є депримуєчим фактором щодо активності регуляторного ферменту транссульфування – ЦБС. Зниження активності ЦБС спричиняє накопичення ГЦ.

Про стан гіпометилування при цисплатиновій нефропатії свідчить зниження співвідношення ФХ/ФЕ в нирках. За цих умов у нирках порушується не тільки реметилування ГЦ у метіонін, але й синтез креатину, креатиніну та компонентів клітинних мембран – фосфатидилхолінів [19]. Імовірно, реакції метилування пригнічуються внаслідок зниження активності АГГ та накопичення S-аденозилгомоцистеїну, який є інгібітором метилтрансфераз [11].

Одним із механізмів нефротоксичної дії цисплатину також може бути пригнічення продукування H_2S . Встановлено, що ендogenous H_2S необхідний для захисту нирок від дисфункцій за умов ішемії/реперфузії [20]. Існують дані, що інгібування ендogenous утворення H_2S супроводжується втратою цілісності епітелію в різних органах та активацією в них запальних процесів [15]. Імовірно, дефіцит гідроген сульфідну зумовлений накопиченням у крові ГЦ, що створює умови для ковалентної модифікації ферментів, які продукують H_2S . Поряд із цим, за умов окислювального стресу може прискорюватись деградація молекул H_2S . Активация окислювального стресу, у свою чергу, підтверджувалась змінами показників тіол-дисульфідного обміну. Також у нашому дослідженні підтверджено зменшення активності ендотеліальної NO-синтази за індукованої цисплатином нефропатії [26]. Це є важливим фактором нефротоксичності, оскільки продукування оксиду азоту необхідне для підтримки

Таблиця 3 – Кореляційні зв'язки між показниками функціонального стану нирок з рівнем сірковмісних метаболітів, фосфоліпідів, тіольних груп та нітратів і нітритів за умов цисплатинового ураження нирок (n=15)

Показник	Кліренс креатиніну	Активність ГГТ
ГЦ	-0,875*	0,336
Цистеїн сироватки	-0,238	0,523*
H_2S сироватки	0,696*	-0,275
Метаболіти NO сироватки	0,622*	-0,295
Тіольні групи сироватки	0,277	-0,596*
ФХ/ФЕА нирок	0,326	-0,617*

Примітка. * – коефіцієнти кореляції $r \geq 0,51$ є достовірними ($p < 0,05$).

нормальної вазодилатації в нирках. Тому порушення продукування вазодилаторів NO і H_2S може бути визначальним фактором у розвитку саме клубочкової дисфункції.

ВИСНОВКИ. 1. Введення щурам цисплатину викликає збільшення рівня гомоцистеїну на 88 %, цистеїну – на 27 % та зниження на 20 % вмісту гідроген сульфід у сироватці крові.

2. За умов цисплатинової нефропатії реєструють зниження активності ензимів циклу метилювання в нирках (бетаїноггомоцистеїн-метилтрансферази, метіонінаденозилтрансферази та S-аденозилггомоцистеїнгідролази в 2,2, 1,5 і 3,1 раза відповідно) та порушення

фосфоліпідного спектра нирок (рівень фосфотидилетаноламіну зростає на 25,3 %, вміст фосфотидилхоліну зменшується на 26,7 %).

3. Ураження нирок цисплатином супроводжується зменшенням на 27–31 % активності ензимів транссульфування та утворення гідроген сульфід (цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази, цистеїнамінотрансферази).

4. Маркери канальцевого пошкодження тісно корелюють з рівнем цистеїну, тіольних груп у сироватці крові та співвідношенням ФХ/ФЕА в нирках, а показники клубочкової фільтрації – з вмістом гомоцистеїну, гідроген сульфід та метаболітами NO в сироватці крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісн. наук. досліджень. – 2009. – № 1. – С. 29–32.
2. Заїчко Н. В. Вплив тіолактину гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфід на систему гемостазу кролів / Н. В. Заїчко // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 2. – С. 51–56.
3. Кейтс М. Техника липидології. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
4. Коренман И. М. Фотометрический анализ: методы определения органических соединений / И. М. Коренман. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1975. – 359 с.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высш. шк., 1980. – 324 с.
6. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідроген сульфід у нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журн. – 2009. – № 4. – С. 12–22.
7. Мельник А. В. Дослідження ролі гідроген сульфід та сірковмісних амінокислот в регуляції тону ниркових артерій та фільтрації в нирках / А. В. Мельник // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2009. – **9**, вип. 4 (28), частина 3. – С. 98–102.
8. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
9. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О. О. Пентюк, Б. М. Луцок, І. І. Андрушко [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 5–17.
10. Морфологічні зміни в органах тварин з експериментальною гіпергомоцистеїнемією та можливість їх корекції дієтами, збагаченими вітамінами / К. П. Постовітенко, О. О. Пентюк, М. Б. Луцок [та ін.] // Вісник морфології. – 2005. – **11**, № 2. – С. 287–291.
11. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
12. Arany I. Cisplatin nephrotoxicity / I. Arany, R. L. Safirstein // Semin. Nephrol. – 2003. – **23**. – P. 460–464.
13. Chiang P. K. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms / P. K. Chiang, G. L. Cantoni // J. Biol. Chem. – 1977. – **252**, № 13. – P. 4506–4513.
14. Cisplatin-induced nephrotoxicity causes altered renal hemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats: role of augmented renal alpha-adrenergic responsiveness / M. A. Hye Khan, M. Abdul Sattar, N. A. Abdullah, E. J. Johns // Exp Toxicol Pathol. – 2007. – **59** (3-4). – P. 253–260.
15. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception / T. M. Cunha, D. Dal-Secco, W. A. Verri [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – **590**. – P. 127–135.
16. Effect of N-stearoylethanolamine on the level of stable NO metabolites in different pathological conditions which are accompanied by oxidative stress / N. M. Hula, H. V. Kosiakova, N. L. Kindruk, T. O. Khmel' // Ukr. Biochim. Zh. – 2005. – **77**, № 3. – P. 113–119.
17. Ericson L-E. Betaine-homocysteine methyltransferases: Distribution in nature / L-E. Ericson // Acta. Chem. Scand. – 1960. – **14**. – P. 2102–2112.
18. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids / M. K. Gaitonde // Biochem J. – 1967. – **104**, № 2 – P. 627–633.
19. Garlick P. J. Toxicity of methionine in humans / P. J. Garlick // J. Nutr. – 2006. – **136**(6). – P. 1722–1725.
20. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction / P. Tripathi, N. S. Patel, M. Collino [et al.] // Lab. Invest. – 2008. – **88**, № 10. – P. 1038–1048.

21. Goldstein J. L. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin / J. L. Goldstein, B. K. Campbell, S. M. Gartner // J. Clin. Invest. – 1972. – **51**, № 4. – P. 1034–1037.
22. Hartmann J. T. Toxicity of platinum compounds / J. T. Hartmann, H.-P. Lipp // Expert Opin. Pharmacother. – 2003. – **4**. – P. 889–901.
23. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development / K. Heinonen // Biochem. J. – 1973. – **136**(4). – P. 1011–1015.
24. Isa Y. Effect of vitamin B6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation / Y. Isa, H. Tsuge, T. Hayakawa // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 2006. – **52**, № 5. – P. 302–306.
25. Moore E. C. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from escherichia coli B. / E. C. Moore, P. Reichard, L. Thelander // J. Biol. Chem. – 1964. – **239**. – P. 3445–3452.
26. Saleh S. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide / S. Saleh, E. El-Demerdash // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – **97**, № 2. – P. 91–97.
27. Stipanuk M. H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat / M. H. Stipanuk, P. W. Beck // Biochem. J. – 1982. – **206**, № 2. – P. 267–277.
28. Yan C. C. Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of γ -glutamylcysteine and glutathione: application to assay of γ -glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver / C. C. Yan, R. J. Huxtable // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1995. – **672**. – P. 217–224.

Н. М. Йолтуховский

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ Н. І. ПІРОГОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ, ТРАНССУЛЬФИРОВАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В ПОЧКАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЦИСПЛАТИНОВОЙ НЕФРОПАТИИ

Резюме

В условиях повреждения почек цисплатином развиваются гипергомоцистеинемия и гиперцистеинемия, а также снижается уровень гидроген сульфида в сыворотке крови. В гомогенатах почек определяется уменьшение активности ферментов цикла метилирования, транссульфирования и продуцирования H_2S . Не исключено, что нефротоксическое действие цисплатина опосредуется через указанные метаболические мишени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цисплатин, нефротоксичность, гомоцистеин, цистеин, гидроген сульфид.

M. M. Yoltukhivskyi

M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

STUDY OF THE PROCESSES OF METHYLATION, TRANSSULFURATION AND HYDROGEN SULFIDE FORMATION IN RAT KIDNEY WITH CISPLATIN NEPHROPATHY

Summary

Cisplatin-induced renal damage associated with hyperhomocysteinemia and hypercysteinemia, and decreased in serum hydrogen sulfide levels. In kidney homogenates were determined the decrease of enzyme activities of the methylation cycle and the transsulfuration pathway as well as hydrogen sulfide formation. It is possibly that the nephrotoxic effect of cisplatin is mediated through these metabolic targets.

KEY WORDS: cisplatin, nephrotoxicity, homocysteine, cysteine, hydrogen sulfide.

Отримано 20.12.11

Адреса для листування: М. М. Йолтухівський, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна, e-mail: yokolya@yahoo.com

ІНТРАРЕНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЦИРКАДІАННОГО РИТМУ ФУНКЦІЇ НИРОК

В експериментах на щурах показано, що серотонін у денні й дофамін у нічні години є важливими інтраренальними регуляторами циркадіанного ритму функції нирок.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: циркадіанний ритм, серотонін, дофамін.

ВСТУП. Важлива роль супрахіазматичних ядер (СХЯ) переднього гіпоталамуса в регуляції циркадіанного ритму функції нирок є добре встановленим фактом [3]. Показано, що в денні години активується міжнейрональна взаємодія в структурах СХЯ з участю серотоніну, дофаміну та ГАМК-ергічної системи [1, 2, 4]. Зниження синтезу мелатоніну епіфізом у цей період при паралельному підвищенні виділення в кров аргінін-вазопресину зумовлює розвиток депресії показників екскреторної функції нирок. У нічні години, коли нейромедіаторні ефекти серотоніну, дофаміну та норадреналіну в структурах СХЯ знижуються, а пінеалоцити звільняються від гальмівних ефектів ГАМК-ергічних нейронів, посилюються ефекти мелатоніну, що в поєднанні зі збільшенням активності гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вертикалі приводить до активації екскреторної функції нирок. Наведені механізми складають основу участі центрального пейсмейкера, яким є СХЯ, в регуляції циркадіанного ритму функції нирок.

Водночас залишаються нез'ясованими інтегральні механізми, які забезпечують узгоджену взаємодію процесів ультрафільтрації в клубочках, реабсорбції та секреції електролітів у проксимальному і дистальному відділах канальцевого апарату нефрону, а також регуляторної ролі клітин macula densa та юктагломерулярного апарату в реалізації гломеруло-тубулярного і тубуло-тубулярного балансу.

Самостійним і практично недослідженим залишається питання про природу і механізми участі інтраренального водія циркадіанного ритму [6]. Встановлено, що в процесі розвитку добового циклу в нирковій паренхімі має місце

активація генів циркадіанної ритмічності (Per-1, Per-2, Cry-1, Cry-2, Bmal-1 та інших), що приводить до ритмічності добових коливань ряду ферментних систем нирки [16], особливо в епітелії проксимального відділу нефрону та клітинах macula densa.

Зважаючи на циркадіанні коливання рівня серотоніну та дофаміну в нирковій паренхімі й реципрокні нефротропні ефекти даних моноамінів на функцію нирок [13], сформульовано гіпотезу, згідно з якою серотоніну і дофаміну відводиться важлива роль у реалізації інтраренальних механізмів регуляції циркадіанного ритму функції нирок.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 36 щурах-самцях лінії Вістар масою 150–180 г, яких було поділено на групи: 1-ша група – інтактні тварини, яких брали в дослід у денні години (11–13 год); 2-га – інтактні тварини, яких брали в дослід у нічні години (23–1 год); 3-тя – о 9 год тваринам вводили внутрішньочеревно серотонін із того ж розрахунку; 4-та – о 21 год тваринам вводили внутрішньочеревно серотонін із того ж розрахунку; 5-та – о 9 год тваринам для підвищення рівня дофаміну вводили внутрішньочеревно селегілін, що є селективним інгібітором моноаміноксидази-B, у дозі 2,5 мг/кг; 6-та – о 21 год тваринам вводили внутрішньочеревно селегілін із того ж розрахунку.

За 8 днів до початку та впродовж експериментальних досліджень щурів утримували на стабільному харчовому раціоні (зерно) з вільним доступом до 1 % розчину натрію хлориду на водопровідній воді, що нівелювало низько-натрієвий раціон. Для дослідження фізіологічної ролі інтраренального водія ритму тварин

© Л. Г. Доцюк, І. Г. Кушнір, Т. М. Бойчук, 2012.

упродовж 10 днів утримували при постійному освітленні інтенсивністю 500 люкс для пригнічення ритмічної біоелектричної активності нейронів СХЯ. У день експерименту щурам кожної групи о 11 та 23 год зондом у шлунок вводили 1 % розчин етилового спирту на дистильованій воді в об'ємі 5 % від маси тіла з метою блокади ефектів аргінін-вазопресину на реабсорбцію води в збиральних трубках нефрону і для розрахунку показників гломеруло-тубулярного балансу [5]. Діурез збирали в обмінних клітках за 2 год. У плазмі крові та сечі піддослідних тварин визначали концентрацію ендogenous креатиніну колориметрично з пікриновою кислотою за Фолінім. Концентрацію іонів натрію і калію визначали на полум'яному фотометрі. Екскрецію кислих фосфатів і амонію визначали титриметрично. Швидкість гломерулярної фільтрації, фільтраційний заряд натрію, проксимальний і дистальний транспорт іонів натрію та інтенсивність канальцевої реабсорбції натрію і води визначали за методикою Ю. В. Наточина (1974) [5].

Цифровий матеріал обробляли методами варіаційної статистики з визначенням коефіцієнтів кореляції та t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В експериментах із введенням екзогенного серотоніну в денні години констатовано різкі антидіуретичну та антинатрійуретичну дії (з $0,17 \pm 0,02$ до $0,02 \pm 0,001$ мл/год ($p < 0,01$); з $40,8 \pm 5,31$ до $4,0 \pm 0,3$ мкекв/год ($p < 0,01$). Ацидогенез у нефроні під впливом серотоніну також різко знижувався за рахунок екскреції як титрованих кислот, так і солей амонію. В основі депресії показників екскреторної функції нирок лежала відома вазоконстрикторна дія серотоніну [9], що приводила до зменшення швидкості гломерулярної фільтрації з $485,2 \pm 55,2$ до $169,3 \pm 8,2$ мкл/хв ($p < 0,01$), та підвищення канальцевої реабсорбції іонів натрію з $98,98 \pm 0,03$ до $99,65 \pm 0,03$ % ($p < 0,01$).

У темнову фазу добового циклу нефротропні ефекти серотоніну мали суттєві відмінності від його дії на нирку в денні години. Констатовано, що діурез не тільки не зменшувався, а достовірно зріс з $0,26 \pm 0,009$ до $0,49 \pm 0,02$ мл/год ($p < 0,01$). Екскреція іонів натрію в цей період підвищувалась на тлі суттєвого зниження інтенсивності ацидогенезу в нефроні. Швидкість клубочкової фільтрації в нічні години під впливом серотоніну мала лише тенденцію до зменшення, а в основі натрійурезу лежало зниження його канальцевої реабсорбції з $97,26 \pm 0,07$ до $92,96 \pm 0,80$ % ($p < 0,01$). Циркадіанні особливості нефротроп-

них ефектів серотоніну дозволяють зробити висновок, що в темнову фазу добового циклу антидіуретична, антинатрійуретична та вазоконстрикторна дії даного біоаміну нейтралізуються натрійуретичними і вазодилаторними ефектами мелатоніну та дофаміну [7, 12], особливо, якщо взяти до уваги реципрокні впливи серотоніну і дофаміну на функцію нирок [13].

З метою дослідження нефротропних ефектів дофаміну на функцію нирок було використано методику з введенням селегіліну, селективного інгібітора моноаміноксидази-В, на тлі блокади біоритму центрального пейсмейкера (СХЯ) впродовж 10 днів з постійним освітленням. За таких умов пригнічення окиснення дофаміну, як свідчать дані літератури [14, 15], приводить до підвищення його рівня в тканинах і крові.

Констатовано, що як у денні, так і в нічні години селегілін впливав на діурез та ацидогенез в нефроні, хоча сумарне виведення іонів натрію знижувалось. У нічні години мало місце зменшення фільтраційного заряду натрію з $83,2 \pm 3,35$ до $60,9 \pm 1,24$ мкекв/год ($p < 0,01$), а також проксимального транспорту іонів натрію з $78,5 \pm 3,23$ до $57,6 \pm 0,97$ мкекв/год ($p < 0,01$), що характерно для нефротропної дії дофаміну. Разом із тим, дистальний транспорт натрію в денні години збільшувався з $2,01 \pm 0,21$ до $3,25 \pm 0,43$ мкекв/год ($p < 0,05$), хоча в темнову фазу добового циклу селегілін знижував і дистальний транспорт натрію з $3,50 \pm 0,29$ до $2,75 \pm 0,36$ мкекв/год ($p = 0,05$). Отримані дані свідчать про чітку нефротропну дію дофаміну переважно в темнову фазу добового циклу, як це було показано нами раніше [2].

Підводячи підсумок, можна сказати, що серотоніну і дофаміну належить важлива роль у регуляції циркадіанного ритму функції нирок інтраренальними механізмами (рис.).

Активация генів ритмічності Per-1, Per-2, Cry-1, Cry-2, Bmal-1 [16] в денні години супроводжується підвищенням синтезом серотоніну і депресією синтезу дофаміну. Це приводить до зменшення швидкості гломерулярної фільтрації, фільтраційного заряду іонів натрію, підвищення реабсорбції натрію як у проксимальному, так і в дистальному сегментах нефрону. Зниження концентрації іонів натрію в дистальному звивистому каналці може активувати синтез клітинами macula densa оксиду азоту (NO) та простагландинів (ПГЕ₂) [6, 8, 18, 20]. Такі біохімічні зміни спричиняють активацію P₂ рецепторів [11] і підвищення синтезу реніну [17, 19].

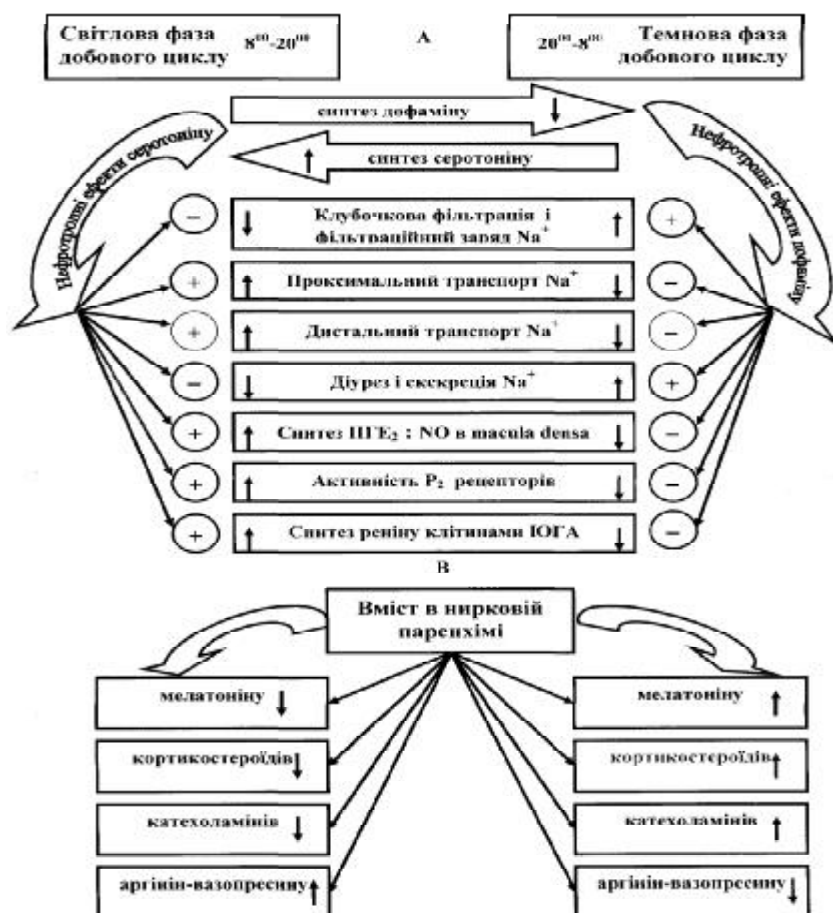


Рис. Інтраренальні (А) та екстраренальні (В) фактори впливу на циркадіанний ритм гломеруло-тубулярного і тубуло-тубулярного балансу в нефроні.

У темнову фазу добового циклу генетично детермінований синтез серотоніну в нирковій паренхімі знижується і реципрокно підвищується синтез дофаміну, що може привести до підвищення ниркового кровотоку і зниження як проксимального, так і дистального транспорту іонів натрію. Простагландини E_2 , які блокують синтез NO [10], зменшують активацію P_2 рецепторів і синтез реніну [12].

Вказані генетичні, біохімічні й функціональні механізми, які забезпечують добові коли-

вання гломеруло-тубулярного і тубуло-тубулярного балансу [20, 21] як основи циркадіанної активності інтраренального водія біоритму функції нирок, наведено на рисунку.

ВИСНОВОК. 5-Гідрокситриптамін (серотонін) у світлову і дофамін у темнову фазу є важливими регуляторами циркадіанного ритму функції нирок на тлі як інтактного, так і заблокованого тривалим постійним освітленням центрального пейсмейкера (СХЯ).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кушнір І. Г. Модуляція циркадіанного ритма функцій почек под действием агониста GAMK_A -рецепторов и мелатонина / І. Г. Кушнір, Г. І. Кокошук // Нейрофизиология. – 2009. – **41**, № 5. – С. 381–386.
2. Кушнір І. Г. Вплив підвищеного рівня дофаміну на циркадіанний ритм екскреторної функції нирок у щурів / І. Г. Кушнір, Г. І. Кокошук // Журн. АМН України. – 2009. – **15**, № 3. – С. 597–603.
3. Кушнір І. Г. Нейротрансмітерні механізми циркадіанного ритму / І. Г. Кушнір // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2010. – **6**, № 1. – С. 32–37.

4. Кушнір І. Г. Циркадіанний ритм функціональної активності нирок під впливом сінемету та амисульприду – модуляторів рівня дофаміну в структурах мозку / І. Г. Кушнір, Г. І. Кокошук // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2008. – **4**, № 2. – С. 44–47.
5. Aperia A. C. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism / A. C. Aperia // Annual review of Physiology. – 2000. – **62**, № 1. – P. 621–647.
6. Bell P. D. ATP as mediator of macula densa cell signaling / P. D. Bell, P. Komlosi, Z. R. Zhang // Purinergic Signal. – 2009. – **5**, № 4. – P. 461–471.
7. Chronic oral L-DOPA increases dopamine and

decreases serotonin excretions / N. H. Garcia, T. J. Berndt, G. M. Tyce, F. G. Knox // *AJP – Regul. Physiol.* – 1999. – **277**, № 5. – P. 1476–1480.

8. Deng A. Hemodynamics of early tubuloglomerular feedback resetting during reduced proximal reabsorption / A. Deng, J. S. Hammes, S. C. Thomson // *Kidney Int.* – 2002. – **62**, № 6. – P. 2136–2146.

9. Effects of inhibition of MAO and COMT on intrarenal dopamine and serotonin and on renal function / Y. Wang, T. J. Berndt, J. M. Gross [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2001. – **280**. – P. R248–R254.

10. Inhibition of nNos expression in the macula densa by COX-2-derived prostaglandin E(2) / A. Paliege, D. Mizel, C. Medina [et al.] // *American journal of physiology. Renal physiology.* – **287**, № 1. – P. 152–159.

11. Inscho E. W. ATP, P₂ receptors and the renal microcirculation / E. W. Inscho // *Purinergic Signal.* – 2009. – **5**, № 4. – P. 447–460.

12. Intrarenal Dopaminergic System Regulates Renin Expression / M.-Z. Zhang, B. Yao, X. Fang [et al.] // *Hypertension.* – 2009. – **53**. – P. 564–570.

13. Itskovitz H. D. Reciprocal renal effects of dopamine and 5-hydroxytryptamine formed within the rat kidney / H. D. Itskovitz, Y. H. Chen, C. T. Jr. Stier // *Clinical Science.* – 1988. – **75**. – P. 503–507.

14. Knoll J. R(-)-deprenyl (Selegiline, Movergan) facilitates the activity of the nigrostriatal dopaminergic neuron / J. Knoll // *J. Neural Transm. Suppl.* – 1987. – **25**. – P. 45–66.

15. Lamensdorf I. Effect of long-term treatment with selective monoamine oxidase A and B inhibitors on dopamine release from rat striatum in vivo / I. Lamensdorf, M. B. Youdim, J. P. Finberg // *J. Neurochem.* – 1996. – **67**, № 4. – P. 1532–1539.

16. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function / A. M. Zuber, G. Centeno, S. Pradevand [et al.] // *PNAS.* – 2009. – **106**, № 38. – P. 16523–16528.

17. Peti-Peterdi J. Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin Release / J. Peti-Peterdi, R. C. Harris // *JASN.* – 2010. – **21**, № 7. – P. 1093–1096.

18. Ressetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E₂ / Y. Tsuchiya, S. Minami, H. Kadotani, E. Nishida // *EMBO reports.* – 2005. – **6**, № 3. – P. 256–261.

19. Schnermann J. Maintained tubuloglomerular feedback responses during acute inhibition of P₂ purinergic receptors in mice / J. Schnermann // *AJP – Renal. Physiol.* – **300**, № 2. – P. 339–344.

20. Sipos A. Direct demonstration of tubular fluid flow sensing by macula densa cells / A. Sipos, S. Vargas, J. Peti-Peterdi // *AJP – Renal. Physiol.* – **299**, № 5. – P. 1087–1093.

21. Thomson S. C. Glomerulo-tubular balance, Tubulo-glomerular Feedback, and Salt homeostasis / S. C. Thomson, R. C. Blantz // *JASN.* – 2008. – Issue 19. – P. 2272–2275.

Л. Г. Доцюк¹, И. Г. Кушнир¹, Т. М. Бойчук²

ЧЕРНОВЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Ю. ФЕДЬКОВИЧА¹, ЧЕРНОВЦЫ
БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ², ЧЕРНОВЦЫ

ИНТРАРЕНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА ФУНКЦИИ ПОЧЕК

Резюме

В экспериментах на крысах показано, что серотонин в дневные и дофамин в ночные часы выступают важными интравенальными регуляторами циркадианного ритма функции почек.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циркадианный ритм, серотонин, дофамин.

L. G. Dotsyuk¹, I. G. Kushnir¹, T. M. Boichuk²
YU. FEDKOVICH NATIONAL UNIVERSITY¹, CHERNIVTSI
BUKOVINIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY², CHERNIVTSI

INTRARENAL MECHANISMS OF CIRCADIAN RHYTHM KIDNEY FUNCTION REGULATION

Summary

In experiments on rats was established that serotonin in the daytime and dopamin in the night time be on importance intrarenal moderator of circadian rhythm kidney function.

KEY WORDS: circadian rhythm, serotonin, dopamin.

Отримано 20.02.12

Адреса для листування: І. Г. Кушнір, Чернівецький національний університет імені Ю. Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна.

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

ВЗАЄМОДІЯ ФЛУОРЕНІВ З ОСНОВНИМИ КОМПОНЕНТАМИ МОЛОКА

Досліджено *in vitro* взаємодію флуоренів з основними компонентами молока коров'ячого. Особливості впливу флуореніду та його метаболітів вивчено у системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9). Одержані дані важливі для пізнання лікувальної дії флуоренів, що перспективні як оригінальні субстанції для медицини і ветеринарії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: флуорени, флуоренід, метаболіти флуореніду, основні компоненти молока коров'ячого.

ВСТУП. Флуорени проявляють у дослідках *in vitro* та *in vivo* різносторонні біологічні ефекти, які значно перевищують активність відомих лікарських засобів, вибраних як еталони порівняння [10].

До флуоренів належить відомий український препарат “Флуоренід” (FI) протимікробної (протитуберкульозної, антихламідійної), імуномодуляційної та антиоксидної дій. Флуорени відкриті для наукової медицини й ветеринарії як новий клас протимікробних препаратів [1, 13].

Висока ефективність діючої речовини флуореніду при хламідіозі у великої рогатої худоби дозволяє замінити дорогі імпорتنі цефалоспори та тетрацикліни, антибіотики макроліди. На основі субстанції флуореніду створено антимікробний препарат “Хламідид” для лікування хламідіозу у великої рогатої худоби, який успішно застосовують в Україні з 1996 р. [2].

Для гуманної та ветеринарної медицини й фармації перспективна нова діюча речовина – натрієва сіль N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотиногідрозиду (FI-Na). Вона проявляє антимікробну дію, ефективна при лікуванні маститів у корів і безпечна для організму людини і тварин [12].

У науково-дослідній праці О. І. Михалик уперше йдеться про натрієву сіль як про перший можливий метаболіт флуореніду [8]. Одними з можливих метаболітів препарату є флуорен (дифеніленметан) і флуоренон-9 – ароматичний трициклічний кетон та ізоніазид (схема 1).

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

Встановлено, що флуоренон-9 ефективний щодо *Myc. tuberculosis hominis* типу H37Rv [7].

Флуорени малорозчинні у воді. Оптимальною для розчинення їх порошкових форм виявилась бінарна система розчинників (БСР), яка містить димексид і поліетиленгліколь-400 у співвідношенні 1:9. Ми дослідили, що розчини-комплекси [FI·ДМСО–ПЕГ-400] і [FI-Na·ДМСО–ПЕГ-400] мають антибактерійну дію. Вони ефективно діють на патогенні й умовно-патогенні грампозитивні та грамнегативні тест-штами і мікроорганізми, виділені з молока хворих тварин [9].

Основні компоненти молока – жири, білки, сухий знежирений молочний залишок (СЗМЗ) і густина, які стандартизовані в нормативних та законодавчих документах [11].

Метою даної роботи було дослідити *in vitro* вплив деяких флуоренів за нормальних умов на основні компоненти молока коров'ячого сирого.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Фармакотехнологічні методи досліджень молока коров'ячого сирого за допомогою аналізатора якості молока “Lactan 1-4 В” (свідоцтво про атестацію МВІ № 2420/ 230-00 від 21.08.2000). Методика визначення густини, масових часток жиру, білка, СЗМЗ і доданої води відповідає державному стандарту. Межа допустимої основної абсолютної похибки згідно з технічними характеристиками становить: для густини – 0,5 кг/м³; жиру – 0,1 %; білка – 0,15 %; СЗМЗ – 0,15 %; води доданої – 1 %; температури – 1 %. Зразки молока отримано з приватних господарств.

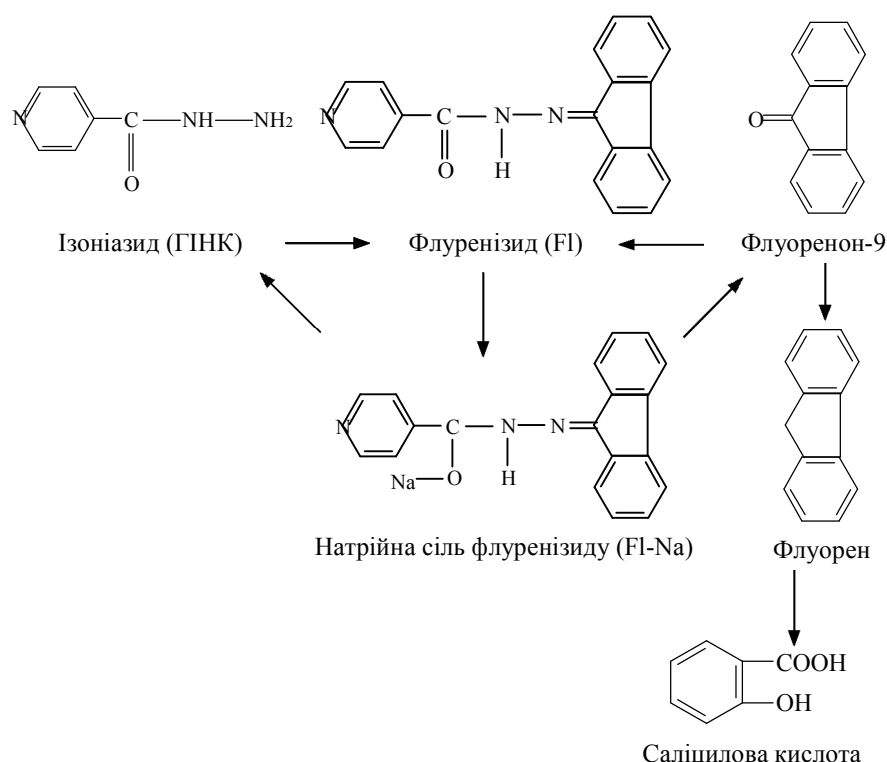


Схема 1. Метаболіти флуренізиду.

В експерименті використано субстанцію флуренізиду виробництва “Київський вітамінний завод”. FI-Na синтезовано в лабораторії (шифр МК-11) і отримано в промислових умовах на Львівському заводі “Реактив”. Для розчинення флуоренів використано димексид виробництва АТ “Галичфарм” і ПЕГ-400 фірми “Мерск” у співвідношенні 1:9. Полікомпонентні модельні біосистеми готували безпосередньо перед вимірюванням основних показників молока. Досліди проведено з дотриманням вимог Інструкції до експлуатації “Lactan 1-4 В” та Державної Фармакопеї України (розділ 2.2).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Похідні флуорену та ізоніазид, розчинені у бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9), активно взаємодіють за нормальних умов *in vitro* з основними компонентами молока.

Вплив флуоренів, ізоніазиду та бінарної системи розчинників на вміст жиру в молоці. У досліджуваних зразках молока вміст жиру становив у середньому 3,75 %. Експериментальні дані підтверджують, що БСР [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) в об’ємі 2,0 мл збільшувала вміст жиру на 2,02 % (табл. 1).

На тлі БСР розчинені у ній флуоренон-9, FI-Na (МК-11), FI-Na (“Реактив”) у рівних дозах майже однаково підвищували вміст жиру в молоці – на 0,40, 0,36, 0,39 % відповідно.

За результатами експерименту, взаємодія ізоніазиду з тригліцеридами та залишками жирних кислот слабша у 5,7 раза порівняно з флуоренами.

На відміну від флуоренону-9, FI-Na та ізоніазиду, незаміщений флуорен і лікарський засіб “Флуренізид” знижували вміст жиру в полікомпонентних модельних біосистемах – на

Таблиця 1 – Вміст жиру в молоці під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)

Полікомпонентна модельна система	Жир, %	А, %	В, %
Молоко	3,75		
Молоко+2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	5,77	2,02	
Молоко+0,1 г флуорену в 2,0 мл БСР	5,53	1,78	-0,24
Молоко+0,1 г FI в 2,0 мл БСР	5,64	1,89	-0,13
Молоко+0,1 г ізоніазиду в 2,0 мл БСР	5,84	2,09	0,07
Молоко+0,1 г флуоренону-9 в 2,0 мл БСР	6,17	2,42	0,40
Молоко+0,1 г FI-Na (МК-11) в 2,0 мл БСР	6,13	2,38	0,36
Молоко+0,1 г FI-Na (“Реактив”) в 2,0 мл БСР	6,16	2,41	0,39

Примітка. Наведено середні дані з п’яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; А – різниця, % [модельна біосистема мінус молоко]; В – різниця, % [модельна біосистема мінус 2,02].

-0,24 і -0,13 % відповідно (табл. 1). Ця відмінність є характерною для речовин, здатних сповільнювати процес пероксидної оксидзації ліпідів. Імовірно, флуорен і флуоренізид, віддаючи електрони і протони вільним радикалам, інактивують їх і цим протидіють розвитку реакцій оксидзації. Таким чином, ми отримали додаткові експериментальні дані, які підтверджують раніше опубліковані про антиоксидні властивості флуоренізида [5]. Флуорен (дифеніленметан) і флуоренізид, сповільнюючи процес пероксидної оксидзації ліпідів, проявляють виражену тенденцію до утримання полікомпонентних модельних біосистем у первинному стані.

Вплив флуоренів, ізоніазиду та бінарної системи розчинників на вміст білка в молоці. Білки молока – казеїн (2,5 %), лактоальбуміни (0,4 %) й лактоглобуліни (0,1 %), ферменти, протеази і пептони відіграють основну роль у формуванні та підтриманні структури і функцій живих організмів [4, 6].

У досліджуваних зразках молока вміст білка становив у середньому 2,78 %. Бінарна система розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) в об'ємі 2,0 мл збільшувала вміст білка на 3,35 % (полікомпонентна модельна біосистема № 2).

Вміст білка в молоці під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) наведено в таблиці 2.

Ми вперше встановили, що флуоренон-9, FI-Na (МК-11), FI-Na ("Реактив") у рівних дозах за нормальних умов збільшували вміст білка в молоці – на 3,83, 3,77, 3,92 % відповідно. Ці величини перевищували такі для [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) на 0,48, 0,42, 0,57 %.

За результатами експериментів, флуоренон-9, FI-Na (МК-11), FI-Na ("Реактив") активно взаємодіяли за нормальних умов *in vitro* з білками подібно до антибіотиків пеніцилінового ряду і макролідів еритроміцину.

Ізоніазид також збільшував вміст білків на 3,49 % і перевищував на 0,14 % результати дії БСР на природну біосистему № 2.

Флуорен і флуоренізид, розчинені в БСР, знижували вміст білка в молоці, відповідно, на -0,08 і -0,45 % порівняно з полікомпонентною модельною біосистемою № 2. Таким чином, флуорен (дифеніленметан) і флуоренізид, подібно до антибіотиків аміноглікозидів, інгібували синтез молочного білка.

Вплив флуоренів, ізоніазиду та бінарної системи розчинників на вміст СЗМЗ. У сухому залишку молока коров'ячого містяться 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 [3].

У досліджуваних зразках молока вміст СЗМЗ становив у середньому 8,51 %. Бінарна система розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) в об'ємі 2,0 мл збільшувала вміст СЗМЗ на 10,38 %.

Ізоніазид підвищував вміст СЗМЗ на 10,81 %, що на 0,43 % більше, ніж БСР.

Розчинені у БСР флуоренон-9, FI-Na (МК-11), FI-Na ("Реактив") у рівних дозах за нормальних умов збільшували вміст СЗМЗ, відповідно, на 11,90, 11,67, 12,16 %, що перевищувало дію бінарної системи розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) на 1,52, 1,29, 1,78 %.

Флуорен і флуоренізид, розчинені в БСР, знижували вміст СЗМЗ, порівняно з полікомпонентною модельною біосистемою № 2, на -0,49 і -1,41 % відповідно. Зміну вмісту СЗМЗ під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) подано в таблиці 3.

Вплив флуоренів, ізоніазиду та бінарної системи розчинників на густину молока. У досліджуваних зразках густина молока становила в середньому 1028,9 кг/м³.

Бінарна система розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9) в об'ємі 2,0 мл згущувала молоко на 37,10 кг/м³ (табл. 4).

Ізоніазид збільшував значення густини на 38,70 кг/м³, що перевищувало БСР на 1,6 кг/м³.

Таблиця 2 – Вміст білка в молоці під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)

Полікомпонентна модельна біосистема	Білок, %	A, %	B, %
Молоко	2,78		
Молоко+2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	6,13	3,35	
Молоко+0,1 г флуорену в 2,0 мл БСР	6,05	3,27	-0,08
Молоко+0,1 г FI в 2,0 мл БСР	5,68	2,90	-0,45
Молоко + 0,1 г ізоніазиду в 2,0 мл БСР	6,27	3,49	0,14
Молоко+0,1 г флуоренону-9 в 2,0 мл БСР	6,61	3,83	0,48
Молоко + 0,1 г FI-Na (МК-11) в 2,0 мл БСР	6,55	3,77	0,42
Молоко + 0,1 г FI-Na ("Реактив") в 2,0 мл БСР	6,70	3,92	0,57

Примітка. Наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; A – різниця, % [модельна біосистема мінус молоко]; B – різниця, % [полікомпонентна модельна біосистема мінус 3,35].

Таблиця 3 – **Вміст СЗМЗ під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)**

Полікомпонентна модельна біосистема	СЗМЗ, %	А, %	В, %
Молоко	8,51		
Молоко+2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	18,89	10,38	
Молоко+0,1 г флуорену в 2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400]	18,40	9,89	-0,49
Молоко+0,1 г FI в 2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	17,48	8,97	-1,41
Молоко+0,1 г ізоніазиду в 2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400]	19,32	10,81	0,43
Молоко+0,1 г флуоренону-9 в 2,0 мл БСР	20,41	11,90	1,52
Молоко+0,1 г FI-Na (МК-11) в 2,0 мл БСР	20,18	11,67	1,29
Молоко+0,1 г FI-Na ("Реактив") в 2,0 мл БСР	20,67	12,16	1,78

Примітка. Наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; А – різниця, % [модельна біосистема мінус молоко]; В – різниця, % [полікомпонентна модельна біосистема мінус 10,38].

Таблиця 4 – **Зміна густини молока під дією флуоренів та ізоніазиду в бінарній системі розчинників [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)**

Полікомпонентна модельна біосистема	Густина, кг/м³	А, %	В, %
Молоко	1028,90		
Молоко+2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	1066,00	37,10	
Молоко+0,1 г флуорену в 2,0 мл БСР	1064,43	35,53	-1,57
Молоко+0,1 г FI в 2,0 мл [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9)	1060,90	32,00	-5,10
Молоко+0,1 г ізоніазиду в 2,0 мл БСР	1067,60	38,70	1,60
Молоко+0,1 г флуоренону-9 в 2,0 мл БСР	1071,30	42,40	5,30
Молоко+0,1 г FI-Na (МК-11) в 2,0 мл БСР	1070,50	41,60	4,50
Молоко+0,1 г FI-Na ("Реактив") в 2,0 мл БСР	1072,30	43,40	6,30

Примітка. Наведено середні дані з п'яти визначень кожної з полікомпонентних модельних біосистем; А – різниця, % [модельна біосистема мінус молоко]; В – різниця, % [полікомпонентна модельна біосистема мінус 37,10].

Розчинені у БСР флуоренон-9, FI-Na (МК-11), FI-Na ("Реактив") у рівних дозах за нормальних умов згущували молоко, відповідно, на 42,40, 41,60, 43,40 кг/м³, більше, ніж комплекс [ДМСО–ПЕГ-400] (1:9).

Флуорен і флуоренізид, розчинені в бінарній системі розчинників, порівняно з полікомпонентною модельною біосистемою № 2, знижували густину молока, відповідно, на -1,57 і -5,1 кг/м³ (табл. 4).

Вплив флуоренів, ізоніазиду та бінарної системи розчинників на вміст води, доданої до молока. Для вивчення дії бінарної системи розчинників готували модельні суміші (20,0 мл молока сирого+5 мл води дестильованої) з вмістом 14,9 %.

Бінарна система розчинників включає апротонний диполярний диметилсульфоксид і гідрофільний неводний поліетиленгліколь-400. Встановлено, що 1,0 мл (ДМСО:ПЕГ-400) (1:9) зв'язує 14,9 % води, доданої до молока. Вплив флуоренів та ізоніазиду на вміст води, доданої до молока, нівелюється бінарною системою розчинників.

Особливості впливу флуоренів, зокрема флуоренізида та його метаболітів, вивчено в системі розчинників [ДМСО–ПЕГ] (1:9). Одержані дані важливі для пізнання різносторонніх лікувальних ефектів флуоренізида та нових флуоренів, що перспективні як оригінальні субстанції для медицини і ветеринарії.

ВИСНОВКИ. 1. Флуорени – флуоренізид та його метаболіти (флуорен, флуоренон-9, натрієва сіль N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотиногідрізида (FI-Na) та ізоніазид) активно і специфічно взаємодіють за нормальних умов *in vitro* з основними компонентами молока коров'ячого.

2. Флуорен (дифеніленметан) і флуоренізид сповільнюють процес пероксидної оксидзації ліпідів, проявляють виражену тенденцію до утримання полікомпонентних модельних біосистем у первинному стані.

3. Флуорен (дифеніленметан) і флуоренізид є інгібіторами синтезу білка.

4. Флуоренон-9 і натрієва сіль N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотиногідрізида (FI-Na) підвищують вміст масових часток жиру, білка і сухого залишку, згущують молоко.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Актуальність створення і впровадження у промислове виробництво нових лікарських засобів :

збірник описів винаходів / за ред. Л. І. Петрух, В. М. Петрух – Львів, ЛьвЦНТЕІ, 2003. – 198 с.

2. Антибактерійні препарати для лікування і профілактики інфекційних хвороб у тварин / Л. І. Петрух, О. І. Михалик, О. В. Пронюк, М. М. Коваленко // Міжнародна наук. конф. "Актуальні проблеми розвитку тваринництва". – Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. – Львів, 2003. – 5, № 3. – Ч. 1. – С. 110–117.

3. 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.

4. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.

5. Корда М. М. Вивчення антиоксидних властивостей флуоренизиду / М. М. Корда, Л. І. Петрух, І. В. Корда // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2000. – Вип. 5. – С. 502–505.

6. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1974. – 958 с.

7. Маслова Л. И. Синтез и превращения производных флуорена, обладающих биологической активностью : дисс. ... д-ра фармац. наук / Маслова Л. И. – Львов, 1989. – 450 с.

8. Михалик О. І. Розробка, дослідження і стандартизація твердої лікарської форми флуоренизиду : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармац. наук / О. І. Михалик. – Харків, 2003. – 19 с.

9. Панич О. П. Мікробіологічні дослідження нового фармакологічного засобу флупетцид / О. П. Панич, Л. І. Петрух, О. І. Михалик // Науково-технічний бюлетень. – Львів, 2005. – Вип. 6. – № 3, 4. – С. 285–288.

10. Петрух Л. І. Флуоренизид для ветеринарної практики / Л. І. Петрух // Міжнародна наук.-практ. конф. "Сучасні проблеми ветеринарної медицини, зооінженерії та технологій продуктів тваринництва" : зб. матер. – Львів, 1997. – С. 216–217.

11. Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини : Закон України № 2809-IV. – Київ, 06.09.2005.

12. Супозиторії хламідиду – ефективний препарат для лікування генітальних форм хламідіозу у корів / М. В. Косенко, Л. І. Петрух, І. К. Авдосьева [та ін.] // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2000. – № 22. – С. 35–36.

13. Флуорени – новий клас протимікробних препаратів : збірник МОЗ [І. Н. Безкопильний, О. А. Ткач, О. Ю. Андрейко та ін.]. – 2001.

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

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛУОРЕНОВ С ОСНОВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МОЛОКА

Резюме

Исследовано *in vitro* взаимодействие флуоренов с основными компонентами молока коровьего. Особенности влияния флуоренизида и его метаболитов изучено в системе растворителей [ДМСО–ПЕГ–400] (1:9). Полученные данные важны для изучения лечебного действия флуоренов, которые перспективны как оригинальные субстанции для медицины и ветеринарии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуорены, флуоренизид, метаболиты флуоренизида, основные компоненты молока коровьего.

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

INTERACTION OF FLUORENS AND BASIC MILK COMPONENTS

Summary

There was researched *in vitro* interaction of fluorens with basic milk components. Action of Flurenizyd and its metabolits was studied in system [DMSO–PEG–400] (1:9). The obtained data were important for study of treatment action of fluorens as original substances for medicine and veterinary.

KEY WORDS: fluorens, Flurenizyd, Flurenizyd metabolits, 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.

ВПЛИВ ПАРАЦЕТАМОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ НІТРИТІВ

Досліджено вплив парацетамолу на активність процесів ліпідної пероксидації і показники антиоксидантної системи на фоні тривалого введення натрію нітриту. Встановлено, що прогресування патологічного процесу в печінці супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення компенсаторних механізмів, особливо стану ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: парацетамол, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, гепатотоксичність, нітрити.

ВСТУП. Більшість захворювань супроводжується болем, отже, анальгетики, особливо ненаркотичні, становлять категорію ліків найбільш широкого використання. Парацетамол (ПА) – засіб, який широко застосовують у фармакотерапії, як самостійно, так і в складі комбінованих препаратів. Незважаючи на те, що його вважають досить безпечним, за останні 10 років накопичено велику кількість даних щодо токсичної дії ПА, і ця проблема для багатьох країн є досить актуальною. Так, отруєння АФ складають 5 % від загальної кількості інтоксикацій у США [12, 16], а за смертністю дітей внаслідок отруєння ПА, наприклад у 1995 р., він займає третє місце [11]. Аналогічні дані зареєстровані медиками Великої Британії, Франції та Австралії [9, 14, 15]. Причинами розвитку гострої печінкової недостатності є порушення метаболізму ПА внаслідок індукції цитохромів Р-450, перш за все ізоформи Р-450 2Е1, та активація монооксигеназ ендоплазматичного ретикулума печінки, що супроводжується зниженням її антиоксидантного статусу. Це спричиняє накопичення високореактивних метаболітів та активних форм кисню, здатних взаємодіяти з органелами клітин печінки, ініціюючи їх пошкодження і некроз [13].

Аналіз даних літератури свідчить про те, що не лише передозування ПА, але й застосування його в терапевтичних дозах протягом тривалого часу, використання хворими на діабет, гепатити різної етіології, алкоголізм, а також за умов незбалансованості харчування,

© Л. О. Пацкань, І. М. Кліщ, 2012.

тривалого контакту з хімічними сполуками органічного і неорганічного походження в промисловості та побуті призводять до гострого ураження печінки [13, 14].

Серед таких чинників важливе місце належить нітратам і нітратам. Проблема впливу нітратів на організм людини і тварин залишається актуальною у зв'язку з підвищенням вмісту нітросполук у навколишньому середовищі. Нітрати, що надходять в організм у великій кількості, викликають токсичний ефект, причому токсичними є не тільки самі нітрати, але й речовини, на які вони можуть перетворюватися (нітрити, нітрозаміни). У сучасних дослідженнях показано, що навіть набагато нижчі від встановлених гранично допустимих концентрації нітратів і нітритів можуть проявити виражену біологічну дію, здебільшого негативну [1]. Йдеться про так звані надфонові концентрації нітратів і нітритів. Поняття фонові концентрації нітрат-аніонів у питній воді істотно відрізняється для різних регіонів залежно від інтенсивності використання мінеральних добрив і ряду інших чинників. Для Подільського регіону звичайною вважають концентрацію нітратів у воді 30–50 мкмоль/л. Але нерідко спостерігається підвищення її до 0,1–0,15 ммоль/л. Ці значення в даному випадку і є надфоновими [2].

Як антидоти при отруєнні ПА використовують попередники біосинтезу глутатіону (метіонін, *N*-ацетилцистеїн). Але обмеженість термінів їх ефективності (10–12 год після отруєння) та реалізація детоксикуючої дії лише

в межах другої фази детоксикації є недоліком, що вимагає пошуку засобів, здатних проявляти поліфункціональні властивості: запобігати утворенню реактивних метаболітів, сприяти глутатіонозалежній кон'югації та проявляти антиоксидантну активність. Це дозволило б значно розширити спектр застосування ПА та зменшити прояви його побічної дії [9].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію при вільному доступі до води.

Токсичне ураження викликали шляхом дворазового внутрішньошлункового введення тваринам суспензії парацетамолу у 2 % розчині крохмалю в дозі 1250 мг/кг маси тіла ($1/2 LD_{50}$). Перед цим тваринам вводили натрію нітрит у дозі 25 мг/кг внутрішньошлунково протягом 7-ми діб.

Піддослідних щурів поділили на 3 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – уражені парацетамолом; 3-тя – уражені парацетамолом після попереднього введення натрію нітриту.

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю і 5-ту доби з моменту припинення ураження шляхом етаназії за умов тіопенталового наркозу. Всі експерименти на щурах проводили відповідно до Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [7].

Досліджували цільну кров, сироватку крові й гомогенат печінки. Концентрацію дієвих кон'югатів (ДК) визначали методом, описаним у роботі [4], ТБК-активних продуктів – за методикою [4], активність супероксиддисмутази (СОД) – за методикою [8], каталазну активність – за методикою [6], концентрацію церулоплазміну (ЦП) – за методикою [3]. Стан глутатіонові ланки антиоксидантної системи вивчали за активністю глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) [5] та вмістом відновленого глутатіону (Г-SH), який визначали згідно з методикою G. L. Ellman [10]. Кількісні показники обробляли статистично. Достовірність різниці між порівнюваними величинами визначали за t-критерієм Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані нами результати вказують на те, що інтоксикація тварин ацетамінофеном супроводжувалась активацією вільнорадикального окиснення ліпідів у сироватці крові та печінці щурів, про що свідчило достовірне збільшення вмісту ДК у сироватці крові та печінці протягом усього експерименту (табл.). Зокрема, на 1-шу добу

після останнього введення ПА вміст ДК у сироватці крові щурів 2-ї групи був у 2,1 раза більшим за аналогічний показник інтактних тварин. До 3-ї доби ми зафіксували незначне його зниження порівняно з 1-ю добою, однак показник перевищував норму в 1,9 раза. На 5-ту добу дослідження вміст ДК далі зростав і становив 225 % від рівня інтактних тварин. Подібні зміни було отримано і в печінці: збільшення, відповідно, в 1,3 раза на 1-шу, в 2,6 – на 3-тю і в 3,1 – на 5-ту доби після введення ПА. У печінці уражених тварин вміст ДК зростав аналогічно і становив на 1-шу добу 30 % від норми, на 3-тю і 5-ту – 264 і 307 % відповідно. Аналогічне зростання відмічено також щодо проміжного метаболіту ланцюга ліпідної пероксидації – малонового діальдегіду, який визначали у тесті з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти). У плазмі крові показник становив 148, 254, 285 % у відповідні терміни спостереження, що достовірно вище, ніж у нормі. Така ж тенденція зберігалась і в печінці.

У групі тварин, яким парацетамол вводили на фоні субхронічної інтоксикації натрію нітритом, ми зафіксували значно вищі показники інтенсивності ліпідної пероксидації на 1-шу і 3-тю доби дослідження. У плазмі крові щурів 3-ї групи показники ДК становили 235 і 253 % від норми в обрані нами терміни дослідження, що достовірно більше від інтактних тварин, а також щурів 2-ї групи. На 5-ту добу зафіксовано зниження вмісту ДК порівняно з тваринами 2-ї групи, однак він був достовірно вищим від рівня здорових щурів. Таку ж тенденцію відмічали і в печінці. Концентрація ТБК-активних продуктів у тварин 3-ї групи також зростала значно інтенсивніше, ніж у 2-й групі. Зокрема, у плазмі крові ми відмітили зростання у 2,3 раза на 1-шу добу, в 3,8 раза – на 3-тю і в 3,2 раза – на 5-ту доби дослідження. У печінці показник також становив 225, 284 і 266 % від норми. Причиною потенціювання токсичної дії парацетамолу нітритами, ймовірно, є пригнічення антиоксидантної системи внаслідок виснаження глутатіонові ланки, оскільки метаболізм нітритів здійснюється з участю відновленого глутатіону [1]. Тому наступним завданням було дослідження стану антиоксидантної системи як за токсичного ураження парацетамолом, так і після субхронічної нітритної інтоксикації. Отримані нами результати вказують на суттєві порушення в системі антиоксидантного захисту за умов токсичного ураження парацетамолом.

Активність СОД у крові та печінці за дії ПА становила на 1-шу добу 77 %, на 3-тю – 73 %, на 5-ту – 75 %, на 7-му – 78 %.

на 5-ту – 84 % від норми. У печінці спостерігались аналогічні зміни. Зменшення активності СОД, імовірно, є ознакою пригнічення синтезу ферменту. Ще більше зниження ми зафіксували після інтоксикації ПА після попереднього введення нітритів. У плазмі крові ензимна активність зменшувалась на 1-шу добу в 1,5 раза, на 3-тю – в 1,7 раза і до 5-ї доби залишалась на цьому ж рівні. Ще більших змін зазнавала супероксиддисмутаза активність у печінці: зниження на 1-шу добу в 2,3 раза, на 3-тю – в 2,7 раза, на 5-ту – в 2,6 раза. Зміни були достовірними відносно інтактних і тварин 2-ї групи. Поряд з основною причиною, тобто різким пригніченням процесів транскрипції і трансляції в гепатоцитах, вагомим чинником інгібування активності СОД під впливом ПА після попереднього введення натрію нітриту може бути надмірне збільшення у клітинах концентрації синглетного кисню, пероксиду водню, гідроксильних радикалів, гідропероксидів, що призводить до незворотного відновлення міді в активному центрі

ферменту або ж окиснення в ньому деяких функціональних груп, зокрема тіолових.

Для забезпечення повноцінної захисної функції СОД необхідні механізми, які б знешкоджували пероксид гідрогену, оскільки акумуляція H_2O_2 в клітині значно інгібує даний фермент. Каталізує реакцію розкладання пероксиду гідрогену до води і, таким чином, разом із СОД ще на стадії зародження блокує ланцюг пероксидного окиснення фермент каталаза. У групі щурів, яким моделювали гостре отруєння ацетамінофеном, спостерігали достовірне зниження активності каталази у крові: в 1,5 раза – на 1-шу, в 2,2 раза – на 3-тю і у 2 рази – на 5-ту доби дослідження. При попередньому введенні нітритів відмічали значно більше пригнічення ензимної активності у крові – показник становив 28, 31 і 37 % від рівня здорових тварин. Каталазна активність у печінці також достовірно знижувалась, причому більш виражено в щурів 3-ї групи з максимумом на 3-тю добу (показник склав 35 % від норми).

Таблиця – Показники активності ліпідної пероксидації і стану антиоксидантної системи білих щурів за умов гострого токсичного ураження ацетамінофеном та при попередньому введенні натрію нітриту ($M \pm m$)

Показник	Досліджуваний аналіт	Група тварин						
		інтактні, n=8	уражені парацетамолом			парацетамол після семиденного введення натрію нітриту		
			1-ша доба, n=6	3-тя доба, n=6	5-та доба, n=6	1-ша доба, n=6	3-тя доба, n=6	5-та доба, n=6
ДК, $\cdot 10^3$ ум. од./л	Сироватка крові	2,04 $\pm$ 0,04	4,29 $\pm$ 0,38*	3,99 $\pm$ 0,15*	4,59 $\pm$ 0,49*	4,79 $\pm$ 0,14	5,17 $\pm$ 0,07**	4,39 $\pm$ 0,04
ДК, $\cdot 10^3$ ум. од./кг	Гомогенат печінки	0,86 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,06*	2,27 $\pm$ 0,02*	2,64 $\pm$ 0,03*	1,61 $\pm$ 0,03**	2,39 $\pm$ 0,032**	2,43 $\pm$ 0,33
ТБК-активні продукти, мкмоль/л	Плазма крові	4,75 $\pm$ 0,14	7,05 $\pm$ 0,31*	12,05 $\pm$ 0,58*	13,54 $\pm$ 0,68*	10,72 $\pm$ 0,78**	17,94 $\pm$ 0,63**	14,89 $\pm$ 0,46
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг	Гомогенат печінки	1,16 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,20*	2,95 $\pm$ 0,34*	2,34 $\pm$ 0,09*	2,61 $\pm$ 0,17**	3,29 $\pm$ 0,03	3,08 $\pm$ 0,08**
СОД, ум. од./л	Кров	0,62 $\pm$ 0,006	0,48 $\pm$ 0,005*	0,45 $\pm$ 0,005*	0,52 $\pm$ 0,007*	0,41 $\pm$ 0,005**	0,36 $\pm$ 0,005**	0,45 $\pm$ 0,013**
СОД, ум. од./кг	Гомогенат печінки	3,88 $\pm$ 0,2	3,36 $\pm$ 0,16	2,82 $\pm$ 0,14*	2,97 $\pm$ 0,24*	1,69 $\pm$ 0,24**	1,43 $\pm$ 0,07**	1,49 $\pm$ 0,06**
Каталаза, мкат/л	Кров	0,153 $\pm$ 0,011	0,103 $\pm$ 0,005*	0,069 $\pm$ 0,004*	0,075 $\pm$ 0,007*	0,043 $\pm$ 0,008**	0,048 $\pm$ 0,006**	0,057 $\pm$ 0,005
Каталаза, мкат/кг	Гомогенат печінки	5,79 $\pm$ 0,23	4,68 $\pm$ 0,24*	3,1 $\pm$ 0,18*	3,22 $\pm$ 0,27*	2,72 $\pm$ 0,37**	2,01 $\pm$ 0,19**	2,82 $\pm$ 0,16
Церулоплазмін, мг/л	Плазма крові	246,4 $\pm$ 5,6	183,9 $\pm$ 10,7*	138,9 $\pm$ 15*	143,3 $\pm$ 6,9*	156,2 $\pm$ 6**	123,7 $\pm$ 2,1	130,4 $\pm$ 5,3
ГП, ммоль/(хв·кг)	Гомогенат печінки	1,036 $\pm$ 0,015	0,996 $\pm$ 0,025	0,694 $\pm$ 0,027*	0,452 $\pm$ 0,025*	0,71 $\pm$ 0,018**	0,513 $\pm$ 0,008**	0,407 $\pm$ 0,009
ГР, ммоль/(хв·кг)	Гомогенат печінки	13,15 $\pm$ 0,41	10,2 $\pm$ 0,51*	7,51 $\pm$ 0,74*	3,72 $\pm$ 0,16*	7,05 $\pm$ 0,38**	4,58 $\pm$ 0,12**	2,51 $\pm$ 0,24**
ВГ, ммоль/кг	Гомогенат печінки	3,99 $\pm$ 0,15	3,35 $\pm$ 0,14*	3,04 $\pm$ 0,21*	1,9 $\pm$ 0,18*	2,91 $\pm$ 0,04**	2,48 $\pm$ 0,03**	1,72 $\pm$ 0,007

Примітка. * – різниця достовірна відносно інтактних тварин; ** – різниця достовірна відносно тварин, уражених парацетамолом.

Важлива роль у знешкодженні супер-оксиданіонрадикалів у плазмі крові належить ЦП, вміст якого протягом усього експерименту знижувався. У плазмі крові щурів 3-ї групи показник становив 63, 50 і 53 % від рівня здорових тварин, достовірно відрізняючись від нього.

Останньою ланкою захисту клітин від переокищення є система глутатіону, яка включає ферменти ГП та ГР, а також неферментний компонент – Г-SH. За дії ацетамінофену активність ГП зменшувалась відносно контрольних тварин і до 5-ї доби складала 44 % від норми. Попереднє введення натрію нітриту спричинило ще більше зниження глутатіонпероксидазної активності вже з 1-ї доби після завершення токсичної дії патогенних чинників. Показник становив 69 % від норми проти 97 % у тварин, в яких парацетамолове ураження моделювали без попереднього введення натрію нітриту. Спостерігали також зниження ГР протягом усього експерименту, причому попереднє введення нітритів призвело до більш виражених змін цього показника, і до 5-ї доби він становив лише 19 % від норми, що достовірно менше, ніж у тварин 2-ї групи. Зважаючи на ці зміни, логічним є також отримане нами зменшення концентрації Г-SH. При гострому ураженні ПА показник становив 84, 76 і 48 % від норми у відповідні терміни дослідження, а за попереднього введення натрію нітриту він ще більше знижувався і складав 73, 62 і 43 % від рівня інтактних тварин. За даними ряду авторів, головною причиною пригнічення активності ГП

і ГР при токсичному ураженні печінки є порушення синтезу їх апоферментів внаслідок деструктивної дії ксенобіотиків на мембрани ендоплазматичної сітки і рибосоми [14]. Зменшення вмісту Г-SH за умов парацетамолового гепатиту також може бути наслідком порушення його синтезу з метіоніну в печінці. Відомо, що процеси біосинтезу цистеїну з метіоніну і глутатіону з цистеїну, а також утворення НАДФ•Н, глюкозо-6-фосфату, біологічно активних сполук двовалентного селену та інших субстратів, необхідних для функціонування ГП і ГР, є АТФ-залежними. А беручи до уваги отримані рядом авторів дані, що під впливом парацетамолу значно порушуються біоенергетичні процеси і зменшується вміст АТФ у печінці, правомірно вважати, що порушення мітохондріального окиснення відіграє суттєву роль у механізмах пригнічення системи глутатіонпероксидази.

Аналізуючи отримані результати, можна констатувати, що попереднє введення натрію нітриту в субтоксичній дозі призводить до більш виражених змін вільнорадикального окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту, ніж гостре отруєння парацетамолом.

ВИСНОВОК. Гостре отруєння парацетамолом після семиденного введення натрію нітриту в субтоксичній дозі призводить до вираженої активації процесів ліпопероксидації на фоні пригнічення ферментної і неферментної ланок антиоксидантної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажипа Я. И. Экономические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами / Я. И. Ажипа, В. П. Реутов, Л. П. Каюшин // Физиология человека. – 1990. – **16**, № 3. – С. 131–149.
2. Беспамятнов Г. П. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде : справочник / Г. П. Беспамятнов, Ю. А. Кротов. – Л. : Химия, 1985. – 528 с.
3. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – М. : Минск, 1982. – 311 с.
4. Колесова О. Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
5. Кругликова Г. О. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію / Г. О. Кругликова,

- Ц. М. Штутман // Укр. біохім. журн. – 1976. – **48**, № 2. – С. 227–233.
6. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
7. 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.
8. Чевари С. Роль супероксидредуктазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
9. Acetaminophen induced hepatotoxicity / S. D. Cohen, D. J. Hoivik, E. A. Khairallah // Toxicology of the Liver. – Raven Press, New York, 1998. – P. 159–186.
10. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.

11. Hanzlick R. National Association of Medical Examiners Pediatric Toxicology (PedTox) Registry Report 3. Case submission summary and data for acetaminophen, benzene, carboxyhemoglobin, dextromethorphan, ethanol, phenobarbital, and pseudoephedrine / R. Hanzlick // Am. J. Forensic Med. Pathol. – 1995. – **16**(4). – P. 270–277.
12. Lee W. M. Acute liver failure / W. M. Lee // Clinical Perspectives in Gastroenterology. – 2001. – P. 101–110.
13. Lieber C. S. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role / C. S. Lieber // Physiological reviews. – 1997. – **77**, № 2. – P. 518–544.
14. Major upper gastrointestinal tract bleeding relation to the use of aspirin and other nonnarcotic analgesics / M. Levy, D. R. Miller, D. W. Kaufman, [et al.] // Arch. Intern. Med. – 1988. – **148**. – P. 281–285.
15. Outcome of acetaminophen-induced liver failure in the USA in suicidal vs accidental overdose: Preliminary results of a prospective multi-center trial / A. M. Larson, G. Ostapowicz, R. J. Fontana [et al.] // Hepatology. – 2000. – **32**(4 pt 2). – P. 396.
16. Slone Epidemiology Unit. Prepared for McNeil Consumer Healthcare. Analgesic use in the adult population of the United States: Acetaminophen, aspirin, ibuprofen and naproxen. Results of a population-based telephone survey, 1998-2001. Report on file, 2001.

Л. А. Пацкань, И. Н. Клищ

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВЛИЯНИЕ ПАРАЦЕТАМОЛА НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НИТРИТОВ

Резюме

Исследовано влияние парацетамола на фоне длительного введения натрия нитрита на активность процессов липидной пероксидации и показатели антиоксидантной системы. Установлено, что прогрессирование патологического процесса в печени сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, влечет существенное нарушение компенсаторных механизмов, особенно состояния ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: парацетамол, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, гепатотоксичность, нитриты.

L. O. Patskan, I. M. Klishch

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE IMPACT OF PARACETAMOL ON THE LIPID PEROXIDATION ACTIVITY PROCESSES AND ON THE STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM OF THE RATS ON THE BACKGROUND OF PROLONGED USE OF NITRITE

Summary

The influence of paracetamol on a lipid peroxidation activity processes and antioxidant system parameters on the background of prolonged use of sodium nitrite were investigated. Also there was found that the progression of the pathological process in the liver accompanied by intensification of free radical oxidation, wich causing a deviation of compensatory mechanisms, especially the state of fermental and nonfermental links of the antioxidant system.

KEY WORDS: paracetamol, lipid peroxidation, antioxidant system, hepatotoxicity, nitrites.

Отримано 23.03.12

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**ВИЗНАЧЕННЯ ЛОВАСТАТИНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Доступний, простий, чутливий і швидкий метод було розроблено для визначення концентрації ловастатину (препарату групи гіпохолестеринемічних засобів, інгібітора 3-гідрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктази) в плазмі крові людини методом вискоелективного рідинної хроматографії. Аналітична процедура включає в себе однофазну рідинну екстракцію в ацетонітрил. Хроматографічне розділення проводили на колонці розміром 125х4,0 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS-C18 з розміром гранул 5 мкм. Для захисту колонки використовували передколонку розміром 12,5х4 мм, яка була заповнена такою ж насадкою. Застосовано ізократичне елюювання мобільною фазою, що складалась (за об'ємом) із 40 % 0,04 М фосфатного буфера (рН=4,0) та 60 % ацетонітрилу. Швидкість елюювання – 1 мл/хв. УФ-детектування відбувалося при довжині хвилі 237 нм. Загальний час виконання аналізу складав 10 хв при часі утримання ловастатину 6,5 хв. Було проведено повний набір аналітичних тестів з метою перевірки адекватності методу. Спостерігалася лінійна залежність між площею хроматографічного піку та вмістом ловастатину в сироватці у діапазоні концентрацій 10–500 нг/мл. Межа детектування і межа кількісного визначення для ловастатину становили 7 та 10 нг/мл відповідно. Внутрішньосерійна точність визначення складала (7,12±4,88) %, міжсерійна точність визначення – (10,48±6,38) %. Середня відносна повнота визначення ловастатину в людській плазмі становила (98,6±1,4) %. Метод випробуваний при проведенні фармакокінетичних досліджень на 4 здорових чоловіках-добровольцях.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ловастатин, вискоелективна рідинна хроматографія, фармакокінетика.

ВСТУП. Ловастатин є вискоелективним препаратом для зниження концентрації холестерину в крові, належить до класу найпотужніших гіполіпідемічних агентів, які зазвичай називають статинами, є конкурентним інгібітором ферменту 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА (HMG-CoA) редуктази [4]. Ловастатин помітно знижує летальність при коронарній хворобі серця [3]. Концентрація ловастатину в плазмі крові дуже низька, що зумовлено його швидким метаболізмом у печінці [1]. Описано низку методів кількісного визначення ловастатину в плазмі крові, але вони потребують використання доволі дорогого обладнання, такого, як газові або рідинні хроматографи з мас-спектрометричними детекторами [5, 7], або застосування спеціальних патронів для твердофазної екстракції [6]. На даний час фактично відсутній простий та дешевий метод визначення ловастатину в плазмі крові. Власне метою цього дослідження була розробка швидкого і відносно дешевого аналітичного методу, оснований на ВЕРХ з УФ-детектуванням ловастатину в плазмі крові людини, призначеного для проведення фармакокінетичних досліджень.

© Я. П. Вербіловський, О. В. Ільченко, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В роботі використано ловастатин (торг. назва Mevinolin, SIGMA-ALDRICH). Випробувано таблетки "Ловастатин", виготовлені в "Лекфарм" (РФ) та придбані в місцевій аптеці.

Калібрувальні стандарти готували шляхом розчинення ловастатину в етанолі, зокрема для вихідного розчину 5 мг ловастатину було розчинено в 5 мл етанолу. В подальшому вихідний розчин розводили етанолом до концентрацій 200, 500 нг/мл, 1, 2, 5, 10 мкг/мл. Зразки для дослідження готували шляхом додавання відповідної кількості розчинів ловастатину до плазми крові.

Пробопідготовка полягала в додаванні до 0,2 мл плазми крові 0,02 мл 1 н розчину соляної кислоти та 0,6 мл ацетонітрилу. Після енергійного струшування протягом 15 с пробу центрифугували при 1000 об./хв упродовж 15 хв.

Верхній рідкий шар відбирали та фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45 мкм. 20 мкл фільтрату вводили у хроматографічну колонку.

Кількісне визначення ловастатину проводили на вискоелективному рідинному хроматографі HP-1100 "Leonardo" на колонці

розміром 125x4,0 мм, заповнений твердою фазою Hypersil BDS-C18 з розміром гранул 5 мкм. Для захисту колонки використовували передколонку розміром 12,5x4 мм, яка була заповнена такою ж насадкою. Застосовано ізократичне елюювання мобільною фазою, що складалась (за об'ємом) із 40 % 0,04 М фосфатного буфера (pH=4,0) та 60 % ацетонітрилу. Швидкість елюювання – 1 мл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування ловастатину проводили при довжині хвилі 237 нм.

Лінійність оцінювали за допомогою свіжих зразків плазми з додаванням відповідної кількості стандартних розчинів ловастатину, на яких було побудовано калібрувальну криву. Використано 6 ненульових стандартних точок з концентраціями в межах від 10 до 500 нг/мл (10, 25, 50, 100, 200, 500 нг/мл), а також зразок плазми крові без додавання ловастатину (нульова проба). Зразки було оброблено за описаною процедурою і проаналізовано за відношенням площі піку ловастатину, що міститься в пробі, до площі піку ловастатину в зовнішньому стандарті (зазвичай розчин ловастатину в етанолі – 200 нг/мл) та номінальною концентрацією ловастатину в зразках (змінні Y і X в стандартному регресійному аналізі). Досліджено послідовне зменшення частки ловастатину в сигналі, причому як межу детектування методу було взято концентрацію ловастатину, яка забезпечувала співвідношення сигнал-шум 4. Межу кількісного визначення встановлювали як мінімальну концентрацію, яку можна виміряти з відносним стандартним відхиленням, що не перевищує 0,2.

Для визначення внутрішньосерійної та міжсерійної точності приготовлено 3 різних групи зразків з концентраціями ловастатину 50, 200 і 500 нг/мл. Ці групи було проаналізовано як послідовно, при одному запуску хроматографа (внутрішньосерійно), так і при запусках хроматографа, що відбувалися в різні дні (міжсерійно). Точність розраховували з огляду на відношення виміряної концентрації до номінальної концентрації. Варіацію оцінювали шляхом розрахунку коефіцієнта варіації для внутрішньосерійних і міжсерійних визначень для кожної групи зразків.

Для оцінки вилучення ловастатину з плазми 3 серії зразків із концентраціями ловастатину 50, 200 і 500 нг/мл підготовлено в 2-х середовищах: у плазмі крові людини і дистильованій воді. Всі зразки було оброблено, як описано, і ступінь вилучення визначали як відношення площ піків у плазмі й воді.

Дослідження біоеквівалентності. Щоб оцінити практичну застосовність розробленого

методу, ми використали його з метою визначення ловастатину в плазмі крові. Для цього четверо здорових чоловіків-добровольців віком 40–50 років, масою 76–90 кг отримали по 80 мг препарату у вигляді таблеток. Таблетки приймали зранку натще з 200 мл води. Через 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 год після приймання відбирали кров у кількості 2–3 мл в пробірки з EDTA. Зразки крові центрифугували при 2000 g протягом 10 хв, відокремлену плазму зберігали при температурі -20 °С не більше двох діб.

Фармакокінетичний аналіз. Фармакокінетичні параметри розраховували за двочастинною моделлю із всмоктуванням методами обчислювальної математики. Критерієм оптимізації була мінімізація суми відносних відхилень розрахованої кривої від експериментальних точок.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Основою при розробці методу були зменшення вартості аналізу та зниження втрат речовини під час процесів екстрагування–реекстрагування. Цього досягнуто завдяки заміні міжфазної екстракції у двофазних системах (рідинна екстракція або екстракція в твердофазному патроні) на однофазну екстракцію в ацетонітрил. Завдяки здатності ацетонітрилу ефективно осаджувати білок, його застосування виключає процеси екстрагування, видалення розчинника, реелюювання. Тому втрати ловастатину під час пробопідготовки практично відсутні. Перевагами методу є доступні прилади та реагенти, проста і швидка процедура пробопідготовки, що складається з одного кроку, достатня для більшості фармакокінетичних досліджень, достатня точність. Але внаслідок розведення знижується концентрація ловастатину в рідині, яку вводять у хроматографічну колонку, що зменшує чутливість методу.

Методика дозволяла отримувати результати з високим ступенем лінійності в діапазоні концентрацій 10–500 нг/мл. Типовим було рівняння регресії результатів методу: $Y=0,00497 \cdot X+0,00691$ ($R^2=0,997$, $n=6$).

Для дослідження специфічності методу було досліджено серію зразків плазм людської крові, які не містили ловастатин (усього 6 різних зразків). Виявлено, що на хроматограмах у час, коли очікували виходу ловастатину, не спостерігалось будь-яких піків, викликаних появою метаболітів.

Коефіцієнт варіації при внутрішньосерійному визначенні складав ($7,12 \pm 4,88$) %, при міжсерійному визначенні – ($10,48 \pm 6,38$) %. Межа детектування і межа кількісного визначення методу для ловастатину становила 7 і

10 нг/мл відповідно. Ці величини демонструють прийнятну чутливість методу для аналізу лікарської речовини.

З використанням розробленого методу було проведено фармакокінетичні дослідження, які полягали у визначенні ловастатину в зразках плазми 4 добровольців, які перорально прийняли по 4 таблетки ловастатину (80 мг). Рівняння залежності концентрації препарату C (нг/мл) від часу t (хв) мало вигляд: $C = 224,2 \cdot \exp(-0,00785 \cdot t) + 0,00909 \cdot \exp(-0,00794 \cdot t) - 224,2 \cdot \exp(-0,00909 \cdot t)$. На основі коефіцієнтів цього рівняння можна легко розрахувати фармакокінетичні параметри ловастатину [2].

ВИСНОВКИ. Запропоновано простий, селективний та достатньо чутливий метод визначення ловастатину в плазмі крові людини ВЕРХ-УФ методом з однофазною рідинною екстракцією. Через низьку ціну і короткий час пробопідготовки цей метод підходить для рутинних аналітичних досліджень. Метод був апробований і показав прийнятну лінійність результатів, точність і повноту визначення. Метод успішно застосовано для визначення фармакокінетики ловастатину в організмі людини. Одержані результати відповідають результатам, одержаним іншими авторами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России / ред. Е. А. Толмачева. – 17-е изд. – М.: АстраФармСервис, 2011. – 1728 с.
2. Холодов Л. Е. Клиническая фармакокинетика / Л. Е. Холодов, В. П. Яковлев. – М.: Медицина, 1985. – 464 с.
3. Cholesterol-lowering effect of mevinolin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, in healthy volunteers / J. A. Tobert, G. D. Bell, J. Birtwell [et al.] // J. Clin. Invest. – 1982. – **69**, № 4. – P. 913–919.
4. Crouch M. A. Effective use of statins to prevent coronary heart disease / M. A. Crouch // Am. Fam. Physician. – 2001. – **63**, № 2. – P. 309–320; 323–324.
5. Determination of simvastatin in human plasma by high performance liquid chromatography / L. Tan, L. L. Yang, X. Zhang [et al.] // Se Pu. – 2000. – **18**, № 3. – P. 232–234.
6. Ye L. Y. Determination of lovastatin in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography with UV detection / L. Y. Ye, P. S. Firby, M. J. Moore // Ther. Drug. Monit. – 2000. – **22**, № 6. – P. 737–741.
7. Zhu Z. High-performance liquid chromatography coupled with negative ion tandem mass spectrometry for determination of pravastatin in human plasma / Z. Zhu, L. Neirinck // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. – 2003. – **783**, № 1. – P. 133–140.

Я. П. Вербиловский, А. В. Ильченко

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОВАСТАТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Доступный, простой, чувствительный и быстрый метод был разработан для определения концентрации ловастатина (препарата группы гипохолестеринемических средств, ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктазы) в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Аналитическая процедура включает в себя однофазную жидкостную экстракцию в ацетонитрил. Хроматографическое разделение проводили на колонке размером 125х4,0 мм, заполненной твердой фазой Hypersil BDS-C18 с размером гранул 5 мкм. Для защиты колонки использовали предколонку размером 12,5х4 мм, заполненную той же насадкой. Применено изократическое элюирование мобильной фазой, состоящей (по объему) из 40 % 0,04 М фосфатного буфера (pH=4,0) и 60 % ацетонитрила. Скорость элюирования – 1 мл/мин. УФ-детектирование проходило при длине волны 237 нм. Общее время выполнения анализа составляло 10 мин при времени выхода ловастатина 6,5 мин. Был проведен полный набор аналитических тестов с целью проверки адекватности метода. Наблюдалась линейная зависимость между площадью хроматографического пика и содержанием ловастатина в плазме в интервале концентраций 10–

500 нг/мл. Граница детектирования и граница количественного определения для ловастатина составляли 7 и 10 нг/мл соответственно. Внутрисерийная точность определения составляла $(7,12 \pm 4,88) \%$, межсерийная точность определения – $(10,48 \pm 6,38) \%$. Средняя относительная полнота определения составляла $(98,6 \pm 1,4) \%$. Метод испытан при проведении фармакокинетических исследований на 4 здоровых мужчинах-добровольцах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ловастатин, высокоэффективная жидкостная хроматография, фармакокинетика.

Ya. P. Verbilovskyi, O. V. Il'chenko
M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF LOVASTATIN IN PLASMA

Summary

An available, simple, sensitive, and rapid method was developed for determination of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitor, lovastatin in human plasma. The analytical procedure involves a one-step liquid-liquid extraction method. Chromatographic separation was carried out on a reversed phase C18 column using a mixture of 0,04 M phosphate buffer (pH 4) and acetonitrile (40 : 60, v/v) as mobile phase with UV detection set at 237 nm. The total run time of analysis was 10 min with the retention time of lovastatin being 6,5 min. A complete set of analytical method validation tests were carried out on the method. Accordingly, the method was linear in the wide range of 10–500 ng/ml. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for lovastatin were 7 and 10 ng/ml, respectively. The method was shown to be precise with average within-run and between-run variations of $(7,12 \pm 4,88)$ and $(10,48 \pm 6,38) \%$, respectively. The mean relative recovery of lovastatin from human plasma by the developed method was $(98,6 \pm 1,4) \%$. The applicability of the method in real pharmacokinetic situations was evaluated successfully during a bioequivalence study in 4 fasting healthy male volunteers.

KEY WORDS: lovastatin, HPLC, high performance liquid chromatography, pharmacokinetics.

Отримано 21.10.11

Адреса для листування: О. В. Ільченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна, e-mail: a.il@i.ua

АНТИТОКСИЧНИЙ ФЕНОМЕН КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОГО КСЕНОДЕРМАЛЬНОГО СУБСТРАТУ

Антитоксичну спроможність подрібненого субстрату кріоліофілізованої ксеношкіри розглядають за критерієм резистентності еритроцитарних мембран у гемолітичній тест-системі як прояв адсорбційної властивості її часточок та аналізують з позицій перспективності для вирішення актуальних завдань керованої регенерації тканин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріоліофілізована ксеношкіра, подрібнений ксенодермальний субстрат, гемолітична тест-система, резистентність еритроцитарних мембран.

ВСТУП. Практика застосування в Україні ксеноімплантатів для місцевого лікування опечених хворих постійно поповнюється новими позитивними ефектами, що ставить на порядок денний завдання вивчення ініціальних механізмів впливу ксеногенної шкіри на процеси тканинної регенерації. Засіб медичного призначення – ксенодермальний імплантат, виготовлений із шкіри свині за технологією кріоконсервування в рідкому азоті з наступною ліофілізацією, забезпечує низку біологічних ефектів, системний характер яких вимагає поглибленого аналізу [1, 3, 7]. Так, притаманний ксеношкірі високий окисно-відновний потенціал, пов'язаний із вмістом сірковмісних амінокислот цистеїну і метіоніну, окиснювальних ферментів, наприклад пероксидази, цитохромоксидази тощо, нівелює первинні механізми взаємодії ксеноімплантата з молекулами токсичних продуктів опеченого організму, попри те, що саме вказані механізми є визначальними в розвитку наступних системних реакцій адаптивного спрямування. З огляду на наведені міркування, аналіз фізико-хімічного підґрунтя антитоксичного ефекту ксеноімплантата набуває особливого значення як для розуміння його природи, так і для подальшої розробки методичних підходів до його направленої корекції [4].

Метою даної роботи було дослідити антитоксичну здатність ксенодермального субстрату за тестом на резистентність мембран еритроцитів і вивчити взаємозв'язок антитоксичного ефекту ксенодермального субстрату з його адсорбційною спроможністю.

© А. В. Цимбалюк, 2012.

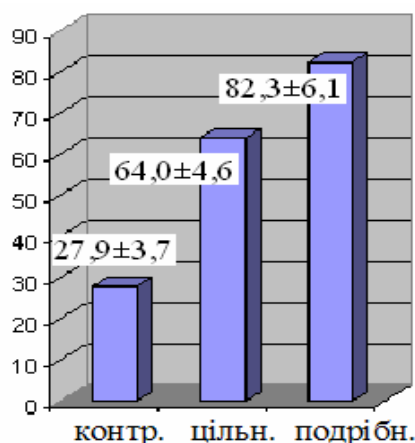
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Адсорбційну здатність субстрату ксеногенної шкіри вивчали за впливом на резистентність мембран еритроцитів у реакції кислотного гемолізу. За основу вказаного методичного підходу взяли властивість клітинних мембран руйнуватися під впливом соляної кислоти у вигляді гемолізу, кінетика якого істотно залежить від вихідного рівня мембранної резистентності, який реєструють фотометричним способом за зміною екстинкції суміші внаслідок вивільнення внутрішньоклітинного гемоглобіну з утворенням солянокислого гематину. Індукований кислотою гемоліз *in vitro* відображає ініціальні механізми мембранної резистентності конкретно взятої клітинної тест-системи. Внесення до неї додаткового модулятора гемолізу, зокрема токсичної гіперметаболізованої плазми донорської крові (ГМП), позначається прискоренням гемолітичного процесу, що в цілому достатньо коректно відображає функціональний стан мембранопротекторної спроможності ізолюваних клітин крові, з одного боку, характеризуючи при цьому мембранотропний вплив будь-якого іншого чинника з властивістю стабілізатора або деструктора цитомембранної резистентності – з іншого.

Конкретно тестову пробу ставили таким чином. Гемолітичною системою слугував робочий розчин нативної крові пацієнта на ізотонічному розчині натрію хлориду в розведенні 1:100 з наступною стандартизацією до рівня 0,70 за оптичною густиною при червоному світлофільтрі. Як додатковий модулятор – індуктор гемолізу використовували ГМП крові донора, попередньо витриману у відкритому

флакони при 37 °С впродовж 2 діб. Окремо готували дослідні проби адсорбенту у вигляді рівних за масою цільних клаптиків і подрібненого субстрату (20 мг).

Кислотні еритрограми визначали таким чином. До 2,5 мл робочого розчину крові у пробірці додавали 100 мкл водного екстракту ГМП, перемішували і вносили дослідні проби адсорбенту: в одній серії – у вигляді цільних клаптиків ксеношкіри масою 20 мг, в іншій – по 20 мг подрібненого ксенодермального субстрату. Після інкубації впродовж 45 хв обережно мікропіпеткою переносили по 2,0 мл отриманого інкубату до вимірювальної кювети, додавали стандартний індуктор гемолізу у вигляді 2 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л соляної кислоти на ізотонічному розчині натрію хлориду, після чого зміни екстинкції гемолітичної системи реєстрували фотометричним способом на самописці [5, 9], а мембранопротекторний ефект ксенодермального субстрату оцінювали програмним способом за індексом резистентності еритроцитарних мембран [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті дослідження встановлено, що антитоксична здатність подрібненого субстрату ксеношкіри істотно перевищує аналогічну цільного клаптя. Так, якщо індекс резистентності інкубованих в токсичній плазмі еритроцитів у контролі складав $27,9 \pm 3,7$ (100 %), то при попередній інкубації в ній цільної ксеношкіри та подрібненого субстрату ксеношкіри досягав рівня $64,0 \pm 4,6$ (229 %) та $82,3 \pm 6,1$ (295 %) відповідно ($p < 0,05$). Наведені на діаграмі отримані результати наглядно демонструють значно вищу (на 28,6 %) адсорбційну здатність подрібненого субстрату порівняно з аналогічною властивістю цільного клаптя ($p < 0,05$).



Діаграма. Порівняльна характеристика антитоксичного ефекту цільної і подрібненої ксеношкіри за індексом резистентності клітинних мембран.

Подрібнення субстрату кріоліофілізованої ксеношкіри зумовило появу нових фізико-хімічних і біофізичних властивостей, які в той чи інший спосіб визначають біологічні властивості ксеногенної шкіри як виробу медичного призначення, зокрема для лікування ран переважно термічної природи.

Серед властивостей подрібненої ксеношкіри особливу увагу привертають антитоксичні властивості як такі, що безпосередньо визначаються адсорбцією, дисперсністю і неоднорідністю часточок відповідно до фізичних закономірностей взаємодії їх поверхонь [2, 8]. Крім того, адсорбційна спроможність ксеношкіри набуває особливого значення з урахуванням посилення явищ адсорбції у тріщинах і порах, із чим, власне, пов'язаний значний інтерес до рівня дисперсності частинок саме подрібненого субстрату.

На це вказують результати дослідження адсорбційної здатності цільної ксеношкіри та її подрібнених субстратів трьох рівнів здрібнення, зокрема з розміром частинок до 1 мм, а також 2 і 3 мм. Так, якщо індекс резистентності мембран еритроцитів при інкубації цільного клаптя складав у середньому $66,2 \pm 2,3$ (100 %), то при інкубації подрібненого субстрату резистентність мембран клітин гемолітичної тест-системи становила $107,4 \pm 4,3$ (162,6 %) для частинок розміром менше 1 мм, $89,1 \pm 3,5$ (134,6 %) і $85,6 \pm 4,1$ (129,3 %) – для частинок розміром 2 і 3 мм відповідно ($p < 0,05$). Отримані дані підтверджують закономірне посилення адсорбційної залежності часточок адсорбенту зі збільшенням рівня їх дисперсності.

Отже, взаємозв'язок антитоксичного ефекту ксеношкіри з притаманними їй адсорбційними властивостями набуває ознак важливої складової саногенетичного процесу, сутність якого полягає в тому, що адсорбовані поверхнею субстрату токсичні фрагменти молекул метаболітів легше піддаються наступній елімінації з організму, що супроводжується поліпшенням перебігу опікової хвороби, а відтак формуванням передумов для наступної ефективної регенерації пошкоджених тканин.

ВИСНОВКИ. Встановлено залежність адсорбційної активності й пов'язаної з нею антитоксичної спроможності подрібненого субстрату ксеношкіри від рівня його здрібнення як такого. Встановлені особливості ксенодермального субстрату зможуть отримати інноваційну реалізацію для вирішення актуальних завдань направленої корекції пошкоджених патологічним процесом тканин та інших функціональних систем організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бігуняк В. В. Можливості використання субстрату консервованої ксеногенної шкіри: проблеми і перспективи / В. В. Бігуняк, В. В. Дем'яненко, Н. В. Гуда // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції. – Тернопіль : ТДМУ, 2007. – С. 34–36.
2. Введение в физику поверхности [К. Оура, В. Г. Лифшиц, А. А. Саранин и др.]. – М. : Наука, 2006. – 492 с.
3. Дем'яненко В. В. Кріотехнологія виготовлення біотрансплантата з позицій сучасних уявлень про електронно-ядрову тунелізацію в біологічних макромолекулах / В. В. Дем'яненко, Н. В. Гуда, Т. В. Бігуняк // Современные вопросы лечения термических поражений и их последствий : материалы Международной научно-практической конференции. – Донецк : Nord Press, 2005. – С. 93–94.
4. Использование лиофилизированных ксенодермотрансплантатов в ожоговых отделениях Украины / Т. В. Бигуняк, В. И. Нагайчук, В. В. Демяненко, Н. В. Гуда // Актуальные проблемы лечения термических поражений и их последствий : материалы респ. науч.-практ. конф., г. Минск, 3 октября 2008 года. – Минск : Доктор-Дизайн, 2008. – С. 87–89.
5. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму : методичні рекомендації / [М. А. Андрейчин, М. Д. Бех, В. В. Дем'яненко та ін.]. – К., 1998. – 32 с.
6. Пат. 7241 Україна. Спосіб оцінки активності аденіліциклази клітин ізольованої крові / Бігуняк Т. В., Дем'яненко В. В., Нагайчук В. І. – № 2004110938 ; заявл. 08.11.04 ; опубл. 15.06.05, Бюл. № 6.
7. Подрібнений субстрат кріоконсервованої ксеношкіри: новий технологічний етап системної тканинної терапії / В. В. Бігуняк, В. В. Дем'яненко, І. М. Кліщ, Ю. С. П'ятницький // Здобутки клінічної та експериментальної медицини : збірник матеріалів конф., 4 червня 2009 року. – Тернопіль : ТДМУ, 2009. – С. 52–53.
8. Праттон М. Введение в физику поверхности / М. Праттон. – Удмуртский Государственный Университет : Регулярная и хаотическая динамика, 2000. – 251 с.
9. Терсков И. А. Метод кислотных эритрограмм / И. А. Терсков, И. И. Гительзон // Биофизика. – 1957. – 2, вып. 2. – С. 259–266.

А. В. Цимбалюк

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

АНТИТОКСИЧЕСКИЙ ФЕНОМЕН КРИОЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО КСЕНОДЕРМАЛЬНОГО СУБСТРАТА

Резюме

Антитоксическая активность измельченного субстрата криолиофилизированной ксенокожи рассматривается по критерию резистентности эритроцитарных мембран в гемолитической тест-системе как проявление адсорбционных свойств ее частиц и анализируется с позиций перспективности для решения актуальных задач управляемой регенерации тканей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криолиофилизированная ксенокожа, измельченный ксенодермальный субстрат, гемолитическая тест-система, резистентность эритроцитарных мембран.

A. V. Tsymbaliuk

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

ANTITOXIC PHENOMENON OF THE CLIOLIOFILIZED XENOGRAFT SUBSTRATE

Summary

Antitoxic ability of the crioliofilized xenograft crushed substrate is considered by the criterion of erythrocyte membranes resistance in hemolytic test system as a manifestation of adsorption properties of its particles and is analyzed from the standpoint of its effectiveness for tissue regeneration.

KEY WORDS: crioliofilized xenograft, crushed xenograft substrate, hemolytic test system, the resistance of erythrocyte membranes.

Отримано 11.04.12

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

МЕТАБОЛІЧНІ ПОРУШЕННЯ У ЩУРІВ З ГОСТРИМ УРАЖЕННЯМ ЛЕГЕНЬ

У дослідженнях на білих щурах відзначено, що при гострому ураженні легень відбувається зростання показників ендогенної інтоксикації – молекул середньої маси в бронхоальвеолярному лаважі. Встановлено достовірний обернений взаємозв'язок між молекулами середньої маси і рівнями рН та парціального тиску артеріальної крові, що свідчить про вплив гіпоксії на системні мембранодеструктивні процеси.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостре ураження легень, бронхоальвеолярний змив, молекули середньої маси, ендогенна інтоксикація.

ВСТУП. Протягом останніх десятиліть особливу увагу в патогенезі багатьох захворювань приділяють синдрому ендогенної інтоксикації [15]. Різноманітний комплекс пошкоджувальних факторів зумовлює активацію катаболічних процесів, зниження детоксикаційної здатності організму, накопичення пептидів середньої молекулярної маси, що є проміжними продуктами протеолізу, та розвиток синдрому “метаболічної інтоксикації”, який призводить до виражених функціональних порушень та морфологічних пошкоджень різних органів і систем, що є визначальним у танатогенезі [1, 9, 19]. Особлива роль у перебізі патологічних біохімічних процесів належить молекулам середньої маси (МСМ), окремі фракції яких проявляють високу біологічну активність [4]. Спектр патологічної дії МСМ має різний характер. Вони порушують фізико-хімічні властивості клітинних мембран, пригнічують тканинне дихання та окисне фосфорилування, інгібують АТФ-азну активність і синтез ДНК, активують процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) з одночасним зниженням антиоксидантної активності, стимулюють клітинну проліферацію або її пригнічення в процесі апоптозу [8, 20]. Існує також думка про протекторні властивості МСМ [18, 20].

Важливою ланкою розвитку і прогресування гострого ураження легень (ГУЛ) є гіперпродукція перекисних сполук за умов зниження антиоксидантних резервів та, як наслідок, дисбаланс утворення і використання продуктів ПОЛ [10]. У результаті відбуваються порушення практично на всіх рівнях клітинного метаболізму, які охоплюють зміну фізико-хімічних

властивостей мембранних білків і ліпідів, порушення проникності мембран, зменшення електричної стабільності мембран, що проявляється зміною кислотно-лужної рівноваги, імунного статусу, рівня біологічно активних речовин, програмованої смерті клітин [11]. Науковці дослідили розвиток ендотоксемії за умов гострого ураження легень, що виникає при непрямому їх пошкодженні, зокрема панкреатиті, сепсисі [2, 11]. При цьому легені є однією з головних мішеней більшості відомих факторів тканинного пошкодження [9].

Механізми розвитку метаболічних порушень при ГУЛ складні, багатогранні й досі залишаються незрозумілими, особливо при наявності великої кількості етіологічних чинників даної патології. Дотепер у літературі відсутні дані щодо поглибленого дослідження показників метаболічного порушення, які лежать в основі поліорганної дисфункції при гострому аспіраційному ураженні легень, що свідчить про актуальність даного дослідження. У ряді досліджень, проведених у хворих із різними патологічними станами, було виявлено підвищення рівня МСМ як у сироватці крові, так і в інших фізіологічних рідинах – сечі, слині та ін., що наштовхнуло нас на думку дослідити рівень ендотоксемії при аспіраційному ураженні у бронхоальвеолярному змиві (БАЗ) [10, 11].

Тому метою даної роботи було вивчити характер змін ендогенної інтоксикації в бронхоальвеолярному змиві лабораторних тварин і встановити роль газового складу крові у розвитку ендотоксемії при гострому ураженні легень, індукованому інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди було проведено на 30 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях масою 200–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”. Утримання тварин та експерименти виконували відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварин поділили на 5 груп: 1-ша – контрольна; 2-га – ураження хлоридною кислотою тривалістю 2 год; 3-тя – ураження хлоридною кислотою тривалістю 6 год; 4-та – ураження хлоридною кислотою тривалістю 12 год; 5-та – ураження хлоридною кислотою тривалістю 24 год.

Щурів анестезували шляхом внутрішньочеревного введення їм тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону шийі обробляли хлоргексидином і робили 0,5 см серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею HCl, рН 1,2, в дозі 1,0 мл/кг на вдиху. Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин у дозі 1,0 мл/кг.

Через 2, 6, 12 та 24 год проводили евтаназію щурів методом введення тіопенталу натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини, дотримуючись правил гуманного ставлення до тварин. Для визначення концентрації MCM у бронхоальвеолярному змиві останній піддавали депротейнізації з використанням 10 % трихлороцтової кислоти. Потім проби центрифугували (3000 об./хв) протягом 30 хв. 0,5 мл надосаду переносили у пробірку з 4,5 мл дистильованої води, отриману рідину перемішували і переносили у вимірювальну кювету. Спектрофотометрію проводили при довжинах хвилі 254 та 280 нм проти дистильованої води. Відповідь про вміст MCM отримували в умовних одиницях, які чисельно дорівнювали коефіцієнтам екстинції в 1 л [16].

Одержані результати статистично обробляли, обчислювали середню арифметичну варіаційного ряду (M), стандартну похибку середньої арифметичної (m) та достовірність відмінностей (p). Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначали у таблицях (кореляційних матрицях). Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вираження ендотоксикозу визначали за вмістом у крові гідрофільних і гідрофобних продуктів. До гідрофільних компонентів ендогенної інтоксикації відносять MCM, які утворюються внаслідок підвищеного протеолізу і проявляють пошкоджувальну дію на організм у зв'язку з високою функціональною активністю [12].

Як видно з таблиці, вміст молекул MCM/254 (вміст ланцюгових амінокислот у середньомолекулярних пептидах та продуктах їх розпаду) в БАЗ щурів усіх груп спостереження збільшився. Так, через 2 год експерименту даний показник зріс на 12,67 % відносно контролю, через 6 год – на 8,97 % стосовно 2-ї дослідної групи, через 12 год – на 10,35 % відповідно до 3-ї групи, через 24 год – на 10,91 % проти даних 4-ї дослідної групи. Слід зауважити, що вказані цифрові величини статистично достовірно відрізнялись між собою ($p < 0,05$) і протягом доби рівень MCM/254 підвищився в середньому на 50 %.

Проведені дослідження з визначення вмісту MCM/280 (ароматичні амінокислоти) показали, що протягом 24 год спостереження їх рівень достовірно зростав у всіх групах спостереження ($p < 0,05$) і був найвищим через добу експерименту, тобто на 105,78 % стосовно контролю (табл. 1).

Порівнюючи отримані дані щодо вмісту MCM/254 і MCM/280, можна говорити про однонаправлені зміни середньомолекулярних

Таблиця – **Динаміка вмісту MCM (ум. од./л) у бронхоальвеолярному змиві дослідних груп тварин за умов ГУЛ (n=6)**

Показник	Група тварин				
	1-ша (контроль)	2-га (2 год)	3-тя (6 год)	4-та (12 год)	5-та (24 год)
MCM/254, ум. од./л	409,00±16,39	460,83±10,35	502,17±10,46	554,17±13,56	614,67±12,47
p	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,001$, $p_{1-4} < 0,001$, $p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-4} < 0,05$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,01$				
MCM/280, ум. од./л	245,00±11,62	365,67±14,18	416,33±11,81	464,33±10,67	481,83±16,07
p	$p_{1-2} < 0,001$, $p_{1-3} < 0,001$, $p_{1-4} < 0,001$, $p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-4} < 0,05$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,05$				

Примітка. p – вірогідність відмінностей між дослідними групами.

пептидів при різних довжинах хвилі, які характеризуються достовірним збільшенням протягом 24 год спостереження, що свідчить про наростання ендогенної інтоксикації.

Було проведено також порівняльний аналіз рівня ендотоксемії в БАЗ та крові щурів [13] із змодельованим ГУЛ. Виявлено, що вміст МСМ/254 і МСМ/280 у БАЗ щурів контрольної групи був достовірно вищим, ніж у крові ($p < 0,05$), що, ймовірно, пов'язано з підвищеним протеолізом у легенях під впливом факторів зовнішнього середовища (рис.) [6, 16]. В дослідних групах встановлено статистично значимішу відмінність МСМ/254 і МСМ/280 в БАЗ стосовно даних у крові, що вказує на один з факторів розвитку ГУЛ, зокрема патологічну зміну сурфактантної системи, транскapілярного обміну рідини, розвиток мембранодеструктивних процесів і, як наслідок, підвищення надходження у кровотік токсичних речовин.

Проведений корелятивний аналіз даних щодо рН крові та МСМ/254 в БАЗ показав негативний взаємозв'язок середньої сили між досліджуваними показниками, який був статистично значимим ($p < 0,05$) у 2-й ($r = -0,76$) і 3-й ($r = -0,81$) експериментальних групах. Зсув реакції середовища в кислу сторону за умови ГУЛ відбувався в результаті накопичення недоокиснених продуктів вуглеводного і ліпідного обміну. Респіраторний ацидоз, що розвинувся, сприяв лабілізації мембран лізосом, виходу в цитоплазму протеаз та протеолітичної деструкції тканини легень, у результаті чого підвищувалась інтенсивність пероксидного окиснення білків та ліпідів, що є основними чинниками ендотоксемії. З іншої сторони, накопичення в організмі ендотоксинів призводило до порушень гемодинаміки, проникності мікросудин, функції дихальних ферментів, а також до метаболічного ацидозу на фоні деструктивних пошкоджень легень [5, 20].

До провідних механізмів, що лежать в основі ендогенної інтоксикації при ГУЛ, належить розвиток гіпоксії тканини у зв'язку з порушенням транспорту кисню. Проведений корелятивний аналіз даних щодо парціального тиску кисню (pO_2) в артеріальній крові [13] та МСМ/254 в БАЗ показав негативний корелятивний зв'язок середньої сили між досліджуваними показниками, який був статистично значимим ($p < 0,05$) у 2-й ($r = -0,71$) і 3-й ($r = -0,76$) експериментальних групах. Цікавим є те, що при відносному зростанні pO_2 у 4-й групі рівень ендогенної інтоксикації продовжував зростати. Це можна пояснити тим, що за умов гіпоксії відновлення постачання легень киснем стимулює ПОЛ, зумовлюючи пошкодження клітин і провокуючи викид токсичних метаболітів, які є додатковим джерелом інтоксикації [7].

З огляду на наведені дані, ендотоксикоз займає одне з важливих місць у патогенезі ГУЛ, оскільки знижує функціональну активність регуляторних систем, ініціює процеси пероксидації, зумовлює накопичення їх дериватів, метаболітів з наступною дестабілізацією окиснювального фосфорилування, порушення функціонування клітинних мембран та розвиток поліорганної недостатності [3, 4, 14, 17] (схема).

ВИСНОВКИ. За умови гострого ураження легень, індукованого інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти, відбуваються однонаправлені зміни показників ендогенної інтоксикації, зокрема МСМ/254 і МСМ/280, в крові та бронхоальвеолярному змиві, що вказує на наростання ендотоксемії. Встановлено достовірний обернений взаємозв'язок між МСМ і рівнями рН та парціального тиску артеріальної крові, що свідчить про вплив гіпоксії на системні мембранодеструктивні процеси.

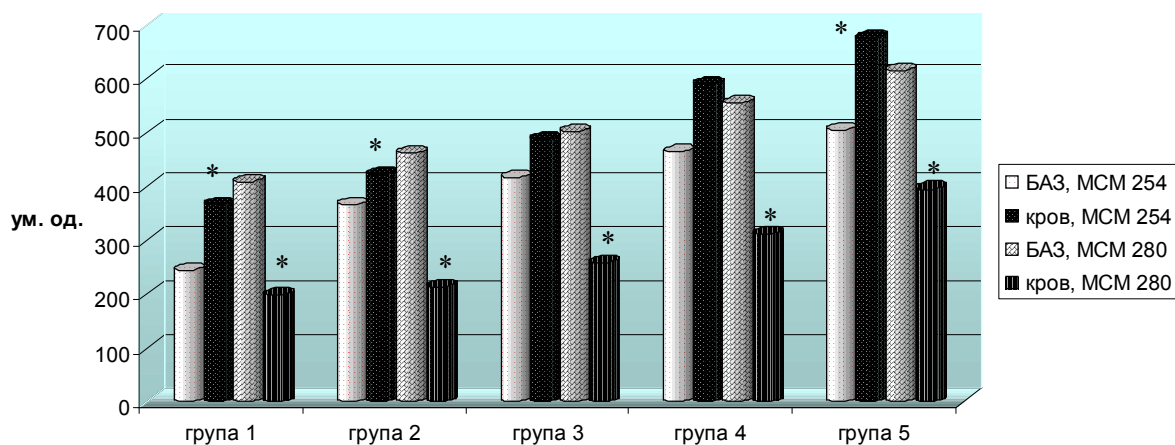


Рис. Направленість змін МСМ/254 і МСМ/280 у крові й бронхоальвеолярному змиві щурів за умови гострого ураження легень (* – достовірність різниці між показниками в крові та БАЗ у межах групи, $p < 0,05$).



Схема. Роль ендотоксикозу в патогенезі гострого ураження легень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрейчин С. М. Сучасні уявлення про метаболічну ендогенну інтоксикацію / С. М. Андрейчин, Т. О. Голомаша // Інфекційні хвороби. – 2012. – № 1 (67). – С. 84–88.
2. Бородин Е. А. Биохимия эндотоксикоза. Механизмы развития и оценка степени тяжести при воспалительных заболеваниях легких / Е. А. Бородин, Е. В. Егоршина, В. П. Самсонов. – Благовещенск, АГМА, 2003. – 129 с.
3. Волчегорский И. А. Влияние “средних молекул”, выделенных из плазмы крови интактных и обожженных животных, на клеточный состав культур эритробластических островков костного мозга / И. А. Волчегорский, Н. В. Тишевская, Д. А. Кузнецов // Вестник РАМН. – 2002. – № 2. – С. 30–36.
4. 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.
5. Дисбаланс перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты и уровень средних молекул у детей, больных хроническим гломерулонефритом / Е. А. Вельдер, Н. И. Аверьянова, В. М. Аксёнова [и др.] // Матер. науч. сессии Перм. гос. мед. академии. – Пермь, 2000. – С. 23–24.
6. Заяць Л. М. Вплив аерополутантів на ультраструктуру альвеолярних макрофагів легень / Л. М. Заяць // Вісник проблем біології і медицини. – 2003. – Вип. 3. – С. 48–49.
7. Изменения активности фосфолипазы A2 и перекисного окисления липидов при эндотоксикозе в условиях экспериментального перитонита / В. А. Трофимов, А. П. Власов, В. Н. Подеров [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – № 1. – С. 31–33.
8. Карякина Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – № 3. – С. 3–8.
9. Кассиль В. Л. Острый респираторный дистресс-синдром в свете современных представлений / В. Л. Кассиль, Е. С. Золотокрылина // Вестник интенсивной терапии. – 2000. – № 4. – С. 3–7.
10. Копытова Т. В. Молекулы средней массы как субстрат эндогенной интоксикации при тяжелых дерматозах / Т. В. Копытова // Усп. совр. естествознания. – 2006. – № 9. – С. 7–10.
11. Лабораторная оценка тяжести аутоиммунного эндотоксикоза при беременности, осложненной гестозом / Л. А. Пестряева, Л. Н. Юрченко, Е. А. Шипицына [и др.] // Клини. лаб. диагностика. – 2000. – № 10. – С. 7.
12. Малахова М. Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме / М. Я. Малахова // Эфферентная терапия. – 2000. – № 4. – С. 3–14.
13. Марущак М. І. Зміни газового складу крові при експериментальному гострому ураженні легень у динаміці / М. І. Марущак // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2011. – № 1. – С. 75–78.
14. Марущак М. І. Роль активних форм кисню у

розвитку і прогресуванні гострого ураження легень в експерименті / М. І. Марущак // Мед. хімія. – 2012. – **14**, № 1 (50). – С. 104–108.

15. Матвеев С. Б. Оценка эндогенной интоксикации по показателям среднемoleкулярных пептидов при неотложных состояниях / С. Б. Матвеев, Н. В. Федорова, М. А. Годков // Клин. лаб. диагностика. – 2009. – № 5. – С. 16–18.

16. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму : методичні рекомендації. – К., 1998. – 43 с.

17. Морфофункціональні зміни в легенях лабораторних тварин у патогенезі експериментального хронічного бронхіту токсичної та пилової етіології / М. Г. Карнаух, В. Д. Крушевський, С. П. Луговський,

М. А. Комаров // Гігієна населених місць. – 2003. – Вип. 41. – С. 53–58.

18. Никольская В. А. Влияние окислительного стресса in vitro на уровень молекул средней массы в сыворотке крови и гемолизате эритроцитов Sus Scrofa / В. А. Никольская // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2011. – № 4. – С. 123–126.

19. Павлишин Г. А. Метаболічні порушення у новонароджених з перинатальними факторами ризику / Г. А. Павлишин // Вісник СумДУ. – 2006. – № 8 (92). – С. 96–100.

20. Юдакова О. В. Интенсивность ПОЛ и АОА, уровень молекул средней массы как показателя эндогенной интоксикации при распространенном перитоните / О. В. Юдакова, Е. В. Григорьев // Клин. лаб. диагностика. – 2004. – № 10. – С. 20–22.

М. И. Марущак

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС С ОСТРЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЛЕГКИХ

Резюме

В исследованиях на белых крысах отмечено, что при остром поражении легких происходит углубление показателей эндогенной интоксикации – молекул средней массы в бронхоальвеолярном лаваже. Установлена достоверная обратная взаимосвязь между молекулами средней массы и уровнями pH и парциального давления артериальной крови, что свидетельствует о влиянии гипоксии на системные мембрано-деструктивные процессы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острое поражение легких, бронхоальвеолярный смыв, молекулы средней массы, эндогенная интоксикация.

М. І. Marushchak

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

METABOLIC DISORDERS IN THE RATS WITH ACUTE LUNG INJURY

Summary

In experiments on white rats has been shown that at acute lung injury there are increased the indices of endogenous intoxication – medium weight molecules in the bronchoalveolar lavage. The negative correlations between medium weight molecules and levels of pH and partial pressure of arterial blood have been determined, which indicate the influence of hypoxia on systemic membrane-destructive processes.

KEY WORDS: acute lung injury, bronchoalveolar lavage, medium weight molecules, endogenous intoxication.

Отримано 16.03.12

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

С. Г. Ісаєв, А. О. Девяткіна, Г. О. Єрьоміна, А. М. Семенов,
А. Ю. Мазейко, І. А. Сокурєнко, Н. Ю. Шевельова
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

СИНТЕЗ, БУДОВА ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НІТРО- ТА ХЛОРЗАМІЩЕНИХ 9-(R-ІЛІДЕН)ГІДРАЗИНОАКРИДИНІВ

Здійснено синтез 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридинів. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ПМР-спектроскопії. Чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. За програмою PASS проведено комп'ютерний прогноз можливих видів фармакологічної активності 9 вперше синтезованих речовин серед 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-бензиліден)гідразиноакридинів. За класифікацією К. К. Сидорова, синтезовані сполуки при внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних речовин. Експериментально встановлено, що синтезовані сполуки проявляють протимікробну, протигрибкову протизапальну, діуретичну, антидіуретичну та анальгетичну активність. Встановлено ряд закономірностей зв'язку "будова–активність–токсичність".

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, 9-(R-іліден)гідразиноакридини, фармакологічна активність.

ВСТУП. Перспективним науковим напрямком щодо пошуку біологічно активних сполук є дослідження серед похідних акридину [1–7]. В останні роки серед 9-R-похідних акридину знайдені сполуки з протимікробною, протигрибковою, протизапальною, діуретичною, анальгетичною активністю [6]. При порівнюванні препаратів акридинової групи з іншими відзначають ряд переваг: похідні акридину значно зменшують резистентність мікроорганізмів до антибіотиків і сульфаніламідних препаратів; вони активні відносно грампозитивних та грамотрибутивних мікроорганізмів; їх активність не знижується за присутності сироватки білка; добре утримуються на поверхні, яку обробляють, утворюючи комплекси з нуклеїновими кислотами. Дані обставини визначили необхідність хімічного та фармакологічного вивчення нітро- і хлорзаміщених 9-(R-іліден)гідразиноакридинів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Заміщені 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-гідразиноакридини одержано шляхом взаємодії відповідних 9-хлораакридинів з гідразин-гідратом у середовищі діоксану [3]. Конденсацією 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-гідразиноакридинів з ароматичними альдегідами синтезовано відповідні 9-(R-іліден)гідразиноакридини (рис.). Синтезовані сполуки (I–IX) являють собою кристалічні речовини

© С. Г. Ісаєв, А. О. Девяткіна, Г. О. Єрьоміна, А. М. Семенов, А. Ю. Мазейко, І. А. Сокурєнко, Н. Ю. Шевельова, 2012.

фіолетового або жовто-зеленого кольору, розчинні в етанолі, діоксані, диметилформаміді. Будову та індивідуальність синтезованих речовин доведено ходом синтезу, даними елементного аналізу, ІЧ-, ПМР-спектроскопії і за допомогою тонкошарової хроматографії. Дані елементного аналізу відповідають розрахованим. В ІЧ-спектрах (табл. 1) сполук (I–IX) інтерпретовано смугу поглинання при 3354–3336 cm^{-1} , що відповідає NH-групі. Наявність нітрогрупи підтверджується смугами поглинання в ділянках 1530–1504 ($\nu^{\text{as}}\text{NO}_2$) та 1364–1333 cm^{-1} ($\nu^{\text{s}}\text{NO}_2$), що відповідають асиметричним та симетричним валентним коливанням відповідно. Валентні коливання зв'язку C–Cl у спектрограмах сполук (V–IX) мають смуги середньої інтенсивності при 802–774 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-Cl}}$). У ПМР-спектрах сполук (I та III) інтерпретовані сигнали протонів NH-групи у слабкому полі у вигляді синглету при 10,03–9,85 м.ч., а CH-групи в гідразонному фрагменті – при 8,91–8,50 м.ч. Сигнали протонів диметильної групи знаходяться в ділянці 2,67–2,64 м.ч., а протони метильної групи сполуки (III) спостерігаються у вигляді синглету при

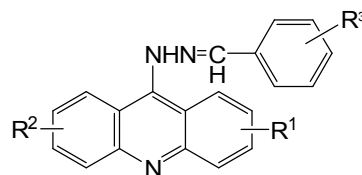


Рис. 5-Нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридини (I–IX).

Таблиця 1 – ІЧ-спектральні, хроматографічні характеристики та біологічна активність 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридинів

[illegible]

Примітка.* – значення Rf наведено в системі етанол–гексан (1:3).

Таблиця 2 – Біологічна активність 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(Р-іліден)гідразиноакридинів

Сполука	Дуретична, % у дозі 150 мг/кг	Фунгіостатина, МПК (мкг/мл)		Бактеріальність *, МПК (мкг/мл.)							
		Candida albicans	Micosporum capit.	1	2	3	4	5	6	7	8
I	65,0	-	-	8,0	31,2	15,6	31,2	-	-	-	-
II	201,5	125	250	31,2	250	62,5	125	125	125	250	125
III	75,7	62,5	125	15,6	125	31,2	62,5	125	62,5	125	250
IV	185,4	125	125	15,6	62,5	31,2	62,5	125	62,5	62,5	125
V	95,8	125	250	125	250	62,5	125	125	125	125	125
VI	118,0	62,5	62,5	125	250	31,2	62,5	125	62,5	125	125
VII	62,5	125	250	62,5	125	31,2	125	125	250	500	250
VIII	145,6	31,2	31,2	15,6	62,5	15,6	125	125	125	31,2	125
IX	95,1	125	125	125	250	125	250	250	250	250	125
Глітоксид у дозі 150 мг/кг Нітрофурал	212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Етакридину лактат	-	64	125	-	-	-	-	-	-	-	-
Адурскрин	65	-	-	31,2	15,6	31,2	62,5	125	250	125	125

Примітка * – як тест-мікроорганізми використовували: 1. *Staphylococcus aureus*. 2. *Bacillus subtilis*. 3. *Escherichia coli*. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Salmonella choleraesuis*. 6. *Salmonella dublin*. 7. *Salmonella thyphimurium*. 8. *Salmonella thyphusuis*.

2,24 м.ч. У ділянці 8,90–7,04 м.ч. розміщений складний набір мультиплетів, які відповідають протонам ароматичної системи акридину та бензольного кільця гідразонного фрагмента.

Для комп'ютерного прогнозу спектра біологічної активності 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридинів (I–IX) ми використали комп'ютерну програму PASS [8].

Гостру токсичність синтезованих речовин вивчали на білих мишах обох статей при внутрішньошлунковому введенні. Для вивчення протизапальної дії синтезованих речовин досліджували їх здатність пригнічувати розвиток набряку при гострому запаленні, який викликали шляхом субплантарного введення 1 % розчину карагеніну в лапку миші. Досліджувані сполуки вводили внутрішньошлунково у дозі 20 мг/кг. Як референс-препарат обрано диклофенак натрію [2]. Анальгетичну дію вивчали на білих безпородних щурах на моделі гарячої пластини [2]. Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково у дозі 20 мг/кг. Як препарат порівняння використовували анальгін.

Діуретичну дію кожної речовини та гіпотіазиду досліджували за методом Є. Б. Берхіна на 7 білих щурах. Контрольні тварини одержували водне навантаження (1 мл на 20 г маси). Піддослідним щурам за 30 хв до водного навантаження вводили внутрішньочеревно досліджувані сполуки в дозі 50 мг/кг у вигляді 5 % водної суспензії [2]. Як еталонний препарат антидіуретичної дії обрано адіурекрин.

Бактеріостатичну і фунгістатичну активність сполук (I–IX) *in vitro* вивчали за методикою двократних серійних розведень [2] у рідкому живильному середовищі.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів комп'ютерного прогнозу за допомогою програми PASS показав, що вперше синтезовані 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридини (I–IX) з найбільшою вірогідністю повинні проявляти протимікробну, протівірусну, протигрибкову, діуретичну та кардіопротекторну активність.

Серед синтезованих речовин (II–IX) найбільшу протизапальну активність проявляють сполуки (IV, VII, IX), їх дія перебуває на рівні мефенамової кислоти. Вищеназвані акридини мають також слабкий анальгетичний ефект

(табл. 1). З 9 вивчених речовин тільки 3 проявляють діуретичну дію (II, IV, VI) і 3 – антидіуретичну активність на рівні адіурекрину (I, III, VII). Антидіуретичний ефект мають акридини, які містять у гідразонному фрагменті диметиламінний фрагмент.

Проведені мікробіологічні дослідження показали, що нітро- та хлорзаміщені 9-(R-іліден)гідразиноакридини (I–IX) відносно грам-позитивних і грамнегативних мікроорганізмів проявляють бактеріостатичну дію в концентрації 8,0–500 мкг/мл (табл. 2). Найбільш виражену бактеріостатичну активність відносно золотистого стафілокока та кишкової палички мають сполуки (I, III, IV, VIII), які в бензольному кільці гідразонного фрагмента містять нітрогрупу та диметиламін. Фунгістатична активність 9-(R-іліден)гідразиноакридинів відносно *Candida albicans* та *Microsporum canis* складає 31,2–250 мкг/мл (табл. 2). Сполуки (III, VI, VIII) за протигрибковою активністю перевищують дію нітрофуралу.

За класифікацією К. К. Сидорова, 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридини належать до класу малотоксичних речовин (DL_{50} = 2500–4000 мг/кг). Слід відзначити, що введення в молекулу синтезованих раніше 9-гідразиноакридинів [3, 7] залишку ароматичних альдегідів призводить до зменшення гострої токсичності в 2 рази (табл. 1).

ВИСНОВКИ. 1. Шляхом конденсації 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-гідразиноакридинів з ароматичними альдегідами синтезовано відповідні 9-(R-іліден)гідразиноакридини і встановлено їх будову та індивідуальність за допомогою комплексу сучасних методів дослідження – елементного аналізу, ІЧ-, ПМР-спектроскопії і хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

2. За програмою PASS проведено комп'ютерний прогноз можливих видів біологічної активності 9 вперше синтезованих сполук серед 5-нітро- та 5,7-дихлор-9-(R-іліден)гідразиноакридинів. Експериментальні фармакологічні дослідження дозволили виявити речовини з вираженою бактеріостатичною, фунгістатичною, протизапальною, діуретичною, антидіуретичною та слабкою анальгетичною активністю. Встановлено елементи залежності між хімічною будовою та їх біологічною дією і гострою токсичністю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бражко О. А. Біологічна активність похідних та акридину з азото- та сірковмісними функціональ-

ними групами : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук / О. А. Бражко. – К., 2005. – 42 с.

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

3. Ісаєв С. Г. Синтез, будова та біологічна активність 9-N'-[пара-(диметиламіно)бензиліден]гідразино-5-нітроакридинів / С. Г. Ісаєв, В. Д. Яремено, Н. П. Русакова // Фармац. журн. – 2000. – № 1. – С. 72–75.

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

5. Метоксизаміщені 5-нітро-9-N-ариламіноакридини, їх синтез та біологічна активність / С. Г. Ісаєв,

О. А. Бризицький, В. В. Афанасьєва [та ін.] // Мед. хімія. – 2011. – **13**, № 3 (48). – С. 51–54.

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

7. Синтез, будова та біологічна активність заміщених 9-гідразино-5-нітроакридину / С. Г. Ісаєв, О. І. Павлій, Н. Ю. Бевз [та ін.] // Фармац. журн. – 2005. – № 3. – С. 76–80.

8. Discriminating between drugs and nondrugs by Prediction of Activity Spectra for substances (PASS) / S. Anzali, G. Barnickel, B. Cezanne [et al.] // J. Med. Chem. – 2001. – № 4 (15). – Р. 2432–2437.

**С. Г. Ісаєв, А. А. Девяткина, А. А. Еремина, А. Н. Семенов,
А. Ю. Мазейко, И. А. Сокурено, Н. Е. Шевелева**
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НИТРО- И ХЛОРЗАМЕЩЕННЫХ 9-(R-ИЛИДЕН)ГИДРАЗИНОАКРИДИНОВ

Резюме

Осуществлен синтез 5-нитро- и 5,7-дихлор-9-(R-илиден)гидразиноакридинов. Структура синтезированных соединений подтверждена данными элементного анализа, ИК-, ПМР-спектроскопии. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. По программе PASS проведен компьютерный прогноз возможных видов фармакологической активности 9 впервые синтезированных веществ среди 5-нитро- и 5,7-дихлор-9-(R-бензилиден)гидразиноакридинов. По классификации К. К. Сидорова, синтезированные соединения при внутривенном введении относятся к классу малотоксичных веществ. Экспериментально установлено, что синтезированные соединения проявляют противомикробную, противогрибковую, противовоспалительную, диуретическую, антидиуретическую и анальгетическую активность. Установлено ряд закономерностей связи “структура–активность–токсичность”.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, 9-(R-илиден)гидразиноакридины, фармакологическая активность.

**S. H. Isaiev, A. O. Deviatkina, A. O. Yeriomina, A. M. Semenov,
A. Yu. Mazeiko, I. A. Sokurenko, N. Yu. Shevelyova**
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

SYNTHESIS, STRUCTURE AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NITRO- AND CHLOROSUBSTITUTED OF 9-(R-ILIDEN)HYDRAZINOACRIDINES

Summary

The synthesis of 5-nitro- and 5,7-dichloro-9-(R-iliden)hydrazinoacridines. Structure of synthesized compounds has been proved by the date of element analysis, IR-, NMR-spectroscopy. The purity has been controlled by the method of thin-layer chromatography. The computer prognosis of possible types of pharmacological activity is conducted on the program of 9 first synthesized connections in the row of 5-nitro- and 5,7-dichloro-9-(R-benzyliden)hydrazinoacridines. According to classification by K. K. Sydorov synthesized compound at intra stomach entering belong to low toxic compounds. It was established that the synthesized have antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, diuretic, antidiuretic and analgesic activity. A number of regularities of the «structure – activity – toxicity» relationship have been determined.

KEY WORDS: synthesis, 9-(R-iliden)hydrazinoacridines, pharmacological activity.

Отримано 06.03.12

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

А. Л. Загайко¹, В. П. Филимоненко¹, О. А. Красільнікова¹,
Л. М. Соловйова², Ю. О. Огай²
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВІНОГРАДУ І ВИНА “МАГАРАЧ”², ЯЛТА

ВПЛИВ СУБСТАНЦІЇ “ПОЛІКАТЕХІН” НА ВМІСТ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ У ШКІРІ ЩУРІВ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ФІБРОБЛАСТІВ

Застосування субстанції поліфенолів винограду “Полікатехін” збільшує вміст гіалуронової кислоти у шкірі та ізольованих фібробластах щурів. Зростання рівня гіалуронової кислоти супроводжується зниженням глюкозаміноглікангідролазної активності у шкірі та підвищенням проліферативної активності фібробластів. Гіалуронатотропний ефект полікатехіну більш виражений порівняно з камагелем.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліфеноли, гіалуронова кислота, фібробласти, естрогени, старіння шкіри.

ВСТУП. Старіння шкіри, невід’ємна складова старіння організму в цілому, становить одну з актуальних проблем сучасної дерматології та косметології [5, 12].

Головною віковою зміною сполучної тканини є зменшення вмісту води та співвідношення основна речовина/волокна, яке пов’язане зі зниженням концентрації глікозаміногліканів. Відомо, що перші вікові зміни асоційовані зі зменшенням вмісту гіалуронової кислоти – основного компонента екстраклітинного матриксу, що утворюється фібробластами шкіри [5].

Гіалуронова кислота має найбільшу молекулярну масу з глікозаміногліканів, завдяки чому за рахунок водневих зв’язків зв’язує та утримує велику кількість води (до 200–500 молекул). Даний протеоглікан настільки гідратує дерму, що в ній міститься 15–18 % від води всього організму. Утворюючи в’язкий гель, гіалуронова кислота забезпечує тургор тканин і нормальний перебіг фізіологічних процесів у клітинах та міжклітинному просторі (обмін речовин, міжклітинні взаємодії, регенерація тканин тощо). Гіалуронат проявляє також детоксикаційні властивості [9].

У процесі старіння гіалуронова кислота зазнає якісних та кількісних змін, що призводять до зменшення її вмісту в епідермісі та накопичення у глибоких шарах. Більше того, при старінні полісахарид щільніше зв’язується

з тканинами. Незворотне зв’язування гіалуронової кислоти з рецепторами спричиняє виснаження рецепторопосередкованої стимуляції клітин, зокрема фібробластів – головних “реставраторів” шкіри [4].

Відомо, що важливим ендогенним фактором старіння шкіри є стан ендокринної системи. Гормони, перш за все статеві (естрогени та андрогени), впливають на мітотичну активність епідермісу і дерми, стан сальних залоз та волосяних фолікулів [8, 11]. Зокрема, жіночі статеві гормони стимулюють поділ базальних клітин епідермісу, підсилюють синтез фібробластами колагенових, еластичних волокон і гіалуронової кислоти й тим самим підтримують пружність та еластичність шкіри. Починаючи приблизно з 35 років, продукування естрогенів поступово знижується, що відразу відбивається на стані шкіри: вона стає сухішою, тоншою, з’являються зморшки, шкіра легко пошкоджується і повільніше відновлюється [2, 10].

На сьогодні відомо декілька класів речовин рослинного походження, які в організмі людини можуть діяти як слабкі естрогени та антиестрогени [7, 8, 11]. Це перш за все поліфеноли, на які багаті Виноград культурний та продукти його переробки [13].

Метою даної роботи було дослідити вплив субстанції конденсованих поліфенолів винограду “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти у шкірі щурів, а також на показники функціонального стану основних клітин сполучної тканини – фібробластів.

© А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова, Л. М. Соловйова, Ю. О. Огай, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для визначення впливу поліфенолів винограду на вміст гіалуронової кислоти на спині експериментальних тварин (щурів-самиць) вищипували ділянку площею 1 см². Ділянку шкіри змащували полікатехіном або препаратом порівняння “Камагель” (концентрат поліфенолів ромашки, КРКА, Словенія) протягом 14 діб. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом. Ділянку шкіри вирізали, подрібнювали у трисбуфері на холоді. В гомогенаті визначали вміст гіалуронової кислоти за допомогою стандартних наборів реактивів. Активність глюкозаміноглікангідролазного ферментативного комплексу визначали за методом [3]. Дослідження на щурах проводили відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001).

Експерименти з ізольованими фібробластами проводили на клітинах лінії MRC5, які інкубували в середовищі Ігла (10 % бичачий сироватковий альбумін, 100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ глутамін). Фібробласти інкубували в концентрації $2 \cdot 10^5$ клітин/75 см² у контейнері для інкубації клітин. В окремих експериментах до інкубаційного середовища вносили 2 мкКи/ $2 \cdot 10^5$ клітин [³H]тимідин, а також камагель у дозі 2 мл/кг (контроль) та субстанцію “Полікатехін” (дослід), що містила поліфеноли в дозі 1 мг/100 мл суспензії. Через 48 год експерименту клітини осаджували шляхом центрифугування. У супернатанті визначали вміст гіалуронової кислоти. Осад ресуспендували в 0,5 мл середовища і відбирали аліквоту для визначення включення міченого тимідину. Радіоактивність визначали за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА.

Результати експериментів обробляли статистично з використанням програми “Statistica 5,0 for Windows” для ПК, достовірність змін

оцінювали за допомогою критеріїв Стюдента (t) і Вілкоксона–Манна–Уїтні (W) [1]. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що місцеве застосування субстанції “Полікатехін” та препарату порівняння “Камагель” підвищувало вміст гіалуронової кислоти на 35 і 21 % відповідно (табл. 1). Збільшення вмісту гіалуронату може бути зумовлене як підсиленням його синтезу, так і пригніченням процесів деградації. В нашому дослідженні зростання вмісту гіалуронової кислоти після застосування полікатехіну супроводжувалося зниженням глюкозаміноглікангідролазної (ГАГГ) активності у шкірі щурів на 38 % (табл. 1), тобто пов’язане з уповільненням розпаду. При дії препарату порівняння спостерігалась тенденція до зменшення ГАГГ-ферментативної активності, проте дані не були достовірними (табл. 1).

Дані літератури вказують на здатність біологічно активних сполук рослинного походження з фітоестрогенною активністю впливати й на синтез гіалуронової кислоти, а саме стимулювати утворення гіалуронової кислоти фібробластами [8].

Під контролем естрогенів перебуває не лише біосинтез гіалуронової кислоти, а й біологічна активність фібробластів у цілому [8, 11]. Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення впливу субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і проліферативну активність фібробластів за умов *in vitro*.

Інкубація фібробластів за присутності як поліфенолів ромашки “Камагелю”, так і субстанції поліфенолів винограду “Полікатехін” достовірно збільшувала вміст гіалуронату в середовищі інкубації на 50 і 81 % відповідно (табл. 2).

Таблиця 1 – Вплив субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і глюкозаміноглікангідролазну активність у шкірі щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Умова досліджу	Показник	
	вміст гіалуронової кислоти, нг/мг білка	ГАГГ-активність, МЕ
Інтакт	$0,73 \pm 0,06$	$14,32 \pm 2,82$
Камагель	$0,89 \pm 0,09^*$	$12,42 \pm 1,39$
Полікатехін	$0,99 \pm 0,09^*$	$8,74 \pm 1,22^*$

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

Таблиця 2 – Вплив субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і проліферативну активність фібробластів ($M \pm m$, $n=6$)

Умова досліджу	Показник	
	вміст гіалуронової кислоти, нг/мг білка	включення [³ H]тимідину, імп/хв/ 10^5 клітин
Інтакт	$0,59 \pm 0,08$	4753 ± 628
Камагель	$0,89 \pm 0,09^*$	$7329 \pm 811^*$
Полікатехін	$1,07 \pm 0,09^*$	$9984 \pm 926^*$

Вікове зменшення рівня естрогенів супроводжується змінами в структурі та біологічній активності фібробластів [6]. Клітини стають товстішими, спостерігається значне гальмування синтезу колагенових волокон. Дані процеси зумовлені, головним чином, зниженням проліферативної активності фібробластів [4]. Вивчення нами проліферативної активності фібробластів за допомогою радіоактивного тимідину показало, що присутність як поліфенолів ромашки, так і субстанції “Полікатехін” збільшує включення міченого тимідину на 77 та 89 % відповідно (табл. 2), тобто поліфеноли підсилюють мітотичну активність цих клітин.

Вищенаведені дані, а також дані про зниження ГАГГ-ферментативної активності за дії

полікатехіну свідчать про те, що підвищення вмісту гіалуронової кислоти у шкірі відбувається як за рахунок підсилення проліферації фібробластів, так і шляхом пригнічення деградації гіалуронату. Встановлені ефекти поліфенолів, імовірно, пов'язані зі здатністю зв'язуватися з рецепторами для естрадіолу та проявляти гормоноподібні ефекти завдяки подібності їх просторової структури до структури 17 β -естрадіолу.

ВИСНОВКИ. Субстанція поліфенолів винограду “Полікатехін” проявляє гіалуронатотропну властивість, що дозволяє рекомендувати її для подальшого вивчення з метою застосування в косметології для корекції вікових змін при старінні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
2. Орасмяз-Медер Т. Пептидные технологии в косметике: тенденции и перспективы / Т. Орасмяз-Медер, Е. Эрнандес // Косметические рецептуры и ингредиенты. – 2010. – № 2. – С. 46–53.
3. Тихонов О. І. Перспективи створення гомеопатичного лікарського засобу у формі мазі для лікування алергічних дерматитів / О. І. Тихонов, Н. А. Чорна, О. А. Красильнікова // Вісник фармації. – 2007. – **50**, № 2. – С. 24–28.
4. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation / R. M. Simpson, S. Meran, D. Thomas [et al.] // *Am J Pathol.* – 2009. – **175**, № 5. – P. 1915–1928.
5. Calleja-Agius J. Skin ageing / J. Calleja-Agius, Y. Muscat-Baron, M. P. Brincat // *Menopause Int.* – 2007. – **13**. – С. 60–64.
6. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to UVB: New insights into mechanisms of matrix remodelling / K. Rock, M. Grando, M. Majora [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011.
7. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium / M. Chalopin, A. Tesse, M. C. Martinez [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – **5**, № 2. – P. 8554.
8. Genistein and daidzein stimulate hyaluronan production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin / K. Miyazaki, T. Hanamizu, R. Iizuka, K. Chiba // *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* – 2002. – **15**, № 3. – P. 175–183.
9. Hyaluronan synthase induction in mouse epidermis following skin injury / R. Tammi, S. Pasonen-Seppanen, E. Kolehmainen, M. Tammi // *J. Invest. Dermatol.* – 2005. – **124**. – P. 895–905.
10. Shah M. G. Estrogen and skin. An overview / M. G. Shah, H. I. Maibach // *Am J Clin Dermatol.* – 2001. – **2**, № 3. – P. 143–150.
11. Stevenson S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs / S. Stevenson, J. Thornton // *Clin Interv Aging.* – 2007. – **2**, № 3. – P. 283–297.
12. Transcriptional regulation of proteoglycans and glycosaminoglycan chain-synthesizing glycosyltransferases by UV irradiation in cultured human dermal fibroblasts / J. E. Shin, J. H. Oh, Y. K. Kim [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* – 2011. – **26**, № 3. – P. 417–424.
13. Wu C. D. Grape products and oral health / C. D. Wu // *J Nutr.* – 2009. – **139**, № 9. – P. 1818–1823.

А. Л. Загайко¹, В. П. Филимоненко¹, О. А. Красильникова¹,
Л. М. Соловьёва², Ю. А. Огай²
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДА И ВИНА "МАГАРАЧ", ЯЛТА

ВЛИЯНИЕ СУБСТАНЦИИ "ПОЛИКАТЕХИН" НА СОДЕРЖАНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОЖЕ КРЫС И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ

Резюме

Применение субстанции полифенолов винограда "Поликатехин" увеличивает содержание гиалуроновой кислоты в коже и изолированных фибробластах крыс. Возрастание уровня гиалуроновой кислоты сопровождается снижением глюкозаминогликангидролазной активности в коже и повышением пролиферативной активности фибробластов. Гиалуронатотропный эффект поликатехина более выражен по сравнению с камагелем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, гиалуроновая кислота, фибробласты, эстрогены, старение кожи.

A. L. Zahayko¹, V. P. Fylymonenko¹, O. A. Krasilnikova¹,
L. M. Solovyova², Yu. O. Oghai²
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV
NATIONAL INSTITUTE OF GRAPE AND WINE "MAGARACH"², YALTA

THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS

Summary

Application of essence of grape's polyphenols "Polykatehin" increases of hyaluronic acid content in rat skin and isolated fibroblasts. The increase of hyaluronic acid level is accompanied by the decrease of glucosaminoglycanhydrolase activity in skin and the elevation of proliferative activity of fibroblasts. Hyaluronatotropic effect of "Polykatehin" is more pronounced versus "Kamagel".

KEY WORDS: polyphenols, hyaluronic acid, fibroblasts, estrogens, skin ageing.

Отримано 05.04.12

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна,
e-mail: andrey.zagayko@gmail.com

І. В. Ніженковська, О. В. Стеченко, А. С. Ягупова, Л. В. Яніцька
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ

БІООРГАНІЧНА ТА БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ НА МЕДИКО-ПСИХОЛОГІЧНОМУ ФАКУЛЬТЕТІ: СТАН ВИКЛАДАННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Стаття присвячена аналізу структури навчальної програми з дисципліни “Біологічна та біоорганічна хімія” для студентів медико-психологічного факультету, створеної відповідно до вимог кредитно-модульної системи викладання медичних дисциплін у вищих медичних навчальних закладах України в контексті Болонського процесу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: біоорганічна та біологічна хімія, Болонський процес, кредитно-модульна система, навчально-методичне забезпечення дисципліни, медико-психологічний факультет.

Стратегічна мета підготовки фахівців зі спеціальності “Медична психологія” у вищих медичних навчальних закладах України передбачає формування в них вмінь інтерпретувати значення біохімічних процесів метаболізму в забезпеченні функціонування органів, систем та організму людини в цілому; аналізувати ферментативні процеси в нормі та за умов патологій; використовувати результати біохімічних досліджень для діагностики хвороб людини і пояснювати основні механізми біохімічної дії та принципів спрямованого застосування різних груп лікарських засобів [6]. Саме тому перехід на кредитно-модульну систему організації навчального процесу (КМСОНП) за спеціальністю “Медична психологія” активізував роботу зі створення методичного забезпечення викладання дисципліни “Біологічна та біоорганічна хімія”, розпочату кафедрою біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця [1, 4, 5] як опорною.

У зв'язку з впровадженням у вищих медичних навчальних закладах України для медико-психологічних факультетів КМС, необхідно було розробити відповідну навчальну програму з курсу “Біологічна та біоорганічна хімія”. Програму з біологічної та біоорганічної хімії для вищих медичних закладів освіти України III–IV рівнів акредитації розроблено для спеціальності “Медична психологія” 7.110110 напряду

підготовки 1101 “Медицина” згідно з освітньо-кваліфікаційними характеристиками і освітньо-професійними програмами підготовки фахівців, затвердженими наказом МОН України № 239 від 16.04.2003 р., та відповідно до нового навчального плану МОЗ України, затвердженого наказом № 540 від 08.07.2010 р. Зазначений навчальний план змінив кількість годин, виділених для викладання біоорганічної та біологічної хімії (табл. 1).

Таким чином, новим навчальним планом не передбачено збільшення кількості годин лекцій та практичних занять для біоорганічної хімії, але значно було зменшено кількість годин лекцій з біологічної хімії (10 год порівняно з 40) та на 45 год збільшено обсяг самостійної роботи студентів (СРС) саме з біологічної хімії. Така структура навчального навантаження в цілому позитивна і мала б призвести до підвищення рівня підготовки студентів, особливо щодо засвоєння навчальної програми з біологічної хімії на II курсі. Проте нелогічним є зменшення, порівняно з навчальним планом 2007 р. (та порівняно з навчальним планом за спеціальностями “Лікувальна справа”, “Педіатрія” та “Медико-профілактична справа”), кількості годин, виділених на лекційний курс з біологічної хімії, хоча саме ця дисципліна є складовою ліцензованого інтегрованого іспиту “Крок-1. Загальна лікарська підготовка”, який у 2012 р. вперше будуть складати як обов'язковий студенти III курсу медико-психологічного факультету, відсоток питань з якої

© І. В. Ніженковська, О. В. Стеченко, А. С. Ягупова, Л. В. Яніцька, 2012.

Таблиця 1 – Порівняльний аналіз годин з біоорганічної та біологічної хімії за навчальними планами 2007 та 2010 рр. за спеціальністю “Медична психологія”

Години навчального плану 2007 р.		Години навчального плану 2010 р.	
Біоорганічна хімія (I курс)			
Всього	60	Всього	60
Лекцій	10	Лекцій	10
Практичних	30	Практичних	30
СРС	20	СРС	20
Біологічна хімія (II курс)			
Всього	210	Всього	225
Лекцій	40	Лекцій	10
Практичних	120	Практичних	120
СРС	50	СРС	95

коливається в межах 8–17 %. Зокрема, на 30 год пропонується зменшити лекції, проте на 45 год – збільшити СРС.

Кафедра біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії як опорна з біологічної та біоорганічної хімії для спеціальності “Медична психологія” запропонувала скорегувати розподіл годин у III–IV семестрах навчання, що знайшло підтримку в рішенні Циклової методичної комісії НМУ імені О. О. Богомольця з фізико-хімічних дисциплін: 40 год (як і на медичних факультетах за спеціальностями “Лікувальна справа”, “Педіатрія” та “Медико-профілактична справа”) виділено на лекції, що реалізується за рахунок зменшення годин, передбачених на СРС, з 95 до 65. Отже, означений тематичний перерозподіл між лекційними годинами і годинами, призначеними для самостійної підготовки студентів, дозволив зберегти суттєве наповнення модулів і збільшити мотивацію студентів до вивчення дисципліни в цілому. Такі зміни були визнані, та в цілому Програму з біологічної та біоорганічної хімії для вищих медичних закладів освіти України III–IV рівнів акредитації для спеціальності “Медична психологія” 7.110110 напямку підготовки 1101 “Медицина” затвердив Центральний методичний кабінет з вищої медичної освіти МОЗ України 1 липня 2010 р. та МОЗ України 23 липня 2010 р.

Студентам медико-психологічного факультету пропонується вивчати біоорганічну хімію протягом одного (I або II) семестру 1-го року навчання, а біологічну хімію – впродовж двох (III та IV) семестрів 2-го року навчання.

Біологічна та біоорганічна хімія як навчальна дисципліна базується на вивченні студентами таких дисциплін, як “Медична біологія”, “Біофізика”, “Медична хімія”, морфологічних дисциплін, і закладає основи вивчення студентами молекулярної біології, генетики, фізіології, патології, загальної та молекулярної фармакології, токсикології та пропедевтики

внутрішніх хвороб, що передбачає інтеграцію викладання з відповідними дисциплінами та формування вмінь застосовувати знання з біологічної та біоорганічної хімії, насамперед щодо біохімічних та окремих патобіохімічних процесів, які мають місце в організмі людини, в процесі подальшого навчання і професійної діяльності. Завдяки засвоєнню біоорганічної та біологічної хімії закладаються основи клінічної діагностики найпоширеніших захворювань, моніторингу перебігу захворювання, контролю за ефективністю застосування лікарських засобів та заходів, спрямованих на попередження виникнення та розвитку патологічних процесів.

Видами навчальної діяльності, згідно з навчальним планом, є лекції, практичні заняття, самостійна робота студентів. Теми лекційного курсу розкривають проблемні питання відповідних розділів біологічної та біоорганічної хімії. Зокрема, теми лекцій з модуля 1 висвітлюють основи будови та хімічних властивостей біологічно важливих класів біомолекул: вуглеводів, карбонових кислот, ліпідів, амінокислот та білків, гетероциклічних сполук, нуклеїнових кислот. Для модуля 2 передбачено лекції, що розкривають питання загальних закономірностей обміну речовин (вуглеводів, ліпідів, амінокислот) та основ його регуляції. Лекції з модуля 3 присвячені висвітленню питань молекулярної біології, біохімії гормонів та функціональної біохімії органів і тканин.

Практичні заняття за методикою їх організації є лабораторно-практичними і передбачають: лабораторні дослідження з виявлення класів біоорганічних сполук за властивостями їх функціональних груп; проведення якісних реакцій та оцінку показників при лабораторному дослідженні розчинів; дослідження клініко-біохімічних показників проміжних інтермедіатів та кінцевих продуктів обміну в основних рідинах організму в нормі та при розвитку патологічних процесів; розв’язування

ситуаційних задач (оцінка клініко-біохімічних показників, що характеризують функції та параметри гомеостазу, а також встановлення механізмів регуляції метаболічних процесів тощо), які мають експериментальне або клініко-біохімічне спрямування. Важливим етапом заняття є узагальнення одержаної під час експерименту інформації, оформлення протоколу та формулювання висновку.

На практичних заняттях особливу увагу пропонується звернути на будову, хімічні властивості та роль тих класів біоорганічних сполук, які є найбільш важливими для функціонування саме нервової тканини та здійснення нервово-психічних актів: глюкози, галактози, фруктози, гомо- та гетерополісахаридів, олігосахаридів, карбонових кислот та їх похідних (насамперед ацетилхоліну), ВЖК та ліпідів (особливо фосфоліпідів, гліко- та сфінголіпідів), амінокислот, пептидів, білків тощо.

Засвоєння тем (поточний контроль) контролюють на заняттях, згідно з конкретними цілями, шляхом тестування, розв'язування ситуаційних задач, виконання лабораторних досліджень, трактування та оцінки їх результатів, контролю практичних навичок. Підсумковий контроль засвоєння знань студентів проводять шляхом тестування, розв'язування ситуаційних задач відповідно до вимог ліцензійного інтегрованого іспиту "Крок-1".

Нову програму дисципліни структуровано на 3 модулі, до складу яких входять блоки змістових модулів:

Модуль 1. Біологічно важливі класи біоорганічних сполук. Біополімери та їх структурні компоненти. Вивчення змісту модуля дає змогу сформулювати загальні уявлення про теоретичні основи будови та реакційної здатності біоорганічних сполук, вуглеводи, карбонові кислоти та їх функціональні похідні, ліпіди, α -амінокислоти, пептиди, білки, біологічно активні гетероциклічні сполуки, нуклеозиди, нуклеотиди, нуклеїнові кислоти.

Модуль 2. Загальні закономірності метаболізму. Метаболізм вуглеводів, ліпідів, амінокислот та його регуляція. Завдяки вивченню модуля розвиваються основні уявлення про біохімічні компоненти клітин, формується чітке знання будови, класифікації та механізмів функціонування ферментів і коферментів, закладаються основи розуміння шляхів регуляції метаболізму. Студенти опановують основні закономірності обміну речовин та енергії в організмі та на рівні молекулярних процесів у клітинах, в тому числі нейронах, вивчають функціонування та регуляцію циклу трикарбонових кислот, молекулярні основи біоенергетики та особливості цих процесів у нервовій тканині. Засвоєння матеріалу модуля формує знання про метаболізм вуглеводів, ліпідів та білків, амінокислот і їх регуляцію.

Модуль 3. Молекулярна біологія. Біохімія гормонів та фізіологічних функцій. Зміст модуля дозволяє сформулювати та розвинути у студентів розуміння основ молекулярної біології, молекулярної генетики, молекулярних механізмів дії гормонів на клітини-мішені, біохімії гормональної регуляції. Студенти опановують біохімію харчування людини, значення вітамінів як компонентів харчування, особливості їх впливу на функціонування нервової системи і психіки, біохімію та патобіохімію крові, функціональну та клінічну біохімію органів і тканин, зокрема нервової. Значну увагу приділено медіаторним процесам як молекулярній основі передачі нервового імпульсу.

Підсумковий модульний контроль (ПМК) проводять після їх завершення (табл. 2). Оцінка успішності студента з дисципліни є рейтинговою, її виставляють за багатобальною шкалою як середню арифметичну оцінку засвоєння відповідних модулів, вона має визначення за системою ECTS та за традиційною шкалою, прийнятою в Україні [2, 3, 7].

У модулі 1 передбачається 5 двогодинних лекцій, 9 тригодинних практичних занять і

Таблиця 2 – Опис навчального плану з дисципліни "Біологічна та біоорганічна хімія" для студентів медико-психологічного факультету

Структура навчальної дисципліни	Кількість годин, з них				Курс	Вид контролю
	всього, годин/кредитів	аудиторних		CPC		
		лекцій	практ. занять			
		285	50	150		
Кредити ECTS	9,5					
Модуль 1	60/2,0	10	30	20	I	Поточний та ПМК (стандартизований)
Модуль 2	110/3,7	20	60	30	II	Поточний та ПМК (стандартизований)
Модуль 3	115/3,8	20	60	35	II	Поточний та ПМК (стандартизований)

Примітка. Аудиторна робота – 70 %, CPC – 30 %.

3 год на ПМК. Модуль 2 має 10 лекцій, 19 тригодинних практичних занять і 3 год на ПМК. У модулі 3 також передбачено 10 лекцій, 19 тригодинних практичних занять і 3 год на ПМК. Як бачимо, викладання біологічної хімії (II курс, модулі 2 та 3) триває 40 тижнів, що відповідає тривалості навчального року за КМСОНП. Саме такі структура модулів (табл. 3) і тривалість занять дозволять максимально використати

основні переваги нової системи організації навчання з метою оптимізації підготовки студентів за спеціальністю “Медична психологія”.

КМСОНП є потужним важелем мотивування студентів до систематичного навчання протягом навчального року [3]. Кращі студенти за бажанням виконують індивідуальну самостійну роботу (ICPC), яку додатково оцінюють.

Таблиця 3 – Структура дисципліни (кількість модулів; кількість змістових модулів, практичних або семінарських занять у модулі, оцінювання при вивченні модулів)

№ модуля, кількість навчальних годин/кількість кредитів ECTS	Змістовий модуль	Кількість практичних занять (без ПМК)	Бали, які нараховують студентам					Мінімальна кількість балів* (поточна+ ПМК/загальна)
			за оцінки на заняттях				за ICPC	
			“5”	“4”	“3”	“2”		
Модуль 1 60/2,0	4 (№ 1–4)	9	12	10	8	2	12	72+50/122
Модуль 2 110/3,7	7 (№ 5–11)	19	6	5	4	1,3	6	76+50/126
Модуль 3 115/3,8	7 (№ 12–18)	19	6	5	4	1,3	6	76+50/126

Примітка. * – мінімальна кількість балів, яку повинен набрати студент за поточну навчальну діяльність при вивченні даного модуля, щоб бути допущеним до складання підсумкового модульного контролю.

ВИСНОВКИ. 1. Впровадження інноваційної навчальної програми з дисципліни “Біологічна та біоорганічна хімія”, створеної відповідно до вимог КМСОНП, у навчальний процес ВНЗ України для медико-психологічних факультетів буде сприяти підвищенню ефективності навчального процесу, що передбачено стратегічними завданнями підготовки спеціалістів.

2. Подальшого доопрацювання вимагають форми контролю рівня засвоєння студентами знань, вмінь та навчального матеріалу, а також методичне забезпечення практичних занять з біологічної та біоорганічної хімії для медико-психологічного факультету.

3. На підготовку фахівців спеціальності “Медична психологія” 7.110110 на пряму підготовки 1101 “Медицина” позитивно вплине збільшення кількості годин, відведених на СРС, відповідно до нового навчального плану, що зумовлює необхідність розробки спеціальних методів контролю цього виду діяльності студентів.

4. Впровадження нової навчальної програми для медико-психологічного факультету спрямоване на підвищення мотивації до засвоєння біологічної та біоорганічної хімії цієї категорії студентів, що повинно позитивно вплинути на рівень їх фахової підготовки в цілому.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Активізація навчального процесу шляхом інтеграції викладання структурної, функціональної та клінічної біохімії / Ю. І. Губський, М. М. Великий, О. В. Стеченко, Л. В. Яніцька // Інтеграція викладання – запорука ефективного навчання : матеріали навч.-метод. конф. – К., 2005. – С. 44–45.
2. Вища медична освіта і Болонський процес : навчально-методичні та інформаційно-довідкові матеріали / [В. Ф. Москаленко, О. П. Волосовець, О. П. Яворовський та ін.]. – Частина I. – К. : НМУ, 2005. – 98 с.
3. Вища медична освіта і Болонський процес :

навчально-методичні та інформаційно-довідкові матеріали / [В. Ф. Москаленко, О. П. Волосовець, О. П. Яворовський та ін.]. – Частина II. – К. : НМУ, 2005. – 112 с.

4. Губський Ю. І. Кредитно-модульна система організації навчального процесу при вивченні навчальної дисципліни “Біологічна та біоорганічна хімія” / Ю. І. Губський, М. М. Великий, Л. В. Яніцька // Досвід впровадження основних засад Болонського процесу в систему вищої медичної (фармацевтичної) освіти : тези доп. наук.-метод. конф. МОЗ України. – Тернопіль, 2005. – С. 208–210.

5. Досвід кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії НМУ з методичного забезпечення викладання дисципліни “Біологічна та біоорганічна хімія” в умовах запровадження кредитно-модульної системи / Ю. І. Губський, О. В. Задоріна, А. С. Ягупова [та ін.] // Мед. освіта. – 2007. – № 3. – С. 38–40.

6. Москаленко В. Ф. Система забезпечення якості підготовки медичних кадрів в Україні /

В. Ф. Москаленко, І. Є. Булах, О. П. Волосовець. – К. : Книга плюс, 2007. – 40 с.

7. Тимчасове положення про організацію навчального процесу в кредитно-модульній системі підготовки фахівців (затверджено наказом МОН України від 23.01.2004 р. № 48) // Основні засади розвитку вищої освіти України в контексті Болонського процесу : збірник документів та матеріалів 2003–2004 рр. – Київ–Тернопіль, 2004. – С. 105–111.

И. В. Ниженковская, Е. В. Стеченко, А. С. Ягупова, Л. В. Яницкая
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ

БИООРГАНИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НА МЕДИКО-ПСИХОЛОГИЧЕСКОМ ФАКУЛЬТЕТЕ: СОСТОЯНИЕ ПРЕПОДАВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Резюме

Статья посвящена анализу структуры учебной программы с дисциплины “Биологическая и биоорганическая химия” для студентов медико-психологического факультета, созданной в соответствии с требованиями кредитно-модульной системы преподавания медицинских дисциплин в высших медицинских учебных заведениях Украины в контексте Болонского процесса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **биоорганическая и биологическая химия, Болонский процесс, кредитно-модульная система, учебно-методическое обеспечение дисциплины, медико-психологический факультет.**

I. V. Nizhenkovska, O. V. Stechenko, A. S. Yahupova, L. V. Yanitska
O. O. BOHOMOLET'S NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, KYIV

THE TEACHING OF BIOORGANIC AND BIOLOGICAL CHEMISTRY IN THE MEDICAL-PSYCHOLOGICAL DEPARTMENT: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

Summary

In the article the new arrangement of the teaching programme of course of the educational discipline “Biological and bioorganic chemistry” for medical-psychological department's students is presented. The programme is worked out according to the credite-modular system of education envisaged by the Bologna process.

KEY WORDS: **bioorganic and biochemistry, Bologna process, credit-modular system, educational discipline mastering, medical-psychological departament.**

Отримано 22.11.11

Адреса для листування: О. В. Стеченко, вул. Драгоманова, 42-А, кв. 88, Київ-68, 02068, Україна.