
СПІВЗАСНОВНИКИ

Національна академія медичних наук України •
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України» •
Державне підприємство «Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України» •
Всеукраїнська громадська організація «Асоціація фармакологів України»

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 6(36)/2013

ЗМІСТ

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Беленичев І. Ф., Егоров А. А. Соединения L-лизина в фармакокоррекции
нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании
геморрагического инсульта.....3

Семененко А. І. Динаміка активності нейрон-специфічної енолази
та вмісту білка S 100 у крові щурів за умов гострого порушення мозкового
кровообігу та курсового введення 0,9 % розчину NaCl9

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Бухтіярова І. П. Вивчення гіполіпідемічних властивостей ралейкіну на моделі
стрептозоцинового діабету в щурів 14

Зеленський Д. С., Бондар В. М., Жуковский О. І., Поляков В. І.,
Соловьев А. І. Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої
кислоти на скорочення ізольованих фрагментів аорти щурів
та внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} 19

Мончак І. Л., Жуковский О. І., Поляков В. І., Бондарь В. Н., Соловьев А. І.
Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на
сократительную активность воротной вены крыс в условиях гипоксии *in vitro* 25

Нагорна О. О., Стежка В. А. Вплив ірбесартану на активність
вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у щурів з уродженою
стрес-індукованою артеріальною гіпертензією.....32

Степанова К. О. Вивчення лікувальних властивостей нових
песаріїв «Клімедекс» за умов експериментального вагініту39

<i>Шаяхметова Г. М.</i> Вплив етамбутолу на структурно-функціональні показники гонад та фертильність щурів-самців	45
<i>Шебалдова К. О., Кравець Д. С., Лук'янчук В. Д., Сейфулліна І. Й., Марцинко О. Е.</i> Порівняльна фармакокінетика ВІТАГЕРМ-3 у нормі та за умов гострої гіперкапнічної гіпоксії	51
<i>Яковлева Л. В., Єгорова О. О., Кошова О. Ю.</i> Експериментальне обґрунтування корекції Елгацином гіпофункції сім'яників щурів	56
<i>Kizub I. V., Klymenko K. I., Soloviev A. I.</i> Endothelium-dependent sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction can be mediated by signaling via myoendothelial gap junctions	64

події

Х Національна школа молодих вчених-фармакологів імені академіка НАМН України <i>О. В. Стефанова</i>	70
<i>Беленичев И. Ф.</i> Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции	72
<i>Головенко Н. Я.</i> Контуры будущего фармакологии	81
<i>Губський Ю. І.</i> Проблема болю в паліативній медицині: соціальний виклик та молекулярна фармакологія	85
<i>Мамчур В. И.</i> Два препарата, один организм – механизмы взаимодействия при коморбидной патологии	91
<i>Резников А. Г.</i> Методология тестирования противоопухолевой активности фармакологических препаратов на нефросубкапсулярных ксенографтах у мышей	96
<i>Соловьев А. И.</i> Ионные каналы как фармакологические мишени. Время смены парадигм классической фармакотерапии	101

СОДЕРЖАНИЕ	107
-------------------------	-----

CONTENT	108
----------------------	-----

И. Ф. Беленичев, А. А. Егоров

Соединения L-лизина в фармакокоррекции нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, L-лизин, нейропротекция, энергетический метаболизм

Несмотря на достигнутые успехи современной нейрофармакологии, проблема разработки и создания высокоэффективных нейропротективных средств для лечения последствий геморрагического инсульта остается актуальной. Одним из основных механизмов развития нейродеструкции в условиях геморрагического инсульта является выраженный энергодефицит. Основываясь на этом, одним из перспективных направлений фармакотерапии церебральной гипоксии является поиск новых соединений, действие которых было бы направлено на восстановление биоэнергетических процессов головного мозга [1–3].

В настоящее время наиболее перспективным метаболитотропным препаратом с выраженным энерготропным и антиоксидантным эффектами является тиотриазолин, широко применяемый в клинической неврологии [4–5].

Имеется многолетний опыт успешного применения препаратов янтарной кислоты в неврологической и кардиологической практике с целью коррекции гипоксических состояний [2, 5]. В качестве базовой молекулы для создания нейропротекторов, пристальный интерес вызывает незаменимая аминокислота L-лизин, которая посредством биотрансформации в пипеколовую кислоту способна усиливать аффинность ГАМК-бензодиазепин-рецепторного комплекса [6–7].

С целью получения высокоэффективных нейропротекторов с энерготроп-

ным механизмом действия на кафедре фармацевтической химии ЗГМУ под руководством профессора И. А. Мазура были получены новые соединения – L-лизина сукцинат и L-лизиний 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиоацетат (рабочее название «Лизиний») [8–9].

Нашими предыдущими исследованиями была показана высокая нейропротективная активность L-лизина сукцината и «Лизиния» на модели острого нарушения мозгового кровообращения по типу ишемического инсульта [10]. Однако эффективность соединений L-лизина на модели геморрагического инсульта остается не изученной.

Цель исследования – изучение энерготропных свойств соединений L-лизина в условиях моделирования интрацеребрального кровоизлияния.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Геморрагический инсульт (ГИ) моделировали путем введения во внутреннюю капсулу головного мозга аутокрови, взятой из хвостовой вены животного (20 мкл/100 г). Для проведения всех манипуляций животное наркотизировали тиопенталом натрия (40 мг/кг). После достижения полной анестезии крысу размещали на операционном столе спиной вверх и отбирали 50–100 мкл крови из боковой хвостовой вены. Инсулиновый шприц предварительно промывали раствором гепарина (5 МО/мл) для предупреждения свертывания крови в его просвете. После фиксации крысы в стереотаксическом аппарате на участке свода черепа состригали шерсть и обрабатывали поверхность 96 % этиловым спиртом, затем скальпелем рассекали кожу головы по сагиттальной линии и

с помощью микробура делали небольшое отверстие в надкостнице согласно координатам проекции: Н = 7,0 мм, L = 3,0 мм, А = 1,5 мм от брегмы. Кровь в ткань мозга вводили медленно, в течение 3–4 мин. После окончания инфузии иглу оставляли на месте в течение 5 мин, после чего извлекали, а кожу на голове зашивали узловым швом и обрабатывали края спиртовым раствором бриллиантового зеленого [11].

Животные были разделены на 8 экспериментальных групп по 10 животных. Первая группа – интактные животные, вторая – животные с ГИ, третья – животные с ГИ и введением L-лизина гидрохлорида (50 мг/кг), четвертая – животные с ГИ и введением L-лизина сукцината (50 мг/кг), пятая – животные с ГИ и введением L-лизина эсцината (50 мг/кг), шестая – животные с ГИ и введением «Лизиния» (50 мг/кг), седьмая – животные с ГИ и введением тиотриазолина (50 мг/кг), восьмая – животные с ГИ и введением пирацетама (500 мг/кг). Изучаемые препараты вводили внутривентрикулярно сразу после выхода животных из наркоза, один раз в сутки в течение 4 дней.

Неврологический дефицит у животных определяли по шкале stroke – index С. Р. McGrow [12].

По истечении срока наблюдения животных выводили из эксперимента под этиаминал-натриевым наркозом путем декапитации. В гомогенате головного мозга, приготовленного по стандартной методике, определяли содержание пирувата, лактата и малата [13]. Содержание адениловых нуклеотидов – аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ) – проводили хроматографическим методом [14].

Сравнение групп проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., № АХХ R712D833214SAN5), «Microsoft Excel 2003».

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного экспериментального исследования нами было отмечено снижение количества выживших подопытных животных. Так, в группе животных с моделированием ГИ процент выживших животных составил 30. Процент выживших животных на фоне назначения исследуемых соединений составил от 60 до 90 (табл. 1).

Моделирование ГИ приводило на 4 сутки эксперимента к выраженному

Таблица 1

Выживаемость и показатели неврологического дефицита у животных на 4 сутки геморрагического инсульта в условиях применения соединений L-лизина

Группа животных	Средний бал по шкале С. Р. McGrow	Количество выживших животных, %
Ложнооперированные животные (n = 10)	0,30 ± 0,15	100
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	14,83 ± 2,01	30
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	13,17 ± 2,18	60
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	10,29 ± 1,71	70
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	7,63 ± 1,35*	80
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	4,33 ± 0,78* ^{§Δ}	90
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	8,75 ± 1,10*	80
Животные с ГИ + пирацетам (n = 5)	12,40 ± 2,42	50

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: * $p < 0,05$ по отношению к контролю; $^{\Delta}p < 0,05$ по отношению к группе с введением тиотриазолина; $^{\S}p < 0,05$ по отношению к группе с введением пирацетама.

неврологическому дефициту у подопытных животных. Так, в контрольной группе животных средний бал по шкале С.Р. McGrow составил 14,83, что свидетельствует о тяжелой степени неврологического дефицита. Введение соединений L-лизина на фоне моделирования ГИ восстанавливало неврологический статус на 12,7–242 %. Наибольшая активность отмечается в группе животных, получавших «Лизиний» в дозе 50 мг/кг, где средний бал по шкале С.Р. McGrow составил 4,33, что на 240 % ниже относительно группы контроля ($p < 0,05$) (табл. 1).

Одним из наиболее важных звеньев ишемического поражения нейрона является нарушение энергетического метаболизма головного мозга. Это выражается в снижении содержания АТФ и АДФ на фоне увеличения содержания АМФ.

На 4 сутки после моделирования геморрагического инсульта в мозге животных контрольной группы отмечается резкое снижение содержания АТФ и АДФ на 180 % и 74 % соответственно на фоне увеличения АМФ на 49 % относительно ложнооперированных животных (табл. 2).

Применения соединений L-лизина приводило к увеличению содержания АТФ на 18–148 % и АДФ на 15–62 % соответственно при уменьшении содержания АМФ на 6–46 % относительно группы контроля. Наибольшую активность отмечали в экспериментальных

группах с введением L-лизина сукцината и «Лизиния». L-лизина сукцинат за счет наличия в его структурной формуле янтарной кислоты увеличивал концентрацию АТФ и АДФ на 110 % и 48 % соответственно на фоне снижения количества АМФ на 44 % по отношению к группе нелеченых животных. Введения «Лизиния», в химическую формулу которого включен фрагмент тиотриазолина, привело к увеличению АТФ и АДФ на 150 % и на 62 % соответственно на фоне уменьшения содержания АМФ на 46 % относительно контроля (табл. 2).

На фоне нарушения содержания энергетических фосфатов отмечается выраженный дисбаланс субстратов углеводно-энергетического обмена, что проявляется в снижении концентрации малата и пирувата. Так, на 4 сутки моделирования ГИ отмечается уменьшение концентрации малата и пирувата в ткани мозга в 1,8 и 1,1 раза соответственно при значительном увеличении концентрации лактата в 2,4 раза относительно группы ложнооперированных животных (табл. 3).

Введение подопытным животным соединений L-лизина приводило к нормализации концентрации субстратов энергетического обмена. Так, на фоне введения соединений L-лизина на 4 сутки моделирования ГИ концентрация малата увеличивалась на 13–87 %, пирувата на 18–136 %, а концентрация лактата уменьшалась на 9–76 % отно-

Таблица 2

Содержание адениловых нуклеотидов в головном мозге крыс на 4 сутки ГИ в условиях применения соединений L-лизина, $M \pm m$

Группа животных	АТФ, мкмоль/г ткани	АДФ, мкмоль/г ткани	АМФ, мкмоль/г ткани
Ложнооперированные животные (n = 10)	2,95 ± 0,09	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,01
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	1,05 ± 0,07	0,26 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	1,23 ± 0,10	0,30 ± 0,03	0,18 ± 0,02
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	2,24 ± 0,28*	0,39 ± 0,04*	0,14 ± 0,01* [§]
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	1,72 ± 0,08*	0,34 ± 0,03	0,16 ± 0,01
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	2,60 ± 0,21* ^{§Δ}	0,42 ± 0,03*	0,13 ± 0,01* ^{§Δ}
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	1,95 ± 0,06* [§]	0,39 ± 0,03*	0,15 ± 0,01*
Животные с ГИ + пирacetам (n = 5)	1,49 ± 0,12*	0,36 ± 0,04	0,17 ± 0,01

Показатели углеводно-энергетического обмена в головном мозге животных на 4 сутки геморрагического инсульта в условиях применения соединений L-лизина, $M \pm m$

Группа животных	Пируват, мкмоль/г ткани	Лактат, мкмоль/г ткани	Малат, мкмоль/г ткани
Ложнооперированные животные (n = 10)	0,48 ± 0,02	2,23 ± 0,07	0,30 ± 0,03
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	0,23 ± 0,02	7,47 ± 0,18	0,11 ± 0,01
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	0,26 ± 0,03	6,83 ± 0,25 [§]	0,13 ± 0,02
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	0,41 ± 0,02* [§]	5,90 ± 0,28* [§]	0,19 ± 0,04
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	0,30 ± 0,02	6,34 ± 0,18* [§]	0,16 ± 0,03
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	0,43 ± 0,02* [§]	4,24 ± 0,12* ^{§Δ}	0,26 ± 0,02* [§]
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	0,36 ± 0,02*	5,64 ± 0,11* [§]	0,20 ± 0,02*
Животные с ГИ + пирацетам (n = 5)	0,30 ± 0,02*	10,04 ± 0,41	0,15 ± 0,02

сительно группы контроля. Наибольшую активность проявили L-лизина сукцинат и «Лизиний». Так, введение L-лизина сукцината приводило к увеличению концентрации малата и пирувата на 73 % и 78 % соответственно, концентрация лактата уменьшалась на 27 % относительно контрольной группы. Экспериментальная терапия «Лизинием» в дозе 50 мг/кг приводила к увеличению концентрации малата и пирувата на 87 % и 136 % соответственно на фоне уменьшения концентрации лактата на 76 % (табл. 3).

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о высокой нейропротективной и энерготропной активности изучаемых соединений L-лизина. Анализ данных литературы последних лет показал, что в условиях ишемического повреждения головного мозга активность процессов цикла Кребса, контролируемых цитратсинтеазой и α -кетоглутаратдегидроге-

назой, существенно угнетена и реализация компенсаторного сукцинатоксидазного механизма затруднена [15]. Однако продукция АТФ, хотя и на более низком уровне, осуществляется. Это предполагает наличие других компенсаторных механизмов энергопродукции – повышение содержания малата и активности митохондриальной малатдегидрогеназы, что свидетельствует об активации малат-аспартатного механизма [2, 15]. В связи с этим, энерготропная активность соединения L-лизина сукцината в значительной степени снижается в условиях нарушения мозгового кровообращения. Тогда как «Лизиний», в структурной формуле которого присутствует фрагмент структуры тиотриазолина – 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, оказывает более выраженное энерготропное действие, которое, возможно, реализуется через активацию малат-аспартатного механизма [2, 15–16].

1. Стадник В. М. Нейровізуалізація в діагностиці церебрального інсульту / В. М. Стадник, В. В. Куценко // Здоров'я України. – 2010. – № 1, березень. – С. 78.
2. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др.]. – Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009. – 262 с.
3. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: Медицина, 2003 – 328 с.
4. Тиотриазолин – фармакологические аспекты и клиническое применение / [И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман и др.]. – Запорожье; Львов, 2005. – 145 с.
5. Метаболитотропные препараты / [И. А. Мазур, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев та ін.]. – Запорожье, 2007. – 309 с.

6. Северьянова Л. А. Нейротропные эффекты L-лизина у крыс / Л. А. Северьянова, И. И. Бобынцев, М. Е. Долгинцев // Сб. тр. 71 науч. конф. КГМУ и сес. ЦНЦ РАМН «Университетская наука: взгляд в будущее». Т. 1. – Курск, 2006. – С. 12–13.
7. Долгинцев М. Е. Влияние аминокислоты L-лизина на различные виды боли / М. Е. Долгинцев // Материалы XI межвуз. конф. молодых ученых. «Актуальные проблемы патофизиологии». – СПб., 2005. – С. 18–20.
8. Пат. № 86668, Україна, МПК C07D 249/08 (2006.01), A61K 31/4196 (2006.01), A61P 9/00, A61P 9/10 (2006.01), A61P 25/28 (2006.01). Лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М. [та ін.] ; заявник та патентовласник ТОВ «НВО Фарматрон». – № а200705865; заявл. 25.10.07; опубл. 12.05.09, Бюл. № 9.
9. Некоторые аспекты эндотелиопротективного и метаболитотропного кардиопротектора «Лизиний» / И. Ф. Беленічев, Н. В. Бухтиярова, Ю. М. Колесник, И. А. Мазур // Фармация України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 15–17 вер. 2010 р. – Х., 2010. – С. 114–115.
10. Беленічев І. Ф. Вплив нового похідного L-лізину на показники окислювального стресу та розвиток неврологічного дефіциту у тварин з гострим порушенням мозкового кровообігу / І. Ф. Беленічев, А. А. Єгоров, І. А. Мазур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 3 (16). – С. 17–20.
11. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 527 с.
12. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – V. 34, № 6. – P. 334–336.
13. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
14. Захарова Н. В., Рибин В. И. // Лаб. дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
15. Malate-Aspartate Shunt in Neuronal Adaptation to Ischemic Conditions: Molecular–Biochemical Mechanisms of Activation and Regulation / I. F. Belenichev, Yu. M. Kolesnik, S. V. Pavlov [et al.] // Neurochemical Journal. – 2012. – V. 6, № 1. – P. 22–28.
16. Биохимические механизмы регуляции продукции энергии в условиях экспериментальной острой церебральной ишемии / Ю. М. Колесник, И. С. Чекман, И. Ф. Беленічев [и др.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2011. – № 9. – С. 165–170.

І. Ф. Беленічев, А. А. Єгоров

Сполуки L-лізину в фармакокорекції порушень енергетичного метаболізму головного мозку при моделюванні геморагічного інсульту

Стаття присвячена вивченню фармакологічних властивостей сполук L-лізину за умов моделювання геморагічного інсульту. За умов гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом на 4 добу експерименту спостерігається різке погіршення неврологічного статусу експериментальних тварин. На фоні введення сполук L-лізину в дозі 50 мг/кг відмічається зменшення неврологічного дефіциту, особливо в групах з введенням L-лізину есцинату, L-лізину сукцинату та «Лізинію». На 4 добу після відтворення геморагічного інсульту встановлено значне зменшення вмісту АТФ, АДФ, малату та пірувату на фоні підвищення вмісту лактату та АМФ в гомогенаті головного мозку, що свідчить про порушення енергетичного метаболізму. Експериментальна терапія сполуками L-лізину сприяла відновленню енергопродукції на 4 добу геморагічного інсульту. Найактивнішими енерготропними сполуками виявилися L-лізину сукцинат та «Лізиній», які підвищували вміст АТФ, АДФ, малату та пірувату, та знижували вміст АМФ та лактату. На нашу думку, висока енерготропна активність L-лізину сукцинату реалізується за рахунок активації шунта Робертса. Механізм дії «Лізинію» зумовлений наявністю в структурі цієї сполуки кислотного залишку тіотриазоліну, який має здатність активувати малат-аспартатний механізм продукції енергії. Ґрунтуючись на отриманих результатах, можна стверджувати про наявність у сполук L-лізину нейропротективної та енерготропної активності.

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, L-лізін, нейропротекція, енергетичний метаболізм

I. F. Belenichev, A. A. Egorov

Compounds of L-lysine in pharmacocorrection of disorders of energy metabolism of the brain in the modeling of hemorrhagic stroke

This article describes the results of investigation of influence of L-lysine compounds (hydrochloride, succinate, aescinate and 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate – «Lysinium») under hemorrhagic stroke modeling. Acute disturbance of cerebral circulation (type of hemorrhagic stroke) modeled by injection of autologous blood (20 mkg/ml) in the internal capsule of brain of albino male rats weighing 180–200 g. Compounds of L-lysine were injected intraperitoneally in dosage 50 mg/kg to the animals with hemorrhagic stroke daily from the 1st to 4th day. On the 4th day, injection of compounds of L-lysine to the experimental

animals with intracerebral hemorrhage resulted in decreasing of neurological deficit on 1,66–10,5 units by the C. P. McGrow scale as compared the control group. The greatest activity was shown with L-lysine succinate and L-lysine 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate («Lysinium»). L-lysine administration led to increasing of the content of ATP in brain tissue by 17–148 % and ADP by 15–62 %, and to decreasing of AMP content by 6–46 % as compared control group ($p \geq 0,05$) on the 4th day of the experiment. Injection of compounds of L-lysine to the experimental animals resulted also in the restoration of Krebs cycle functioning and in inhibition of anaerobic glycolysis in the brain (increasing levels of malate by 13–87 %, pyruvate by 18–136 % and decreasing of lactate level by 9–76%). The most active compounds of L-lysine were L-lysini succinate and Lysinium with explicit leadership of the latter. Lysinium was superior on all counts ($p \geq 0,05$) as compared to group treated with the Piracetam (dosage – 500 mg/kg) and control group. The mechanism of therapeutic action of L-lysine succinate realized through the compensatory succinateoxidase-related mechanism. However, in conditions of acute stroke the activity of succinateoxidase-related mechanism was complicated, which limited activity of this compound. Lysinium had a stronger energotropic action in comparison with other compounds of this serie, apparently, due to compensatory activation malate - aspartate shuttle mechanism.

Key words: acute violation of cerebral circulation, L-lysine, neuroprotection, energy metabolism

Поступила: 29.11.2013 г.

Контактное лицо: Егоров Артем Анатольевич, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Тел.: +38 0 99 023 24 75. Электронная почта: datas999@gmail.com

А. І. Семененко

Динаміка активності нейрон-специфічної енолази та вмісту білка S 100 у крові щурів за умов гострого порушення мозкового кровообігу та курсового введення 0,9 % розчину NaCl

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, 0,9 % розчин NaCl, нейрон-специфічна енолаза, білок S 100

Лікування хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу (ГПМК) є складною міждисциплінарною задачею, вирішення якої потребує залучення спеціалістів різного профілю та проведення комплексної інтенсивної терапії, спрямованої, перш за все, на збереження життєздатності функціонально активних нейронів [3].

Важливе практичне значення для розробки нових методів патогенетичної терапії інсульту має з'ясування питання про те, який вид клітинної смерті переважає в ході розвитку постреперфузійних пошкоджень головного мозку, оскільки регенераторний потенціал нейронів обмежений, і втрата навіть частини клітин може закінчитись фатально [1, 12, 13]. Дискутабельним залишається й питання, який вид загибелі клітин є найсприятливішим для головного мозку з точки зору функціональних наслідків: апоптоз чи некроз. Останній являє собою лавиноподібний, хаотичний процес деструкції клітин, що супроводжується запаленням. Руйнування десмосом та збільшення простору щілин між окремими нейронами дозволяє вільним радикалам та вторинним месенджерам вільно розповсюджуватись та вражати неушкоджені клітини, що сприяє збільшенню вогнища ураження [2, 14].

Доведено, якщо клітина втрачає можливість загинути апоптотично, то це виступає тригерним фактором для запуску механізмів некрозу, що є небажаним, оскільки останній сприяє ек-

пансії вогнища ішемії за рахунок залучення до зони запалення нових нейронів [2]. На думку фахівців [6, 8] схему лікування хворих на ГПМК слід обов'язково доповнювати препаратами, які впливають на окремі ланки патобіохімічного каскаду в нейронах, спроможні подовжити період «терапевтичного вікна» та створити захист від реперфузійного пошкодження. Серед лікувальних заходів, що знижують імовірність розвитку ішемії головного мозку за ГПМК, великий інтерес приділяють впливу на центральну гемодинаміку [4]. Існуюча тривалий час практика обмеження рідини пацієнтам з патологією мозку ґрунтується на припущенні, що інтенсивна терапія великими обсягами рідини з використанням кристалодів може посилити набряк головного мозку і викликати збільшення внутрішньочерепного тиску (ВЧТ) [4].

З існуючих досліджень не можливо однозначно сказати, що доцільніше, створення гіпер- чи ізоволемічної гемодилуції за ГПМК. Клінічні дослідження ізоволемічної гемодилуції не показали зменшення смертності або інвалідизації при лікуванні ішемічного інсульту. Гіперволемічну гемодилуцію вивчали в рандомізованих дослідженнях, які дали суперечливі дані [9].

Для ґрунтовного з'ясування наявності в кристалодів, а саме 0,9 % розчину NaCl захисної дії на головний мозок за ГПМК, необхідно було дослідити вплив курсової терапії цим препаратом на інтенсивність перебігу деструктивних змін у нейронах за динамікою активності нейрон-специфічної енолази (NSE) та рівнем білка S 100.

Цінність моніторингу динаміки нейрональних маркерів (активність

NSE та рівень білка S 100) за умов гострої церебральної ішемії дозволяє не тільки дослідити глибину та ступінь ішемічного пошкодження головного мозку, а й оцінити ефективність церебропротекторної терапії [11].

Мета дослідження – на моделі експериментального ішемічного постреперфузійного пошкодження головного мозку охарактеризувати вплив 0,9 % розчину NaCl на динаміку активності NSE та рівня білка S 100.

Матеріали та методи. Досліди проведено на 63 білих щурах-самцях масою 160–170 г. Експериментальну модель ішемії-реперфузії (IP) створювали шляхом накладання кліпс на обидві внутрішні сонні артерії під пропофоловим наркозом (60 мг/кг) терміном на 20 хв [10]. 0,9 % розчин NaCl вводили внутрішньовенно в умовно ефективній дозі 2,5 мл/кг 2 рази на день, через 30 хв після IP і далі щодоби через кожні 12 год упродовж 7 діб. Тварини групи контрольної патології не отримували жодної терапії (IP без лікування).

Для визначення специфічних маркерів ушкодження головного мозку [5] – активності NSE та рівня білка S 100 у відповідні строки (4 та 7 доба ГПМК) у щурів, шляхом катетеризації стегнової вени проводили забір крові (2,5–3,0 мл). Активність NSE та рівень білка S 100 у сироватці крові вимірювали методом імуноферментного аналізу з використанням набору NSE ELISA KIT (CUSABIO, China) та S 100 ELISA KIT (BlueGene, China) на приладі фірми «HUMAN» (Німеччина).

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t-Стюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W. Уайта – за його відсутності, парний критерій К. Вілкоксона – для визначення змін у динаміці всередині групи. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Аналіз динаміки активності NSE у щурів у постреперфузійний період ГПМК показав, що через 96 год після моделювання патології (4 доба ішемії) цей показник

вірогідно підвищився відносно рівня інтактних тварин у 15,2 разу, що свідчить про інтенсивне формування вогнища ішемії, значну деструкцію нейронів, які знаходяться в цій зоні та превалювання некротичного типу їх загибелі. У кінці гострого періоду інсульту (7 доба) процеси організації ядра ішемії суттєво слабшають, а інтенсивність нейронекрозу зменшується, на що вказує зниження активності NSE відносно тих показників, які мали місце на 4 добу експерименту в середньому на 27 % (табл. 1).

Аналіз рівня іншого маркера пошкодження нервової тканини білка S 100 показав, що вірогідно високі титри досліджуваного показника мали місце вже на 4 добу після реперфузії. У зазначений термін спостереження у групі контрольної патології його вміст у сироватці крові був у 19 разів вищий відносно рівня інтактних тварин (табл. 2).

У динаміці спостереження, станом на 7 добу реперфузії головного мозку, відмічали подальше підвищення вмісту досліджуваного маркера, який був вірогідно вищим за аналогічний показник у групі інтактних тварин у середньому в 36,9 разу, а відносно 4 доби

Таблиця 1

Активність нейрон-специфічної енолази в крові щурів за умов церебральної ішемії та курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl, $M \pm m$, $n = 7$

Дослідна група	Активність NSE, нг/мл
Інтактні щури	0,20 $\pm$ 0,12
4 доба	
IP без лікування (контрольна патологія)	3,04 $\pm$ 0,32*
IP + 0,9 % р-н NaCl	2,01 $\pm$ 0,02**
7 доба	
IP без лікування (контрольна патологія)	2,22 $\pm$ 0,24*
IP + 0,9 % р-н NaCl	1,68 $\pm$ 0,03**.

Примітка: IP – ішемія-реперфузія; NSE – нейрон-специфічна енолаза; * $p < 0,05$ відносно показника інтактних щурів; ** $p < 0,05$ відносно показника контрольної патології; • $p < 0,05$ відносно показника на 4 добу.

Таблиця 2

Динаміка рівня білка S 100 у крові щурів за умов церебральної ішемії та курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl, $M \pm m$, $n = 5$

Дослідна група	Рівень білка S 100, нг/мл
Інтактні щури	$0,395 \pm 0,049$
4 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	$7,510 \pm 0,772^*$
ІР + 0,9% NaCl	$4,142 \pm 0,020^{**}$
7 доба	
ІР без лікування (контрольна патологія)	$14,566 \pm 0,024^* \cdot$
ІР + 0,9% NaCl	$5,346 \pm 0,251^{**} \cdot$

Примітка. ІР – ішемія-реперфузія; * $p < 0,05$ відносно показника інтактних щурів; ** $p < 0,05$ відносно показника контрольної патології; $\cdot p < 0,05$ відносно показника на 4 доба.

ішемії – зріс майже удвічі ($p < 0,05$) (табл. 2).

Аналіз отриманих даних стосовно динаміки активності NSE та рівня білка S 100 як маркерів пошкодження нервової тканини дає змогу зробити висновок про те, що в ранньому постреперфузійному періоді модельного ГПМК у щурів відбувається інтенсивне формування ядра ішемічного вогнища, яке завершується його організацією на 7 добу експерименту.

Курсове введення щурам у постреперфузійний період 0,9 % розчину NaCl сприяло вірогідному зменшенню активності NSE відносно рівня щурів групи контрольної патології, як на 4 добу експерименту (у середньому на 33,9 %), так і в кінці терміну спостереження (у середньому на 24,3 %). Подібна динаміка активності NSE на тлі внутрішньовенного курсового введення 0,9 % розчину NaCl, певним чином, сприяє гальмуванню неконтрольованої експансії зони ішемічного вогнища та пенумбри (табл. 1).

Оцінюючи динаміку рівня білка S 100, нами було встановлено, що на тлі курсового внутрішньовенного введення 0,9 % розчину NaCl на 4 та 7 добу терапії його вміст зменшився відносно рівня щурів групи контрольної патології в середньому в 1,8 та 2,7 разу відповідно (табл. 2).

На нашу думку, певне зменшення маркерів постреперфузійного пошкодження нейронів при курсовому внутрішньовенному введення 0,9 % розчину NaCl може бути пов'язане з розвитком помірної гемодилуції, яка виникає на тлі його застосування двічі на добу в дозі 2,5 мл/кг. Гемодилуція забезпечує покращання мікроциркуляції крові по колатералам зони пенумбри, розкриття та функціонування яких на 4 та максимально на 7 добу має місце в щурів як адаптаційна відповідь на розвиток гострої церебральної ішемії.

Таким чином, результати, отримані в ході проведеного дослідження стосовно впливу розчинів 0,9 % NaCl на активність та рівень у сироватці крові щурів у постреперфузійний період модельного інсульту нейромаркерів NSE та білка S 100, свідчать про те, що церебропротекторний ефект 0,9 % розчину NaCl пов'язаний з гальмуванням процесів нейронекрозу.

Висновки

1. Модельна 20 хв ішемія головного мозку (білатеральна оклюзія внутрішніх сонних артерій) у щурів з наступною реперфузією супроводжується вірогідним зростанням відносно показників інтактних тварин активності NSE та рівнів білка S 100 на 4 добу експерименту в середньому в 15,2 та 19,0 разу відповідно, а наприкінці спостереження (7 доба ГПМК) у середньому в 11,1 та 36,9 разу відповідно.

2. Фармакотерапія модельного постреперфузійного синдрому шляхом курсового введення 0,9 % р-ну NaCl гальмувала розвиток нейронекрозу, що проявилось в достовірно менших рівнях активності NSE, як у гострий, так і у відновний період ГПМК.

3. Інфузійна терапія ГПМК (курсове введення 0,9 % р-ну NaCl) на фоні реоклюзії інфаркт-залежних судин сприяла зменшенню процесів утворення нейроглії та розвитку в ній запальних реакцій, на що вказувало вірогідне відносно групи контрольної патології зменшення титрів білка S 100 у середньому в 1,8 разу (4 доба) та у 2,7 разу (7 доба).

1. Вплив діакамфу гідрохлориду на інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / В. В. Шведський, С. Ю. Штриголь, С. І. Мерзлікін, І. Л. Черешнюк // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 2. – С. 49–53.
2. Запальна реакція та прогностичне значення маркерів запалення у хворих із геморагічним характером мозкового інсульту / А. С. Кость, М. С. Білобрин, Б. Д. Луцик [та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2010. – № 2 (52). – С. 11–15.
3. Йолтуховский В. М. Организация помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения в Германии. Менеджмент в остром периоде инсульта: ключевые элементы эффективности / В. М. Йолтуховский // Прак. ангиология. – 2008. – № 1/1. – С. 27–28.
4. Карзин А. В. Особенности инфузионной терапии при острых заболеваниях и повреждениях головного мозга, сопровождающихся внутримозговыми кровоизлияниями: автореф. дис. ... кандидата мед. наук: 14.00.37; 14.00.28 / Карзин Алексей Владимирович. – М., 2003. – 21 с.
5. Нейронспецифические белки – маркеры энцефалопатии при тяжелой сочетанной травме / Е. В. Григорьев, Г. В. Вавин, Т. Г. Гришанова [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 2 (27). – С. 72–76.
6. Никонов В. В. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении поврежденных мозга (обзор литературы) / В. В. Никонов, И. Б. Савицкая // Медицина неотложных состояний. – 2012. – № 5 (44). – С. 36–40.
7. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник [и др.] – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.
8. Трошин В. Д. Неотложная кардионеврология / В. Д. Трошин, Н. Н. Бровков. – М.: Медицинское информационное агентство, 2010. – 672 с.
9. Ишемический инсульт глазами анестезиолога: современные подходы к интенсивной терапии / Усенко Л. В., Мальцева Л. А., Царев А. В. [и др.]. – Днепропетровск, 2004. – 137 с.
10. Ходаковский А. А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А. А. Ходаковский, Л. И. Маринич, О. В. Багаури // Врач-аспирант. – 2013. – № 3 (58). – С. 69–76.
11. Ходаківський О. А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії / О. А. Ходаківський // Вісник морфології. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 62–65.
12. Knight R. A. Cell death in disease: from 2010 onwards / R. A. Knight, G. Melino // Cell Death Dis. – 2011. – V. 2. – P. 202.
13. Role of Apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano [et al.] // Aging. – 2012. – № 5, V. 4. – P. 330–349.
14. SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery / H. L. Liang, F. Sedlic, Z. Bosnjak [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – V. 49, № 10. – P. 1550–1560.

А. И. Семененко

Динамика активности нейрон-специфической эналазы и содержания белка S 100 в крови у крыс в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и курсового внутривенного введения 0,9 % раствора NaCl

На модели острого ишемического нарушения мозгового кровообращения (20-мин билатеральная окклюзия внутренних сонных артерий с последующей реперфузией у крыс) установлено, что лечебное введение 0,9 % раствора NaCl в дозе 2,5 мл/кг 2 раза в день (через 30 мин после ишемии-реперфузии и дальше ежедневно через каждые 12 ч) снижает степень нейродегенеративных изменений в этих условиях. Оценивая динамику активности нейрон-специфической эналазы и содержания белка S 100, было установлено, что на фоне курсового введения 0,9 % раствора NaCl на 4 и 7 сутки терапии содержание нейромаркеров уменьшилось относительно уровня группы контрольной патологии.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, 0,9 % раствор NaCl, нейрон-специфическая эналаза, белок S 100

A. I. Semenenko

The dynamics of neuron specific enolase activity and protein S 100 level in rat's blood under of acute disorder of the cerebral circulation and course intravenous injection of 0,9 % solution NaCl

There are no data about what is more expedient to create hyper or isovolemic hemodilution by acute disorder of the cerebral circulation. It was interesting to investigate influence of the separate course therapy with the 0,9 % NaCl solution on the intensity of destructive changes occurring in the neurons according to dynamics of neuron specific enolase activity and level of protein S 100. The aim of this

research was to characterize influence of 0,9 % NaCl solution on the dynamics of NSE and level of protein S 100 on the model of the experimental ischemic postperfusion damage of the brain. The investigation was conducted on 63 white male rats with weight 160–170 g. Experimental model of ischemia reperfusion (IR) was created by means of overlaying clips on both internal carotid arteries under propofol anesthesia (60 mg/kg) with 20 minutes term. 0,9 % NaCl solution was introduced intravenous in conditionally effective dose 2,5 ml/kg 2 times a day in 30 minutes after IR and further every day in every 12 hours during 7 days. Animals of the control pathology group didn't get any therapy (IR without treatment). Activity of NSE and level of protein S 100 in the serum of the blood was evaluated by the method of immunoassay analysis using NSE ELISA KIT (CUSABIO, China) and S 100 ELISA KIT (BlueGene, China) on the equipment of firm "HUMAN" (Germany). Course introduction of 0,9% NaCl solution to the rats in the postperfusion period contributed to probable diminution of increasing NSE activity relatively to the level of it in the rats of the control pathology group as on the 4th day of experiment (on the average by 33,9 %) so in the end of observation term (on the average by 24,3 %). Similar dynamics of the NSE contributes inhibition of uncontrolled expansion of the area of ischemic center and penumbra. On 4th and 7th day of therapy the protein S 100 level diminished relatively to the level of it in the rats of the control pathology group on the average respectively in 1,8 and 2,5 times. Results received during conducted experiment relatively to the influence of 0,9 % NaCl solution indicated that its cerebroprotective effect connected with inhibition of neuronecrosis processes.

Key words: acute stroke, 0,9 % solution of NaCl, neuron-specific enolase, protein S 100

Надійшла: 14.11.2013 р.

Контактна особа: Семененко Андрій Ігорович, кандидат медичних наук, асистент, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: +38 0973541664.

І. П. Бухтіярова

Вивчення гіполіпідемічних властивостей ралейкіну на моделі стрептозоцинового діабету в щурів

Донецький національний медичний університет імені М. Горького

Ключові слова: стрептозоциновий діабет, гіполіпідемічна, гіпохолестеринемічна дія, ралейкін

З кожним роком збільшується тягар соціально-значущих захворювань людства. Одне з перших місць серед них посідає цукровий діабет (ЦД) [8]. За даними Міжнародної діабетичної асоціації в 2012 році було зафіксовано 1300 тис. хворих на ЦД [9].

Що стосується механізмів виникнення захворювання, то головною мішенню, яка страждає за ЦД, є β -клітини, точніше, їхня загибель. Важливу роль у цьому процесі відіграють прозапальні цитокіни, а саме інтерлейкін-1 (ІЛ-1) [2, 18]. ІЛ-1 пригнічує продукцію інсуліну β -клітинами та призводить до їхнього апоптозу [5, 12]. За рахунок активності ІЛ-1 у клітинах відбувається збільшення вмісту оксиду азоту, який індукує активність NO-синтетази. Такий механізм призводить до загибелі β -клітин [12, 13]. Дослідження довели, що для хворих на ЦД підвищення вмісту ІЛ-1 у сироватці крові є характерною ознакою [18].

Слід зауважити, що ІЛ-1 також ініціює неспецифічну імунну відповідь. У нормі, при будь-якому пошкоджувальному впливі відбувається активація клітин, що продукують необхідні захисні фактори [20]. За рахунок останніх відбувається, крім іншого, підвищення в крові рівня ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) та ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) [15]. ЛПДНЩ перетворюються на високоатерогенні ліпопротеїди проміжної щільності, а ті, відповідно, перетворюються на ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ). Будь-який фактор, що сприяє підсиленню утворення ЛПДНЩ, посилює також синтез ЛПНЩ. Швид-

кість синтезу ЛПДНЩ регулюється концентрацією інсуліну в плазмі крові та наявністю субстратів – вільних жирних кислот та глюкози [1, 6]. Таким чином, оцінка ліпідного обміну є однією з важливих характеристик стану хворих на ЦД.

Не можна також не враховувати значення холестеролу, що відіграє важливу роль у стабілізації плазматичних мембран клітин [10]. Цей природний метаболіт доставляється до тканин організму білками-транспортерами, тобто ліпопротеїдами [10, 11, 15]. Саме тому визначення його при діабеті має суттєве значення. Крім холестеролу, у крові містяться тригліцериди, які також є компонентами ендогенних ліпідів [10]. Оцінка їхнього вмісту для ЦД також має велике значення.

Виходячи з вищенаведеного, можна припустити, що антагоністи рецепторів ІЛ-1 можуть захистити β -клітини [5, 16, 17], а також сприятимуть нормалізації вмісту ліпопротеїдів та, звідси, холестеролу.

Таким чином, розробка лікарських засобів для лікування ЦД на основі антагоністів ІЛ-1 є перспективною. Такі препарати будуть гальмувати активність ІЛ-1 та захищати β -клітини, сприяти нормалізації їхнього функціонального стану.

Мета дослідження – вивчення впливу рекомбінантного антагоніста рецепторів ІЛ-1 ралейкіну, розробленого в Санкт-Петербурзькому НДІ ОЧБП, на ліпідний обмін на моделі стрептозоцинового ЦД у щурів.

Матеріали та методи. Модельну патологію відтворювали внутрішньоочеревинним введенням розчину стрептозоцину в дозі 40 мг/кг маси тіла протягом 5 діб статевозрілим самцям білих щурів масою 230–280 г [3].

Референс-препаратом було обрано метформін (Діаформін виробництва ВАТ «Фармак», табл. 0,5 г) та анакінру (Кінерет виробництва «Swedish Orphan Biovitrum», Швеція, пор. р/і 100 мг). Вибір препаратів порівняння зумовлений тим, що метформін є еталонним гіпоглікемічним препаратом, який входить до стандартів лікування ЦД обох типів [19], а анакінра – рекомбінантний антагоніст рецепторів ІЛ-1 з доведеною гіпоглікемічною активністю, що є аналогом досліджуваного препарату [21].

Дані препарати вводили в лікувальному режимі: ралейкін у дозі 7 мг/кг та анакінру в дозі 8 мг/кг – підшкірно [21], метформін у дозі 30 мг/кг – внутрішньоплунково [19] один раз на день протягом 14 днів. Лікування розпочинали з чотирнадцятої доби після останнього введення стрептозоцину, оскільки саме на чотирнадцяту добу зафіксована максимальна виразність інфільтрації панкреатичних островців макрофагами та лімфоцитами [3].

На 29 добу тварин виводили з експерименту летальною дозою тіопенталового наркозу, збирали кров для біохімічних досліджень. Гіполіпідемічну дію досліджуваних препаратів оцінювали за наступними показниками: уміст холестеролу (ХЛ), тригліцеридів (ТГ), ЛПНЩ, ЛПДНЩ, ЛПВЩ у сироватці крові експериментальних тварин. Уміст ХС, ТГ, ЛПНЩ, ЛПВЩ визначали за допомогою тест-наборів «Lachema» (Чехія) на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі ФП-901 [4].

У разі обліку результатів у вигляді середня $\pm$ стандартна помилка статистичну достовірність міжгрупових відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента з поправкою Бонфероні.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження наведено в таблиці. У статевозрілих самців щурів внутрішньоочеревинне введення стрептозоцину протягом 5 діб призвело до повільного розвитку інсулін-залежного ЦД з виразним аутоімунним компонентом, подібного за провідними патогенетичними ознаками до ЦД 1 типу у людини [3, 19].

Після введення останньої дози стрептозоцину кілька днів відзначали підвищення інсулінової залежності, яка зазвичай завершується некрозом β -клітин та важкою гіперглікемією. Одразу після появи первинної гіперглікемії починалася інтенсивна інфільтрація панкреатичних островців макрофагами та лімфоцитами (інсуліт). Максимальну виразність інсуліту в нашому дослідженні зафіксували на 14 добу після першої ін'єкції стрептозоцину.

На тлі розвитку діабету в щурів групи контрольної патології спостерігали суттєві порушення ліпідного обміну, а саме, уміст ХС у сироватці крові достовірно збільшився в 1,3 разу, ТГ – у 3 рази, ЛПНЩ – у 1,4 разу. ЛПДНЩ – у 1,7 разу, рівень ЛПВЩ знизився в 1,4 разу порівняно з відповідними показниками в тварин групи інтактного контролю (таблиця).

Таблиця

Показники ліпідного обміну за умов моделювання стрептозоцинового діабету в щурів та впливу ралейкіну (29 доба дослідження), $M \pm m$, $n = 6$

Група тварин	ХС, мг/дл	ЛПВЩ, мг/дл	ЛПНЩ, мг/дл	ЛПДНЩ, мг/дл	ТГ, мг/дл
Інтактний контроль	53,0 $\pm$ 5,4	12,7 $\pm$ 0,9	29,0 $\pm$ 2,1	6,9 $\pm$ 0,4	36,2 $\pm$ 2,3
Контрольна патологія (діабет)	68,4 $\pm$ 4,2*	9,3 $\pm$ 0,6*	39,7 $\pm$ 2,6*	11,5 $\pm$ 0,6*	110,0 $\pm$ 6,2*
Діабет + Ралейкін, 7 мг/кг	51,1 $\pm$ 3,4**	10,9 $\pm$ 0,5**	30,1 $\pm$ 2,5**	8,3 $\pm$ 0,4*/***	71,2 $\pm$ 4,0*/**#
Діабет + Метформін, 30 мг/кг	55,3 $\pm$ 4,0**	9,1 $\pm$ 0,8*	33,1 $\pm$ 1,4**	11,2 $\pm$ 1,1*	87,3 $\pm$ 5,7*/**
Діабет + Анакінра, 8 мг/кг	53,1 $\pm$ 4,7**	11,3 $\pm$ 0,5***	31,2 $\pm$ 2,6**	8,4 $\pm$ 0,4*/***	74,9 $\pm$ 4,1*/**

Примітка. Статистично значущі відмінності ($p \leq 0,05$): *до групи інтактного контролю; **до групи контрольної патології, ***до метформіну; # – кількість тварин у групі.

Під впливом ралейкіну рівень ХС у сироватці крові експериментальних тварин достовірно знизився в 1,3 разу, уміст ТГ – у 1,5 разу, уміст ЛПНЩ – у 1,3 разу, уміст ЛПДНЩ – у 1,4 разу порівняно з аналогічними показниками в групі контрольної патології. На тлі ралейкіну рівень ЛПВЩ достовірно збільшився в 1,2 разу порівняно з показником у щурів групи контрольної патології. Вищезазначені показники ліпідного обміну в групі тварин, що отримували ралейкін, достовірно не відрізнялись від відповідних показників у щурів групи інтактного контролю, крім умісту ТГ та ЛПДНЩ.

Під дією анакінри рівень ХС у сироватці крові експериментальних тварин достовірно знизився в 1,3 разу, уміст ТГ – у 1,5 разу, уміст ЛПНЩ – у 1,3 разу, уміст ЛПДНЩ – у 1,4 разу порівняно з аналогічними показниками в групі контрольної патології. На тлі анакінри рівень ЛПВЩ у сироватці крові експериментальних тварин достовірно збільшився в 1,2 разу порівняно з показником групи контрольної патології. Вищезазначені показники ліпідного обміну в групі тварин, що отримували анакінру, достовірно не відрізнялися від показників у щурів групи інтактного контролю, крім умісту ТГ та ЛПДНЩ. Достовірних відмінностей у вираженості гіполіпідемічної та гіпохолестеринемічної дії ралейкіну та анакінри не спостерігали.

Отримані дані співпадають з даними попередніх досліджень гіполіпідемічних властивостей ралейкіну за умов аліментарної гіперліпідемії в щурів [5].

На тлі метформіну рівень ХС у сироватці крові щурів достовірно знизився в 1,2 разу, уміст ТГ – у 1,3 разу, уміст ЛПНЩ – у 1,2 разу порівняно з аналогічними показниками в групі контрольної патології, рівень ЛПВЩ достовірно збільшився в 1,2 разу порівняно з показником у щурів групи контрольної патології. За позитивним впливом на вміст ЛПВЩ у крові тварин метформін

поступався анакінрі, за впливом на рівень ТГ метформін поступався ралейкіну. На рівень ЛПДНЩ та ЛПВЩ метформін не виявив нормалізувального впливу – дані показники достовірно не відрізнялись від відповідних показників у сироватці крові тварин групи контрольної патології. Отримані результати співпадають з даними літератури щодо здатності метформіну позитивно впливати на рівень ХС, ТГ та ЛПВЩ у сироватці крові [19].

Тобто, за умов стрептозоцинового діабету в щурів ралейкін виявив потужну гіполіпідемічну та гіпохолестеринемічну дію, за якою не поступався анакінрі, та перевершував метформін. На підставі отриманих результатів можна припустити, що блокада рецепторів ІЛ-1 на тлі цукрового діабету 1 типу дозволить не тільки нормалізувати глюкозний обмін, виявити протекторну дію та збільшити виживаність β -клітин, зменшити прояви оксидативного стресу, але й допоможе знизити вираженість порушень ліпідного обміну.

Висновки

Визначено, що на моделі стрептозоцинового діабету в щурів рекомбінантний антагоніст рецепторів ІЛ-1 ралейкін, отриманий в Санкт-Петербурзькому НДІ ОЧБП, виявляє потужні гіполіпідемічні властивості, за якими переважає референс-препарат метформін.

За вираженістю гіполіпідемічної та гіпохолестеринемічної дії ралейкін не поступається своєму аналогу – рекомбінантному антагоністу рецепторів ІЛ-1 анакінрі.

Поєднання в ралейкіну гіпоглікемічних, антиоксидантних та гіполіпідемічних властивостей є дуже цінним для терапії ЦД 1 типу, оскільки дозволяє впливати одночасно на декілька ланок патогенезу захворювання та робить ралейкін перспективним препаратом для подальшого вивчення з метою включення до комплексної терапії ЦД 1 типу.

1. Бабак О. Я. Лечение печени при метаболическом синдроме: поражение органа или организма / 100 избранных лекций по эндокринологии [под ред. Ю. И. Караченцева, А. В. Казакова, Н. А. Кравчун, И. М. Ильиной] / О. Я. Бабак. – Х.: ТОВ «С.А.М.», 2009. – С. 22 – 28.
2. Бережная Н. М. Цитокиновая регуляция при патологии: стремительное развитие и неизбежные вопросы / Н. М. Бережная // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 26–34.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
4. Камышников В. С. Справочник по клиническо-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2002. – Т. 1. – 495 с.; Т. 2. – 463 с.
5. Експериментальне вивчення антиоксидантної та гіполіпідемічної дії рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 / К. Г. Щокіна, С. Ю. Штриголь, Ю. В. Столетов, О. М. Іщенко // Вісник фармації. – 2010. – № 3 (63). – С. 79–82.
6. Журавльова Л. В. Жирова дистрофія печінки у хворих на цукровий діабет 2-го типу: шляхи оптимізації лікування / Л. В. Журавльова, О. В. Лавриненко; В. М. Хворостінка // Ліки України. – 2010. – № 7 (143). – С. 58–62.
7. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом / А. С. Бояджян, Э. А. Аракелова, В. А. Айвазян [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2008. – № 1. – С. 41–44.
8. Информационный бюллетень ВОЗ. – 2013. – № 312. режим доступу. – <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/ru>.
9. Інформаційне повідомлення МОЗ України. Режим доступу. – http://moz.gov.ua/ua/portal/dn_20130718_1.html.
10. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем. – Пер. с нем. – [3-е изд.]. – М.: Изд-во «МИР», «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2009. – 469 с.
11. Коноваленко О. В. Ефективність впливу на ліпідний обмін постійної підшкірної інфузії інсуліну та безперервного моніторингу глікемії при лікуванні хворих на цукровий діабет 1 та 2 типу / О. В. Коноваленко, В. Й. Кресюн // Журн. АМН України. – 2010. – № 2, т. 16. – С. 313–322.
12. Прозапальні цитокини при цукровому діабеті 1 типу / В. А. Скибчик, Я. Г. Готор, М. О. Войнович [та ін.] // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2012. – № 1. – С. 57–60.
13. Роль цитокинов в патогенезе аутоиммунного диабета, вопросы иммуоинтервенции / Кравец Е. Б., Саприна Т. В., Лазаренко Ф. Э. [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 1. – С. 76–83.
14. Савон И. Л. Роль про- и противовоспалительных цитокинов у больных с осложненным синдромом диабетической стопы / И. Л. Савон // Сучасні медичні технології. – 2010. – № 3. – С. 73–80.
15. Согуйко Ю. Р. Оцінка параметрів глюко- та ліпотоксичності в сироватці крові щурів зі стрептозотоциновим цукровим діабетом на ранніх етапах перебігу / Ю. Р. Согуйко // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2010. – № 1. – С. 41–46.
16. Супрун Е. В. Експериментальне вивчення антигіпоксичної активності антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 / Е. В. Супрун, В. П. Верейтинова, О. С. Супрун // Теоретична і експериментальна медицина. – 2009. – № 4. – С. 57–61.
17. Супрун Э. В. Коррекция антагонистом рецепторов интерлейкина-1 показателей энергетического метаболизма в головном мозге крыс с экспериментальным ишемическим инсультом / Э. В. Супрун // Теоретическая и экспериментальная медицина – 2010 – № 1. – С. 64–68.
18. Тихонова Т. М. Порівняльна оцінка вмісту цитокинів у хворих на повільнопрогресуючий аутоімунний діабет дорослих / Т. М. Тихонова // Проблеми ендокринної патології. – 2013 – № 1. – С. 27–34.
19. Шумейко О. Г. Експериментальне обґрунтування застосування екстракту з мідії чорноморської (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) у комплексній терапії цукрового діабету: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.14 – ендокринологія. – Х., 2009. – 21 с.
20. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM / G. Bellomo, E. Maggi, M. Poli [et al.] // Diabetes. – 1995. – V. 44, № 1. – P. 60–66.
21. Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in rats / J. O. Sandberg, A. Andersson, D. L. Eizirik [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1994. – V. 202 (1). – P. 543–548.

И. П. Бухтиярова

Изучение гиполлипидемических свойств ралейкина на модели стрептозоцинового диабета у крыс

С каждым годом увеличивается бремя социально-значимых заболеваний человечества. Одно из первых мест среди них занимает сахарный диабет (СД). Важную роль в развитии СД играют провоспалительные цитокины, а именно интерлейкин-1 (ИЛ-1). Можно предположить, что антагонисты рецепторов ИЛ-1 могут защитить β-клетки, а также способствовать нормализации содержания липопротеидов и холестерина. В статье приведены результаты экспериментального изучения влияния рекомбинантного антагониста рецепторов ИЛ-1 ралейкина, разработанного в НИИ ОЧБП (Санкт-Петербург), на липидный обмен на модели стрептозоцинового СД у крыс. Определено, что на модели патологии у крыс ралейкин проявляет мощные гиполлипидемические свойства, по которым превосходит референс-препарат метформин. По выраженности гиполлипидемического и гипохолестеринемического действия ралейкин не уступает своему аналогу – рекомбинантному антагонисту рецепторов ИЛ-1 – анакинре. Сочетание у ралейкина гипогликемических, антиоксидантных и

гиполипидемических свойств является очень ценным для терапии СД 1 типа, так как позволяет воздействовать одновременно на несколько звеньев патогенеза заболевания и делает ралейкин перспективным препаратом для дальнейшего изучения с целью включения в комплексную терапию СД 1 типа.

Ключевые слова: стрептозоциновый диабет, гиполипидемическое, гипохолестеринемическое действие, ралейкин

I. P. Buhtiyarova

Pharmacological study of hypolipidemic effects of raleukin on the model of streptozocine diabetes mellitus in rats

It is well known that one of the most important role in the development of diabetes mellitus play proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1). It can be assumed that antagonists of IL-1 may protect β -cells, and may also contribute to normalization of the lipoproteins and, certainly, cholesterol. The main goal of this study was to research the influence of recombinant receptor antagonist IL-1 raleukin developed in the Scientific Research Institute of Pure Biochemicals of St. Petersburg, on lipid metabolism on the model of streptozocine diabetes mellitus in rats. It was shown that raleukin has powerful hypolipidemic effect that exceeds the reference medicine metformin on the model of streptozocine diabetes mellitus in rats. In the expression of hypolipidemic and hypocholesterolemic effects raleukin is not inferior to its analogue – a recombinant receptor antagonist IL-1 anakinra. In conclusion, the combination of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of raleukin is very valuable for the treatment of diabetes mellitus type 1, as it allows to affect simultaneously on several chains of pathogenesis of the disease and makes raleukin perspective medicine for further studies its therapeutic effectiveness in the treatment of diabetes mellitus type 1.

Key words: streptozocine, diabetes mellitus, hypolipidemic effect, hypocholesterolemic effect, raleukin

Надійшла: 28.10.2013 р.

Контактна особа: Бухтіарова І. Р., Донецький національний медичний університет імені Максима Горького, буд. 16, просп. Ілліча, м. Донецьк, 83003. Тел.: +38 062 385 95 04.

Д. С. Зеленський¹, В. М. Бондар², О. І. Жуковский²,
В. І. Поляков², А. І. Соловйов¹

Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти на скорочення ізольованих фрагментів аорти щурів та внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+}

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

²Міжнародний благодійний фонд «Київська Русь», м. Київ

Ключові слова: діізопропілфосфат-олігоетиленгліколь таурохолева кислота, Ca^{2+} , гладенькі м'язи судин, ендотелій

Дослідження полягало у вивченні внутрішньоклітинних механізмів дії діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти (ДПОГТК), основної діючої речовини лабораторного зразка геропротекторного препарату «ОΡΙΟΝ» [1]. Вплив цієї речовини на функціональний стан ефекторних елементів серцево-судинної системи не відомий. Це є серйозною прогалиною в доклінічному вивченні препарату, тому що саме хронічні захворювання серцево-судинної системи є основним чинником зменшення тривалості життя.

Особливий інтерес до жирних кислот (ЖК), представником яких є ДПОГТК, пов'язаний з дослідженнями останніх років, що показали наявність специфічних ядерних рецепторів BAR (bile acid receptor) відомих під назвою FXR або NR1H4 [2]. З функціональної точки зору існують дані, що активація цих рецепторів у гладеньком'язових клітинах (ГМК) може індукувати апоптоз клітин шляхом експресії цільових генів FXR – SHP (small heterodimeric partner) та PLTP (phospholipids transfer protein) [3]. Окрім того, відомі дані щодо релаксуючого ефекту таурохолату натрію на гладенькі м'язи (ГМ) [4, 5].

У дослідженнях 2008 року [6] було також показано, що FXR відіграють безпосередню роль у регуляції тонуусу судин за рахунок активації промотора ендотеліальної NO-синтази, що призво-

дить до посилення синтезу NO в ендотеліальних клітинах судин.

Крім ядерних рецепторів, ідентифіковані рецептори плазматичної мембрани – серпентини (рецептори, супряжені з G-білком), що взаємодіють з ЖК [6] (TGR5/Gbar1). Дія ЖК на клітини призводить до експресії цих рецепторів, синтезу цАМФ, активації MAP-кіназного сигнального шляху та інтерналізації останніх [7].

Останні дослідження [8] демонструють важливу роль ЖК у внутрішньоклітинній регуляції обміну жирів, вуглеводів, активації рецепторів, сполучених з G-білками. У той самий час відсутні дані щодо впливу ДПОГТК на тонус судин та Ca^{2+} -транзйєнти в ГМК.

Мета дослідження – вивчення змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та скоротливої активності кровоносних судин під впливом ДПОГТК.

Відомо, що скоротлива активність ГМК регулюється внутрішньоклітинним кальцієм. Тому досліджували взаємозв'язок між індукованими ДПОГТК змінами тонуусу та концентрацією внутрішньоклітинного кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) у судинній стінці. У з'ясуванні клітинних механізмів дії препарату «ОΡΙΟΝ» є важливим дослідження взаємозв'язку індукованих змін тонуусу ГМК та концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Матеріали та методи. Для дослідів були використані сегменти грудного відділу аорти дорослих щурів-самців лінії Вістар-Кіото масою (210 ± 30) г. Усі процедури зі щурами проводили з використанням рекомендацій Європейської конвенції щодо захисту тварин,

що використовуються в експериментальних та інших цілях. Судини зовні ретельно вичищали від сполучної тканини та розрізали на кільця завширшки близько 2 мм. Усі процедури з судинами проводили за кімнатної температури в розчині Кребса, що мав наступний склад (ммоль/л): NaCl 122, KCl 4,7, NaHCO₃ 15,5, KH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, MgCl₂ 1,2 та глюкоза 11,5, рН 7,3-7,4. Досліди проводили з інтактними та деендотелізованими кільцями судин. Після препарування сегменти судин вивертали шаром ендотелію назовні. У разі необхідності з них видаляли шар ендотелію механічним способом за допомогою фільтрувального паперу. Належне видалення ендотелію перевіряли під мікроскопом та за відсутністю реакції на ацетилхолін. Аналізували одночасні зміни $[Ca^{2+}]_i$ та вазорелаксацийного відгуку, що виникають у ГМ, попередньо скорочених деполаризуючим гіперкалієвим розчином K⁺ (60 ммоль/л) або активацією адренорецепторів ГМ фенілефрином (10⁻⁶ моль/л).

Досліди виконували в камері об'ємом 300 мкл, установлений на предметний стіл флуоресцентного мікроскопа ЛЮАМ-И2 (С.-Петербург, Росія), що входить до складу експериментальної установки [9–12]. Уміст $[Ca^{2+}]_i$ вимірювали з використанням флуоресцентного кальцієвого індикатора Fura-2 [13]. Завантажування барвником кілець аорти здійснювали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці впродовж 4 год. Сегменти судин поміщали в завантажувальний розчин наступного складу: Fura-2AM 10 мкмоль/л; DMSO 2,5 % (за об'ємом); Pluronic F-127 0,5 % (за масою); розчин Кребса 95 % (за об'ємом) рН – 7,35. Після завантаження всі зразки сегментів судин переносили у ванночку з розчином Кребсу, де вони залишались протягом не менше 30 хв. Препарат судин фіксували на гачках датчика скорочень у робочій камері за температури розчину 36 °С під навантаженням (10–15) мН. Під час експерименту всі розчини подавали до камери зі швидкістю 1 мл/хв (перистальтичний насос Masterflex). Результати вимірювань

$[Ca^{2+}]_i$ представлені як відношення ($R = I_{340nm} / I_{380nm}$) інтенсивності флуоресцентних сигналів (I) при 340 та 380 нм, за вирахуванням значення фонові флуоресценції згідно з методикою [9, 14, 15]. Для цього наприкінці експерименту для гасіння флуоресценції барвника застосовували розчин Кребса з Mn²⁺ (20 ммоль/л).

Усі неорганічні сполуки одержували від Sigma Chemical Co. (США), Fura-2 AM – від Molecular Probes, Inc. (США).

Усі дані наведено у вигляді середнього арифметичного ± помилка середнього арифметичного. Порівняння отриманих величин проводили за методом Стьюдента для непарних вимірів. Розходження вважали статистично достовірними, якщо величина р була менше 0,05. Усі статистичні розрахунки проводили на персональному комп'ютері з використанням програм OriginPro 7.0.

Результати та їх обговорення. Для дослідження взаємозв'язку кальцієвого метаболізму та скоротливої активності ГМК під впливом ДПОГТК (у концентраціях від 10⁻⁴ до 10⁻⁶ моль/л) одночасно вимірювали силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$. Відомо, що скорочення ГМ за фізіологічних умов розвивається за рахунок дії фізичних (тиск, температура) факторів і\або зв'язування екзо- та ендогенних речовин з їхніми специфічними рецепторами, що в результаті призводить до збільшення $[Ca^{2+}]_i$ та ініціації скорочення. Сила скорочення ГМ за умов *in vitro* залежить від базального стану та шляхів попередньої активації ГМК [16]. Тому принципово було дослідити дію препарату за різних способів активації судин та оцінити вплив ДПОГТК на базальний рівень $[Ca^{2+}]_i$ та тонус ГМК.

На рисунку 1 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на базальний тонус сегмента грудного відділу аорти щура та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК. Додавання ДПОГТК у концентрації 10⁻⁴ моль/л призводило до стійкої констрикції на фоні транзиторного збільшення $[Ca^{2+}]_i$.

Традиційно вважається, що сила скорочення ГМК має корелювати з величиною $[Ca^{2+}]_i$. У той самий час отримані дані свідчать про те, що ДПОГТК викликала констрикцію ГМ

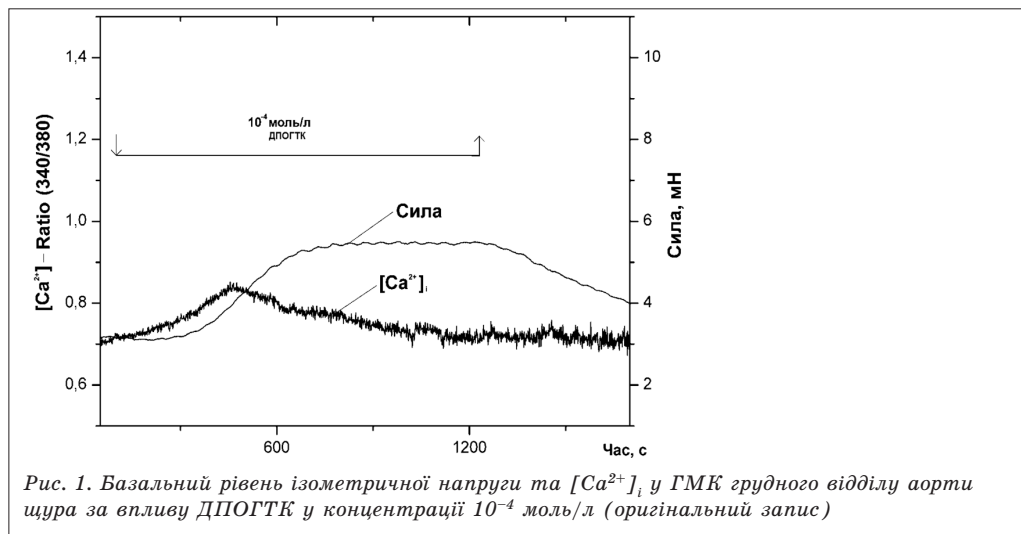


Рис. 1. Базальний рівень ізометричної напруги та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК грудного відділу аорти щура за впливу ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л (оригінальний запис)

за рахунок підвищення $[Ca^{2+}]_i$ лише на першій фазі скорочення. Після досягнення максимального значення $[Ca^{2+}]_i$ концентрація кальцію починала зменшуватися до вихідного базального значення, у той час як ізометрична напруга ГМ збільшувалася до свого сталого значення ($2,7 \pm 0,8$ мН, $n = 5$). Це свідчить про збільшення чутливості скоротливого апарату ГМК аорти щурів до іонів кальцію на фоні дії ДПОГТК.

Таким чином, отримані дані дозволяють припустити, що ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л викликає сталу констрикцію ГМК переважно за рахунок підвищення кальцієвої чутливості міофібрил.

Далі, для вивчення дії ДПОГТК на ГМК було використано два шляхи попереднього підвищення $[Ca^{2+}]_i$: використовували розчин з високим умістом K^+ (60 ммоль/л) та розчин фенілефрину (ФЕ) (10^{-6} моль/л).

На рисунку 2 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на скоротливу активність та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК грудного відділу аорти щурів, попередньо скорочених деполяризуючим розчином K^+ . Середнє значення максимального скорочення у відповідь на дію K^+ становило $5,05 \pm 0,4$ мН.

У концентрації 10^{-6} моль/л ДПОГТК статистично достовірно не впливала на силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$, однак у концентрації 10^{-4} моль/л призводила до

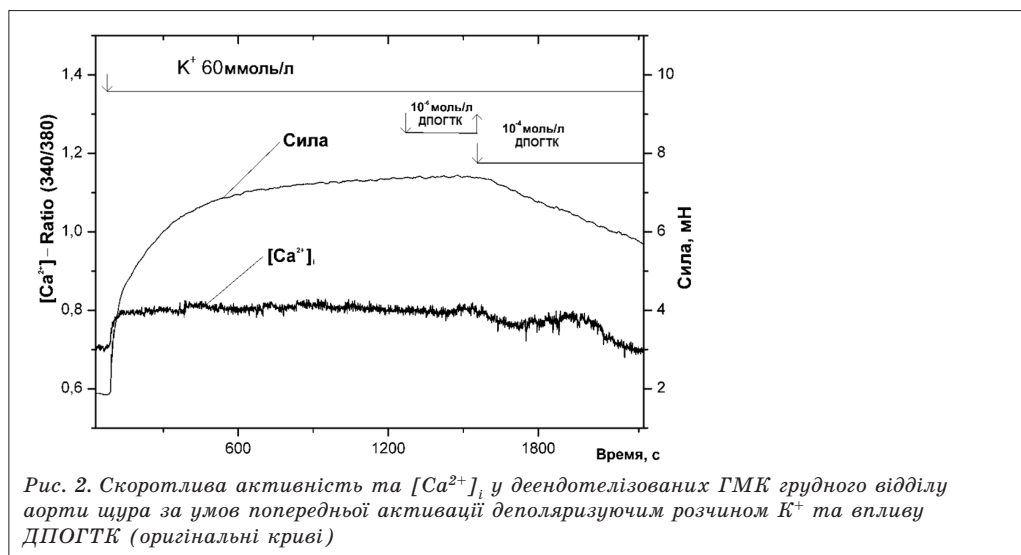


Рис. 2. Скоротлива активність та $[Ca^{2+}]_i$ у деендотелізованих ГМК грудного відділу аорти щура за умов попередньої активації деполяризуючим розчином K^+ та впливу ДПОГТК (оригінальні криві)

релаксації ГМ на $48,6 \pm 8,0$ % та $66,0 \pm 9,1$ % у деендотелізованих та інтактних судинах відповідно. При цьому спостерігалось зменшення $[Ca^{2+}]_i$ на $72 \pm 15,1$ % ($n = 5$).

Наведені дані дозволяють припустити, що ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л призводила до закриття потенціал-залежних Са-каналів L-типу, що були відкриті внаслідок деполяризації мембрани розчином з високим умістом K^+ . Цей результат корелює з відомими даними про підвищення концентрації цАМФ у результаті зв'язування ДПОГТК з рецептором TGR5 [17].

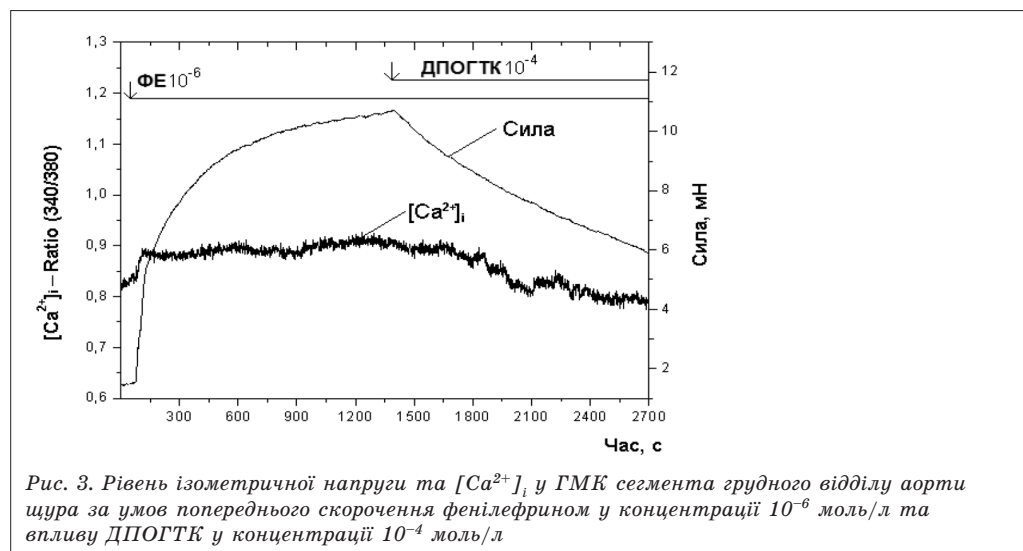
На рисунку 3 відображено оригінальний запис скоротливої активності та $[Ca^{2+}]_i$ у деендотелізованих ГМК грудного відділу аорти щурів за умов попереднього скорочення ФЕ (10^{-6} моль/л) та впливу ДПОГТК. Середні значення сили скорочення на ФЕ (10^{-6} моль/л) становили $6,75 \pm 0,6$ мН.

У концентрації 10^{-4} ДПОГТК призводила до релаксації ГМ на $54,5 \pm 9,0$ % та зменшення $[Ca^{2+}]_i$ до базального значення ($n = 5$). Отримані дані свідчать про те, що ДПОГТК, можливо, здатна інгібувати як Ca^{2+} -канали L-типу, так і рецептор-зв'язані Ca^{2+} -канали. У той самий час ДПОГТК у концентрації 10^{-6} моль/л не впливала на силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$ попередньо скорочених ГМК.

Згідно з сучасними уявленнями, одним із провідних патогенетичних

чинників серцево-судинних хвороб вважають порушення функції ендотелію [17, 18]. Ендотелій відіграє провідну роль у підтриманні нормального тону судин, забезпеченні локального гомеостазу та проліферації судинної стінки. Порушення балансу між вазодилататорами та вазоконстрикторами є ключовим фактором при ендотеліальній дисфункції [19]. Відомо, що зв'язування FXR з ДПОГТК призводить до активації промотора NO-синтази та відповідного збільшення концентрації NO у клітинах ендотелію судин [4]. Тому важливо було виконати порівняльні дослідження щодо впливу ДПОГТК як на інтактних, так і деендотелізованих судинах.

На рисунку 4 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на скоротливу активність ГМ, попередньо скорочених ФЕ (10^{-6} моль/л), та $[Ca^{2+}]_i$ в ендотеліальних клітинах грудного відділу аорти щурів. У концентрації 10^{-4} ДПОГТК призводила до релаксації ГМ на $68,2 \pm 7,2$ % та збільшення на $15,0 \pm 6,6$ % загальної концентрації $[Ca^{2+}]_{ie}$ ($n=5$). Таким чином, ДПОГТК викликала ендотелій-залежне розслаблення ГМ інтактних судин грудного відділу аорти щурів, підвищуючи $[Ca^{2+}]_i$ в ендотеліальних клітинах, що призводило до вивільнення NO з ендотеліоцитів та вазорелаксації ГМ. Після усунення дії ДПОГТК тонус ГМ повертався до вихідного значення.



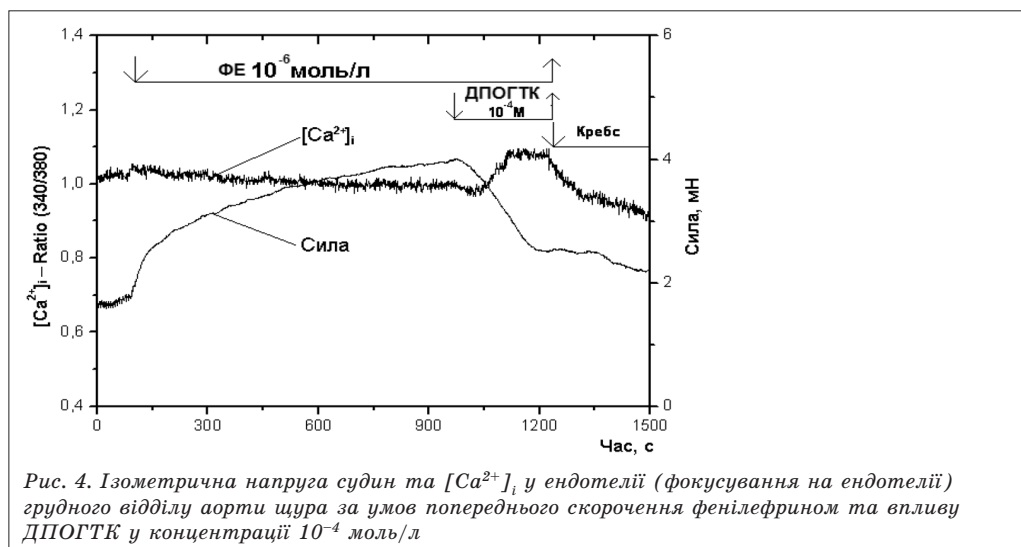


Рис. 4. Ізометрична напруга судин та $[Ca^{2+}]_i$ у ендотелії (фокусування на ендотелії) грудного відділу аорти щура за умов попереднього скорочення фенілефріном та впливу ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л

Висновки

1. У концентрації 10^{-4} моль/л ДПОГТК (діюча речовина препарату «ОРИОН») викликала констрикцію неактивованих ГМ. Констрикція неактивованих ГМ під дією ДПОГТК розвивалася на фоні підвищення кальцієвої чутливості міофібрил. У концентрації 10^{-6} моль/л ДПОГТК статистично достовірно не впливала на скоротливу активність ГМ та $[Ca^{2+}]_i$ неактивованих ГМ.

2. Ступінь вазодилатації судин щурів, попередньо активованих розчином з високим вмістом K^+ (60 ммоль/л), складав $48,6 \pm 8,0$ % та $54,5 \pm 9,0$ % для активованих розчином ФЕ (10^{-6} моль/л). Розслаблення ГМК супроводжувалося зменшенням $[Ca^{2+}]_i$ до базального рівня ($n = 5$).

3. У концентрації 10^{-4} моль/л ДПОГТК впливав на функцію ендотеліоцитів: підвищував рівень $[Ca^{2+}]_i$ в ендотелії та викликав ендотелій-залежне розслаблення.

1. Мурадян Х. К. Влияние препарата «ОРИОН» на выживаемость в стрессорных условиях и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / Х. К. Мурадян, В. Н. Бондарь, В. В. Безруков // Журн. АМН Украины. – 2009. – Т. 16. – С. 246–262.
2. Makishima M. Identification of a nuclear receptor for bile acids / Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J. // Science. – 1999. – V. 284. – P. 1362–1365.
3. Li YTY. Farnesoid X receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration / Li YTY, Swales KE, Thomas GJ // Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio. – 2007. – V. 27. – P. 2606–2611.
4. Rask-Madsen C. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes / Rask-Madsen C, King GL. // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. – 2007. – V. 3. – P. 46–56.
5. Romero F. Role of Na^+/Ca^{++} exchange in the relaxant effect of sodium taurocholate on the guinea-pig ileum smooth muscle / Romero F, Frediani-Neto E, Paiva TB. // Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. – 1993. – V. 348. – P.325–331.
6. Li J. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells / Li J., Wilson, A., Kuruba, // Cardiovasc. Res. – 2008. – V. 77. – P. 169–177.
7. Kawamata Y. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids / Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 9435–9440.
8. Maruyama T. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) / Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 298. – P. 714–723.
9. Lehen'kyi V. V. Ca^{2+} -sensitivity and cGMP-independent effects of NO in vascular smooth muscle / Lehen'kyi V. V., Zelensky S. N., Stefanov A. V. // Nitric Oxide. – 2005. – V. 12. – P. 105–113.
10. Lehen'kyi V. V. Effects of nitric oxide donors on vascular smooth muscles depend on a type of vascular smooth-muscle preactivation / Lehen'kyi VV, Zelensky SN, Stefanov AV. // Cardiovasc Toxicol. – 2002. – V. 2. – P. 151–160.
11. Soloviev A. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments / Soloviev A, Lehen'kyi V, Zelensky S. // Hellstrand P. Cell Calcium. – 2004. – V. 36. – P. 165–173.
12. Soloviev A. I. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C / Soloviev A. I., Tishkin S. M., Zelensky S. N. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2005. – V. 289. – P.755–762.

13. Kawamata Y. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids / Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 9435–9440.
14. Grynkiewicz G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / Grynkiewicz G., Poenie G. M., Tsien R. Y. // J. Biol. Chem. – 1985. – V. 260. – P. 3440–3450.
15. Blatter L. A. Intracellular diffusion, binding and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2 / Blatter L. A., Wier W. G. // Biophys J. – 1990. – V. 58. – P. 1491–1499.
16. Baylor S. M. Measurement and interpretation of cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$, signals from calcium-indicator dyes / Baylor S. M., Hollingworth S. // News Physiol. Sci. – 2000. – V. 15. – P. 19–25.
17. Berridge M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms / Berridge M. J. // J. Physiol. – 2008. – V. 586. – P. 5047–5061.
18. McDaniel N. L. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[\text{Ca}^{2+}]$, and uncoupling stress from myosin phosphorylation / McDaniel N. L., Chen X. L., Singer H. A. // Am. J. Physiol. – 1992. – V. 263. – P. 461–467.
19. Su X. Cyclic nucleotides relax contractions of α -toxin permeabilized arteries without a proportional change in myosin light chain phosphorylation / Su X., Katoch S. S., Moreland R. S. // Biophys. J. – 1996. – V. 70. – P. 385–391.

Д. С. Зеленский, В. М. Бондарь, А. И. Жуковский, В. И. Поляков, А. И. Соловьев
Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сокращение изолированных фрагментов аорты крыс и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}

Известно, что Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути играют ключевую роль в функционировании клеток. В данной работе изучали влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты (ДПОГТК), которая является основным действующим веществом лабораторного образца препарата «ОРИОН», на сократительную активность и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в гладких мышцах (ГМ) аорты крыс. Полученные данные показали, что ДПОГТК в концентрации 10^{-6} моль/л статистически достоверно не влияла на сократительную активность ГМ и $[\text{Ca}^{2+}]$. В концентрации 10^{-4} моль/л ДПОГТК вызвала констрикцию неактивированных и вазодилатацию предсокращённых сосудов крыс. Констрикция ГМ развивалась на фоне повышения чувствительности к кальцию миофибрилл и уменьшения $[\text{Ca}^{2+}]$. Степень вазодилатации сосудов крыс, предварительно активированных раствором с высоким содержанием K^+ (60 ммоль/л), составляла $48,6 \pm 8,0 \%$ и $54,5 \pm 9,0 \%$ для гладких мышц, активированных ФЕ (10^{-6} моль/л). Расслабление ГМ сопровождалось уменьшением $[\text{Ca}^{2+}]$ до базального уровня. В концентрации 10^{-4} моль/л лабораторный образец препарата влиял на функцию эндотелиоцитов, повышая базальный уровень $[\text{Ca}^{2+}]$ в эндотелиальных клетках, вызывая эндотелий-зависимое расслабление.

Ключевые слова: диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоль таурохолевой кислоты, Ca^{2+} , гладкие мышцы сосудов, эндотелий

D. S. Zelenskiy, V. M. Bondar, O. I. Zhukovsky, V. I. Polyakov, A. I. Soloviev
Effects of taurocholic acid diisopropylphosphate oligoethyleneglycol on contractive force and calcium transients in rat thoracic aorta smooth muscle

It is known that taurocholic acid diisopropylphosphate oligoethyleneglycol (DOEGTA) possesses geroprotective properties. However, its effect on cardiovascular effectors, including vascular smooth muscles (SM) cells contractility and Ca^{2+} -signaling, till this time remains unknown. It is generally accepted that calcium homeostasis plays a crucial role in SM tone regulation. A tight control of calcium-dependent signaling pathways is required to allow the cell to function properly. Experimental design of this study comprised simultaneous recording of contractile force and intracellular calcium measurements in isolated rings of rat aorta. The effect of high (10^{-4} M) and low (10^{-6} M) concentrations of DOEGTA on SM contractility and $[\text{Ca}^{2+}]$, was studied. Low concentration of DOEGTA (10^{-6} M) was without effect on $[\text{Ca}^{2+}]$, and tension, while high-concentration (10^{-4} M) of the DOEGTA caused vasoconstriction of non-precontracted SM and vasodilatation of SM precontracted with high K^+ (60 mM) or phenylephrine (PE) (10^{-6} M) SM. It is important to note that DOEGTA-induced vasodilation accompanied by increase in $[\text{Ca}^{2+}]$, in endothelial cells. Sustained contraction of non-precontracted SM treated with DOEGTA (10^{-4} M) followed by transient increase in SM cytosolic Ca^{2+} only. The data obtained suggesting that DOEGTA in high concentration (10^{-4} M) can induce endothelium-dependent relaxation in preliminary activated SM, while non-preactivated SM react to DOEGTA with contraction due to an increased myofilaments Ca-sensitivity.

Key words: diisopropylphosphate oligoethyleneglycol taurocholic acid, Ca^{2+} , vascular smooth muscle, endothelium

Надійшла: 12.11.2013 р.

Контактна особа: Зеленський Дмитро Сергійович, аспірант, відділ «Експериментальної терапії», ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Єжена Потьє, 14, м. Київ, 03680.
 Тел.: +38 091 333-77-99. Електронна пошта: dima.zelenskiyi@gmail.com

И. Л. Мончак¹, О. И. Жуковский², В. И. Поляков²,
В. Н. Бондарь², А. И. Соловьев¹

Влияние диизопропилфосфат- олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сократительную активность воротной вены крыс в условиях гипоксии *in vitro*

¹ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

²Международный благотворительный фонд «Киевская Русь», г. Киев

Ключевые слова: гипоксия, воротная
вена, гладкие мышцы,
таурохолевая кислота

Координированная работа гладких мышц (ГМ) полых органов является основой гомеостатического регулирования в системе кровообращения, пищеварительного тракта и мочеполовой системы.

Гипоксия оказывает быстрое влияние на большинство ГМ, проявляющееся, в основном, в уменьшении силы и частоты сокращений. В норме такая реакция на снижение парциального давления кислорода в окружающей среде свойственна и ГМ сосудов, за исключением системы легочного кровообращения. Результатом гипоксической вазодилатации становится, как правило, улучшение кровоснабжения органов и тканей. Однако гипоксия может быть также причиной серьезных повреждений, когда она связана с такими патологическими состояниями, как атеросклероз, вазоспазм, геморрагический инсульт и т. п. Отдельно следует упомянуть состояние реоксигенации после гипоксии/ишемии, которое зачастую приводит к значительным повреждениям тканей.

Количество внутриклеточных процессов, участвующих в формировании и регуляции сократительной функции ГМ, очень велико, а результирующий эффект, то есть сила/частота сокращений или уровень тонического напряжения, зависит от их интегрального взаимодействия. Следовательно, и число процессов, вовлеченных в снижение

силы сокращений ГМ при гипоксии, также будет большим, что существенно затруднит идентификацию основных влияющих механизмов.

Механизмы реализации гипоксического влияния на ГМ можно разделить, в первую очередь, на Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} -независимые. Первые связаны с уменьшением внутриклеточной концентрации кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Существует множество сообщений об участии ионных каналов в этом процессе. В работах [3, 13] представлены данные об открытии K^+ -каналов при гипоксии, ведущему к снижению входа Ca^{2+} через потенциал-зависимые каналы и последующему расслаблению. В работах [7, 13, 20] показана возможность непосредственного влияния гипоксии на Ca^{2+} -каналы. Влияние на внутриклеточные кальциевые депо (саркоплазматический ретикулум, митохондрии) также может вести к изменению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [1, 22, 25]. Существуют данные о Ca^{2+} -независимом расслаблении ГМ сосудов при гипоксии [2, 18, 20]. Одна из первых гипотез гипоксического расслабления связывала его с дефицитом энергетических ресурсов. Эта теория основывалась на снижении продукции АТФ митохондриями, вследствие чего происходило инактивирование актин-миозиновой АТФазы. Как показали последующие исследования, подобная теория не может быть применима к сосудистым ГМ [9, 16], так как запасы АТФ сохраняются в ГМ сосудов даже в состоянии глубокой гипоксии. Возможными «кандидатами» на роль регуляторов сосудистого тонуса при гипоксии являются

изменение pH [2, 18], концентрации неорганического фосфата Pi [6, 18].

В последние годы ведется широкий поиск веществ, обладающих антигипоксическим действием. Особое внимание уделяется дериватам продуктов жизнедеятельности организма. Такими продуктами могут являться, например, желчные (хенодезоксихолевая и холевая) кислоты (ЖК), а их производные – гликохолевая, дезоксихолевая, таурохолевая кислоты, их соли и другие соединения стали объектом пристального внимания исследователей. В лабораторной субстанции препарата Орион, представленного для исследования, основным действующим компонентом является диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты (ДПОГТК), и резонно было предположить, что именно таурохолевая кислота будет оказывать главное влияние на гладкие мышцы сосудов в условиях гипоксии.

По данным исследований, проводимых в различных странах, производные ЖК и сами ЖК обладают сосудорасширяющим действием [4, 12, 15]. Следует отметить, что механизмы такого действия до сих пор неясны и остаются предметом дискуссии. Так, например, отмечалось [10], что при действии деоксихолиглицина уменьшение амплитуды агонистиндуцированного сокращения и тонуса сосудов является независимым от мускариновых рецепторов, NO или активации K^+ каналов. Другие исследователи связывают подобное влияние ЖК с воздействием последних на потенциал-зависимые и рецептор-связанные кальциевые каналы [5]. Некоторые исследования на несосудистых объектах демонстрируют возможность участия ЖК в синтезе реактивных форм кислорода [19], которые, как известно, обладают вазорелаксирующим действием [24]. На гладкомышечных препаратах кишечника собаки [11] и морской свинки [17] показана возможность модуляции ЖК и таурохолатом натрия неселективных катионных токов [11] и Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма [17]. ЖК в сосудах могут проявлять свое действие посредством активации выработки NO эндотелиальными клетками [14]. Когда было открыто,

что ЖК являются природными лигандами ядерных фарнезоидных X рецепторов (FXR), интерес к ним еще более возрос. Кроме того, FXR могут участвовать в ангиотензиновой регуляции тонуса сосудов [26].

Цель исследования – изучение потенциального противогипоксического действия ДПОГТК на воротной вены крыс, а также оценка возможности применения спектрального анализа Фурье как нового методического подхода для анализа сокращений воротной вены в условиях действия экстремальных факторов.

Материалы и методы. Опыты проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986 с изменениями по положениям Протокола ETS № 170 от 2005 года).

После усыпления взрослых самцов крыс линии Whistar подвергали декапитации с последующим обескровливанием. Быстро вскрывали брюшную полость, выделяли препарат воротной вены и помещали его в раствор Кребса, содержавшего (в ммоль/л): NaCl 133, KCl 4,7, $CaCl_2$ 2,5, $MgCl_2$ 1,2, $NaHCO_3$ 16,3, NaH_2PO_4 1,38, D-глюкоза 7,8, pH = 7,38. Под микроскопом воротную вену отделяли от окружающей соединительной ткани. Затем препарат помещали на крючках в термостатированную при 37 °C проточную камеру. Препарат воротной вены подвергали предварительному растяжению в 300–500 мг, период врабатывания длился 60 мин.

Регистрацию сократительной активности изолированных сосудистых препаратов проводили с помощью емкостных датчиков напряжения (Danish Myo Technology, Aarhus, Дания), сигнал от которых усиливался и фильтровался, далее преобразовывался в цифровую форму с помощью устройства LabTrax 4/16 (WPI, Inc). Цифровые данные регистрировали и фиксировали программой DataTrax2 (World Precision Instruments, Inc, США).

Математическая обработка данных. Системный анализ спонтанных сокращений воротной вены (vena porta, VP)

представляет собой довольно сложную задачу. Простейшими методами, используемыми с этой целью, являлись измерение средних амплитуды и частоты за определенный период времени, и оценка площади под кривой сокращений. Из-за того, что форма сокращений воротной вены по амплитуде и частоте довольно неоднородна, проследить изменения этих показателей под влиянием определенных факторов очень сложно. Нами был использован метод оценки частоты и амплитуды сокращений воротной вены с помощью быстрого преобразования Фурье. Этот метод получил распространение только в последние десятилетия благодаря быстрому развитию вычислительной техники и появлению интеллектуальных систем и программ. Для оценки *in vitro* спонтанно активных биологических объектов типа сосудов этот метод является новым и представляет значительный интерес. Необходимо отметить, что наши наблюдения и расчеты подтверждаются мультикомпонентной теорией сокращений объектов, обладающих спонтанной активностью. Теория была предложена в конце прошлого века (Johansson, Mellander, 1975, 1990), и предполагает существование нескольких основных частот в формировании и регуляции интегрального сокращения объекта. Природа происхождения этих частот, к сожалению, до сих пор непонятна, хотя и является одним из ключевых моментов в понимании возникновения ряда болезней и патологических состояний, в первую очередь, артериальной гипертензии и гипоксических реакций.

Второй метод – анализ площади под кривой сокращений – предоставляет собой интегрированную оценку (работу) за определенный промежуток времени. С помощью такого показателя возможным становится общий анализ влияния определенного вещества на сокращения воротной вены.

В работе при обработке данных применялись оба метода, а конечные результаты оценивались параллельно.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе обработки полученных данных оценивали работу, произведенную гладкими мышцами воротной вены

за определенное время, то есть развиваемую мощность при сокращении в нормальных условиях, под влиянием гипоксии и/или исследуемого вещества. Результаты обработки, представленные на рисунке 1, демонстрируют «двухфазную» зависимость мощности сокращений воротной вены при гипоксии от концентрации ДПОГТК. Уже в концентрации 10^{-7} моль/л мощность сокращений возрастает более чем на четверть (по сравнению с развиваемой при гипоксии). Далее мощность продолжает увеличиваться при концентрации 10^{-6} моль/л, транзитивно падает при 10^{-5} моль/л и значительно увеличивается при действии вещества в концентрации 10^{-4} моль/л. На первый взгляд, транзиторное падение мощности на фоне дозозависимого прироста может показаться парадоксальным. Однако, следует помнить, что развиваемая мощность зависит как от амплитуды, так и от частоты сокращений гладких мышц.

Следовательно, 2-й этап обработки данных – оценка частотных характеристик сокращений – предоставляет возможность конкретизировать механизмы влияния исследуемого вещества на изменение мощности воротной вены. Анализ сокращений воротной вены в условиях нормальной оксигенации демонстрирует наличие трех основных водителей ритма в формировании полного сокращения. Так, в примере сокращения на рисунке 2 их частоты составили 0,036; 0,073; 0,113 Гц.

В условиях гипоксии (pO_2 – 20–25 мм рт. ст.) в гладких мышцах регистрировались лишь 1–2 ведущие частоты (в

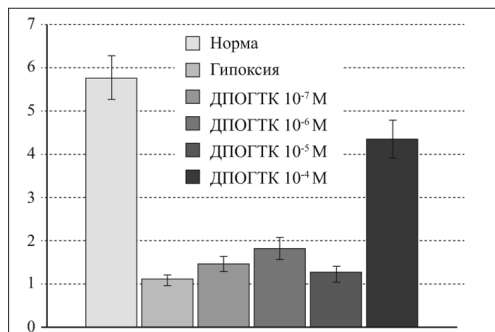
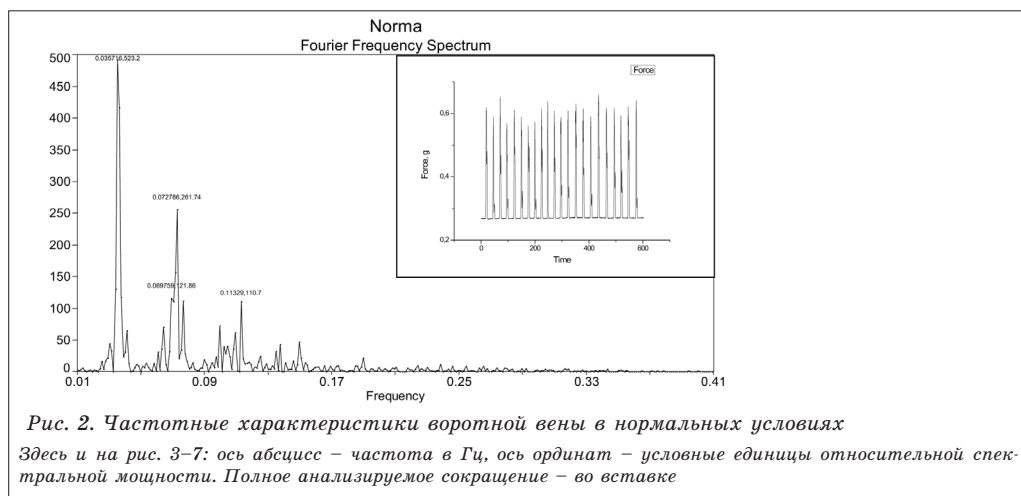


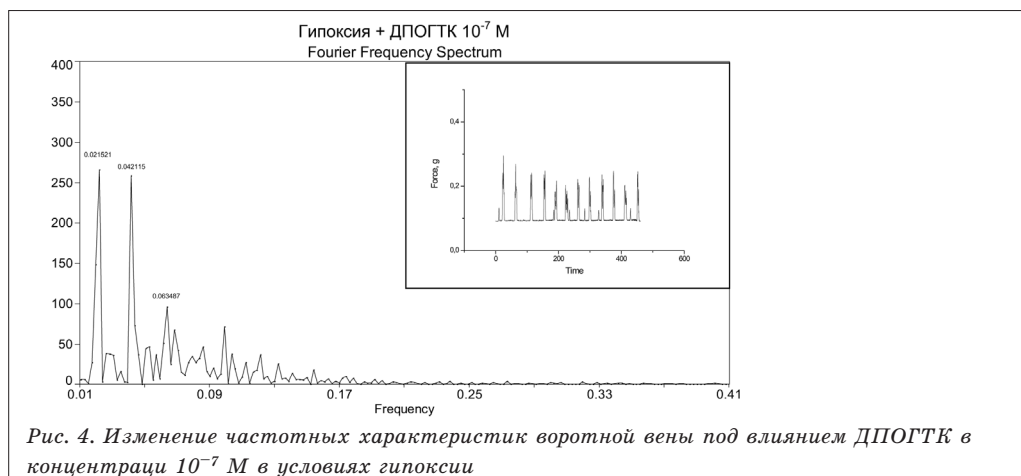
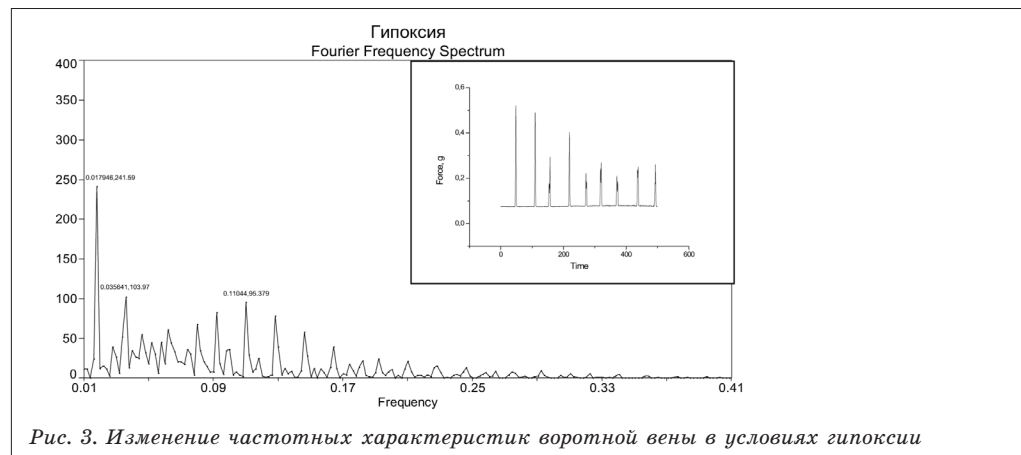
Рис. 1. Влияние ДПОГТК на мощность, развиваемую воротной веной при сокращениях в условиях гипоксии
Ось ординат – у. е. мощности



нашем случае – 0.018 Гц) и несколько слабых генераторов с большей частотой, что может свидетельствовать о существовании медленного гипоксического генератора и наличии нестабильных, менее мощных (либо наличии генератора с изменяющейся во времени частотой), рисунок 3.

Применение ДПОГТК в концентрации 10^{-7} моль/л на фоне действия гипоксии вызывает увеличение частот базовых генераторов (0,022 и 0,042 Гц), что проявляется в учащении сокращений воротной вены (рис. 4).

Более выраженным такое проявление действия ДПОГТК стало в концен-



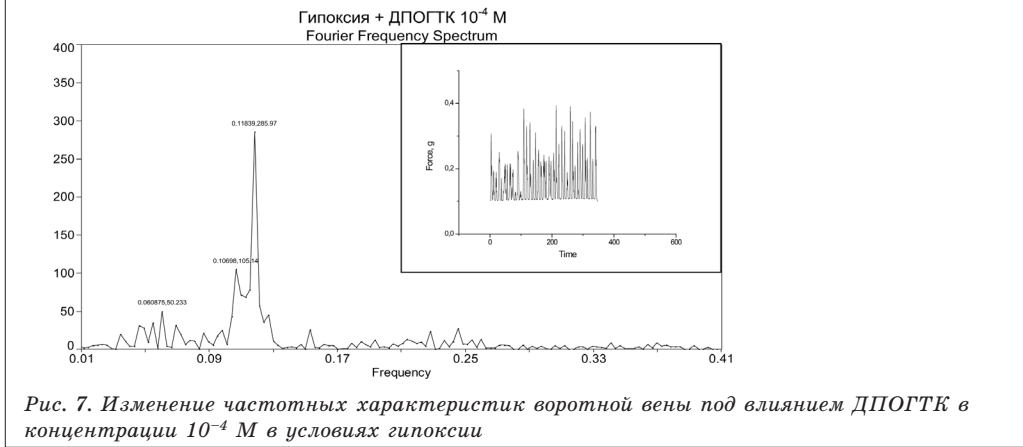
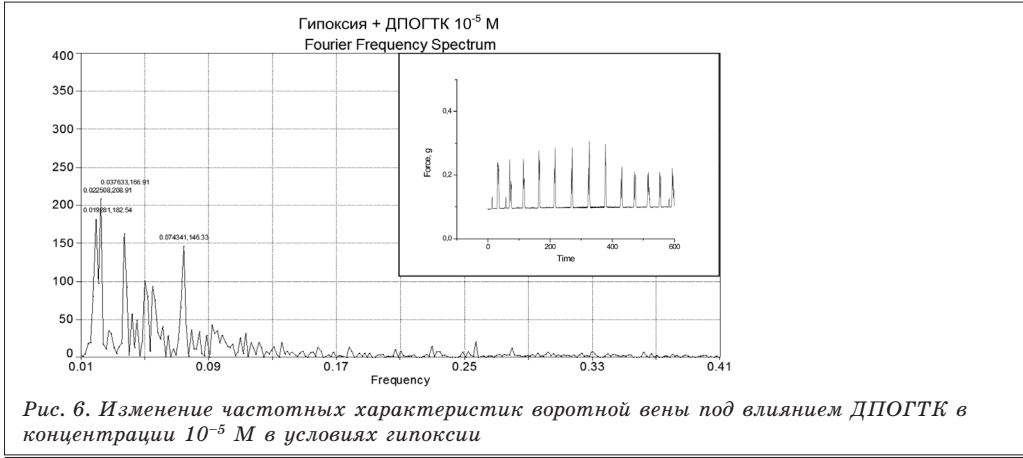
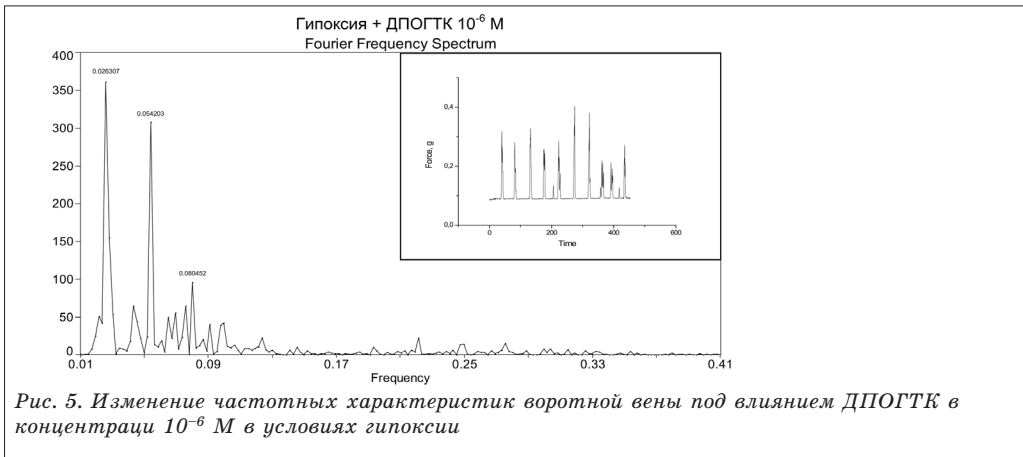
трации 10^{-6} моль/л (0,035 и 0,072 Гц), рисунок 5.

При данной концентрации в нашем примере появился еще один дополнительный стабильный генератор (0,08 Гц).

Концентрация ДПОГТК 10^{-5} моль/л (рис. 6) вызывает появление нескольких близких по частоте и мощности водителей ритма, что в результате приводит к уменьшению амплитуды

и снижению средней частоты сокращения.

Самое яркое проявление действия ДПОГТК отмечалось при концентрации 10^{-4} моль/л. На спектральной диаграмме (рис. 7) отмечается один стабильный мощный водитель ритма с частотой 0,118 Гц, чем и объясняется резкое повышение амплитуды и частоты сокращений воротной вены.



Заключение

Выводы работы можно разделить на три направления:

– фундаментальное: в основе адаптационной перестройки воротной вены при гипоксии может лежать изменение триггерных механизмов, обуславливающих пейсмейкерную активность гладких мышц. Как результат – перенастройка сокращений за счет как модификации цепочки частота-амплитуда-интегральная работа, так и вследствие возникновения новых водителей ритма;

– методологическое: впервые продемонстрирована возможность применения математического аппарата спектрального анализа частот для оценки сокращений

воротной вены крыс в экстремальных условиях. Это открывает новый методологический подход для анализа воздействия фармакологических препаратов и биологически активных веществ на спонтанно активные гладкомышечные объекты, и может способствовать разработке новых лекарственных препаратов;

– прикладное: на фоне гипоксии диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоль таурохолевой кислоты (Орион) восстанавливает авторитмическую активность воротной вены крыс за счет влияния на формирование пейсмейкерной активности в сосудистых гладких мышцах, что может свидетельствовать о его противогипоксическом действии в гладких мышцах.

1. Соловьев А. И. Клеточные механизмы гипоксического коронарораспазма / Соловьев А. И. // Физиологический журнал СССР. – 1988. – №74. – С. 193–201.
2. Aalkjaer C. Effect of hypoxia on force, intracellular pH and Ca^{2+} concentration in rat cerebral and mesenteric small arteries / Aalkjaer C., Lombard J. H. // J. Physiol. (Lond.). – 1995. – V. 482. – P. 409–419.
3. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia / Archer S. L., Huang J. M., Reeve H. L. [et al.] // Circ. Res. – 1996. – V. 78. – P. 431–442.
4. Bile salts, hypotension and obstructive jaundice / Bomzon A., Finberg J. P., Tovbin D. [et al.] // Clin. Sci. – 1984. – V. 67. – P. 177–183.
5. Bomzon A. & Ljubincic P. Bile acids as endogenous vasodilators? / Bomzon A. & Ljubincic P // Biochem. Pharmacol. – 1995. – V.49. – P.581–589.
6. Dillon P. F. Influence of cellular energy metabolism on contractions of porcine carotid artery smooth muscle / Dillon P. // J. Vasc. Res. – 2000. – V. 37. – P. 532–539.
7. Herrera G. M. Involvement of L-type calcium channels in hypoxic relaxation of vascular smooth muscle / Herrera G. M., Walker B. R. // J. Vasc. Res. – 1998. – V.35. – P.265–273
8. Ishida Y. Underlying mechanisms for hypoxia-induced relaxation of the guinea-pig isolated aorta / Ishida Y., Honda H. // Jpn. J. Pharmacol. – 1992. – V. 58 (Suppl. 2). – P. 307.
9. Ishida Y. Lactate production of mammalian intestinal and vascular smooth muscles under aerobic and hypoxic conditions / Ishida Y., Takagi-Ohta K. // J. Smooth Muscle Res. – 1996. – V. 32. – P. 61–67.
10. Effects of deoxyhologlycine, a conjugated secondary bile acid, on myogenic tone and agonist-induced contraction in rat resistance arteries / Khurama S., Raina H., Pappas V. [et al.] // PLoS. – 2012. – V. 7 (2). – P.32006.
11. Lee H. K. Bile acid modulation of gastrointestinal smooth muscle contraction and ionic currents / Lee H. K., Lee K. H. // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2000. – Aug; 4. – P. 333–338.
12. On the vitro vasoactivity of bile acids / Ljubincic, P., Said, O., Ehrlich, Y. [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – V. 131. – P. 387–398.
13. K^+ and Ca^{2+} channel activity and cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ in oxygen-sensing tissues / Lopez-Barneo J., Pardal R., Montoro R.J. [et al.] // Respir. Physiol. – 1999. – V. 115. – P. 215–227.
14. Bile acids increase intracellular Ca^{2+} concentration and nitric oxide production in vascular endothelial cells / Nakajima T., Okuda Y., Chisaki K. [at al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – V. 130, № 17. – P. 1457–1467.
15. Mechanism of bile salt vasoactivity: Dependence on calcium channels in vascular smooth muscle / Pak J M., Adeagbo A. S. O., Triggie, C. R. [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1994. – V. 112. – P. 1209–1215.
16. Paul R. Chemical energetics of vascular smooth muscle. In: D. Bohr, A. Somlyo, H. Sparks, S. Geiger (Eds.) / Paul R. // Handbook of Physiology. Vol. Section 2: The Cardiovascular System; Vol. 2: Vascular Smooth Muscle, American Physiological Society, Bethesda. – 1980. – P. 201–235.
17. Role of exchange in relaxant effect of sodium taurcholate on the guinea-pig ileum smooth muscle / Romero F., Frediani-Neto E., Paiva T. B., Paiva A. C. // Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol. – 1993. – V. 348 (3). – P. 325–31.
18. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca^{2+} , pH, and energetic in porcine coronary artery (in process citation) / Shimizu S., Bowman P. S., Thorne III G., Paul R. J. // Circ. Res. – 2000. – V. 86. – P. 862–870.
19. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes / Sokol R. J., Devereaux M., Khndwala R., O'Brien K. // Hepatology. – 1993. – V. 17. – P. 869–881.

20. Soloviev A. I. Evidence for decrease in myofilament responsiveness to Ca^{2+} during hypoxia in spontaneously active vascular smooth muscle in rats / Soloviev A. I., Basilyuk O. V. // *Exp. Physiol.* – 1993. – V. 78. – P. 395–402.
21. Changes in plasma membrane ionic permeability and related contractile responses in vascular smooth muscle at hypoxia / Soloviev A. I., Stefanov A. V., Bazilyuk O. V. [et al.] // *Pathophysiology.* – 1996. – V. 3. – Issue 1. – P. 11–20.
22. Influence of mitochondrial inhibition on global and local $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat tail artery / Sward K., Dreja K., Lindqvist A. [et al.] // *Circ. Res.* – 2002. – V. 90. – P. 792–799.
23. Regulation of vascular smooth muscle mechanotransduction by microRNA and L-type calcium channels / Turczynska K., Hellstrand P., Sward K., Albinsson S. // *Communicative and Integrative Biology.* – 2013. – V. 6–1. – P. e2278–4
24. Wei E. P. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite / Wei E. P., Kontos H. A., Beckman J. S. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – V. 271. – P. H1262–H1266.
25. Redox signaling in oxygen sensing by vessels / Weir E.K., Hong Z., Porter V. A., Reeve H. L. // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – V. 132. – P. 121–130.
26. FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells / Zhang Q., He F., Kuruba R. [et al.] // *Cardiovascular Research.* – 2008. – V. 77. – P. 560–569.

І. Л. Мончак, О. І. Жуковський, В. І. Поляков, В. М. Бондар, А. І. Соловійов
Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя та урохолової кислоти на скоротливу активність ворітної вени щурів за умов гіпоксії *in vitro*

Діізопропілфосфат-олігоетиленгліколь та урохолової кислоти (ДПОГТК) має здібність відновлювати авторитмічну активність ворітної вени щурів за умов гіпоксії *in vitro*, що проявляється в модифікації частотно-амплітудних характеристик біогенної автоматії. Зміни потужності скорочення ворітної вени під впливом ДПОГТК за умов гіпоксії є дозозалежними та двофазними. Дані частотної оцінки скорочень методом аналізу Фур'є свідчать про те, що низькі концентрації ДПОГТК (10^{-7} – 10^{-5} моль/л) викликають підвищення частоти генерації скорочень водіїв ритму ворітної вени (покращання частотних характеристик). У більш високих концентраціях ДПОГТК (10^{-4} моль/л) потужність скорочень ворітної вени майже сягає величин, що спостерігаються за умов нормальної оксигенації, за рахунок появи «нових» генераторів авторитмічної активності. Отримані дані дозволяють дійти висновку, що ДПОГТК впливає на формування пейсмейкерної активності в судинних препаратах гладеньких м'язів за умов гіпоксії. Таким чином, досліджувана субстанція має протигіпоксичну дію, а результати подальшого вивчення препарату, створеного на її основі, можуть відкрити нові підходи до терапії гіпоксичних станів. Важливо також відмітити можливість застосування аналізу Фур'є для з'ясування внутрішньоклітинних механізмів, пов'язаних із дією гіпоксії на гладенькі м'язи.

Ключові слова: гіпоксія, ворітна вена, гладенькі м'язи, таурохолева кислота

I. L. Monchak, V. I. Polyakov, O. I. Zhukovsky, V. N. Bondar, A. I. Soloviev
The effect of taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol on rat portal vein contractile activity at hypoxia *in vitro*

Now it is well documented that mechanical tension of vascular smooth muscles is very sensitive to environment oxygen tension, but underlying mechanisms remain not fully understood. The aim of this study was to evaluate the effect of laboratory specimen of the pharmaceutical composition Orion (taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol, DPOGTA) on rat portal vein contractile activity under hypoxia *in vitro* condition. Experimental design of the study comprised isolation of rat thoracic aorta rings, contractile recordings and Fourier analysis. It was shown that this derivative of taurocholic acid possess the ability to restore the autorhythmic activity of rat portal vein under hypoxia, and that is manifested in the modification of the frequency- amplitude characteristics of myogenic automaticity. The change of powerfulness of portal vein contractions under the influence DPOGTA at hypoxia was dose-dependent and biphasic. The data of frequency rate using Fourier spectral analysis indicate that low concentrations of DPOGTA (10^{-7} – 10^{-5} M) caused an increase in the frequency of generation rate pacemakers in portal vein (contractile uprating). At higher concentrations, DPOGTA (10^{-4} M) powerfulness of portal vein contractions was restored at hypoxia almost completely, and it is happened due to the appearance of «new» generators of autorhythmic activity. The data obtained allow us to conclude that DPOGTA affects the pacemaker activity formation in vascular smooth muscle during hypoxia and, hence, possess antihypoxic action. We suggest that this complex compound may be used as a good therapeutic approach under hypoxic condition. It is important to note that the Fourier analysis allows to identify an intrinsic subcellular mechanisms related to hypoxic action on smooth muscle.

Key words: hypoxia, portal vein, smooth muscles, taurocholic acid

Поступила: 12.11.2013 г.

Контактное лицо: Мончак Игорь Леонидович, младший научный сотрудник, отдел экспериментальной терапии, ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», д. 14, ул. Э. Потье, г. Киев, 03680. Электронная почта: imonchak@bigmir.com

О. О. Нагорна¹, В. А. Стежка²

Вплив ірбесартану на активність вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у щурів з уродженою стрес-індукованою артеріальною гіпертензією

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

²ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ

Ключові слова: ірбесартан, артеріальна гіпертензія, вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів

Ірбесартан є одним з сучасних високо-специфічних неконкурентних антагоністів рецепторів 1-го типу ангіотензину II, який з успіхом призначають більше 10 років для лікування гіпертонічної хвороби [7]. Ірбесартан швидко адсорбується з травного каналу, його біодоступність 60–80 %, для реалізації ефекту не потребує метаболічної активації. Близько 96 % препарату зв'язується з білками плазми крові. Метаболізується в печінці шляхом кон'югації з утворення глюкуроніду та шляхом окиснення. Ірбесартан та метаболіти виводяться з організму з жовцю та сечею [5].

На кафедрі фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця проведені дослідження з вивчення впливу лікарських препаратів з різними механізмами антигіпертензивної фармакологічної дії в експериментах на щурах з артеріальною гіпертензією (АГ). Моделі спонтанної та уродженої стрес-індуктивної артеріальної гіпертензії за патогенетичним механізмом найбільше відповідають розвитку гіпертонічної хвороби у людей. Тому на ній вивчають ефективність застосування лікарських засобів з антигіпертензивним типом фармакологічної дії [6, 8, 9, 14]. На щурах з АГ виявлені морфофункціональні, біохімічні особливості, у тому числі активність неферментативних перекисних вільнорадикальних процесів у міокарді та в цілому в організмі [1–4, 11, 12].

Зокрема, показана суттєва відмінність активності системи вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ВРПОЛ) у плазмі крові, тканинах міокарда та печінки в контрольних нормотензивних щурів та щурів з АГ. Останнє зумовлює необхідність вивчення ефективності ірбесартану щодо процесів ПОЛ у плазмі крові, міокарді, печінці щурів з АГ. Такі дослідження з вивчення впливу ірбесартану на процеси перекисного окиснення ліпідів у щурів з АГ проводяться вперше.

Мета дослідження – з'ясувати особливості впливу ірбесартану на активність системи ВРПОЛ у крові, міокарді та печінці щурів з АГ.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 12 щурах лінії HSIAN з спонтанною генетично зумовленою артеріальною гіпертензією та 6 контрольних нормотензивних щурах лінії WKY з вихідною масою тіла 190–210 г. Щури лінії HSIAN (hereditary stress induced arterial hypertension), отримані з Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України і вирощені у віварії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, були розподілені на дві групи по 6 тварин у кожній:

1) контрольні щури HSIAN; 2) дослідні щури HSIAN, які протягом 60 днів отримували ірбесартан у дозі 30 мг/кг маси тіла.

Тварин утримували в клініці для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні за умов вільного доступу до їжі та води. Щурів дослідної та контрольної груп виводили з експерименту декапітацією під легким ефірним інгаляційним наркозом, дотримуючись правил гуманного пово-

дження з лабораторними тваринами. Для дослідження забирали змішану артеріально-венозну кров з антикоагулянтом та тканини печінки і міокарда на льодову баню.

Активність системи ВРПОЛ досліджували у змішаній артеріально-венозній плазмі крові та гомогенатах тканини печінки та міокарда. Для цього використовували реєстрацію спонтанного (СХЛ) та Fe^{2+} -індукованого надслабкого їхнього світіння (хемілюмінесценції) за допомогою хемілюмінометра ХЛМ1Ц-01 [10].

Зразки плазми крові для дослідження отримували шляхом змішування у скляних пробірках 0,2 мл артеріально-венозної крові з 9,0 мл калійного фосфатного буферного розчину для хемілюмінесценції (розведення 1:46) для попередження її згортання. Склад буферного розчину: 100 ммоль KCl , 20 ммоль $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Величину рН 7.4 доводили 0,1 N розчином KOH , або 0,1 N розчином HCl відповідно. Пробірки центрифугували 15 хв при 3000 об/хв для відокремлення формених елементів крові від плазми, після чого плазму крові у повному об'ємі переносили до пластикових кювет хемілюмінометра.

Наважки тканини міокарда та печінки гомогенізували у скляному гомогенізаторі на льодовій бані в калійному фосфатному буферному розчині для хемілюмінесценції, фільтрували крізь чотири шари марлі та розводили тим самим буферним розчином до кінцевої концентрації 3,7 мг/мл та 5,6 мг/мл відповідно. До реєстрації хемілюмінесценції зразки плазми крові та гомогенатів тканин зберігали на льодовій бані в затіненому приміщенні не довше 3 год.

Перед записом хемілюмінограм зразки плазми крові та гомогенати тканини печінки і міокарда (біологічні субстрати) протягом 10 хв витримували в повній темряві в пристрої «Біостат» хемілюмінометра при $+37,0 \pm 0,1$ °C. Після цього визначали рівень СХЛ біологічного субстрату за показаннями хемілюмінометра протягом 1 хв (імп/хв). Потім додавали до нього 1,0 мл розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,7 мг/мл бідистильованої води) і реє-

стрували протягом 6 хв Fe^{2+} -ініційовану хемілюмінограму (ІХЛ). На ній визначали наступні показники: 1) амплітуду швидкого спалаху світіння (h , імп/с), яка відображує вміст у біологічному субстраті гідроперекисів ліпідів; 2) максимальну амплітуду повільного спалаху надслабкого світіння (H , імп/с) та його амплітуду на 6 хв реєстрації ІХЛ (I_6 , імп/с), які характеризують інтенсивність перебігу в біологічному субстраті процесу ВРПОЛ; 3) величину $\angle \alpha$ нахилу зростання повільного спалаху ІХЛ біологічного субстрату, яка свідчить про швидкість у ньому процесу перекисного окиснення ліпідів; 4) латентний період реакції після ініціації ХЛ – час від моменту внесення до біологічного субстрату стандартної концентрації Fe^{2+} до початку розвитку повільного спалаху ІХЛ (t_1 , с) та час виходу кривої ІХЛ на плато (t_2 , с), що характеризують співвідношення в біологічному субстраті прооксидантів та антиоксидантів. За показаннями хемілюмінометра отримували світлосуму ІХЛ за 6 хв реєстрації (S_1 , імп/6 хв), яка відображає вміст перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій у біологічному субстраті, що накопичилися в ньому внаслідок ініціювання ВРПОЛ іонами Fe^{2+} . Розраховували показник резистентності ліпідів біологічного субстрату до переокиснення (S_2 , імп/6 хв) як різницю між S_1 та сумою величини рівня СХЛ за 6 хв реєстрації ІХЛ. Оцінку функціонального стану системи ВРПОЛ у біологічних субстратах, що досліджували, проводили згідно [10]. Артеріальний тиск (АТ) у щурів вимірювали на хвостовій артерії за допомогою плетизмографа.

Результати досліджень обраховані статистично з використання т-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що ірбесартан знижує артеріальний тиск у щурів з АГ на 17 % (щури з АГ $156,0 \pm 2,0$ мм. рт. ст., під впливом ірбесартану $139,0 \pm 5,0$ мм. рт. ст.). При порівнянні активності системи ВРПОЛ у біологічних субстратах контрольних щурів WKY та HSIAN, яких досліджували (табл. 1–3), встановлено, що в групі щурів з АГ:

- у інтегруючому середовищі організму – плазмі крові майже удвічі подовжувався латентний період розвитку повільного спалаху ІХЛ ($110,0 \pm 14,0$ с проти $57,5 \pm 6,2$ с, $p < 0,01$) при незмінних інших показниках надслабкого світіння, що свідчило про зростання антиоксидантного захисту організму;
- у гомогенатах тканини печінки спостерігалася тенденція до підвищення рівня СХЛ (868 ± 38 імп/хв проти 655 ± 90 імп/хв, $p < 0,1$), що опосередковано підтверджувало факт активації ВРПОЛ;
- у гомогенатах тканини міокарда виявлено більш значущі порушення активності системи ВРПОЛ, свідченням чого були зменшення вмісту первинних продуктів процесу ПОЛ – гідроперекисів ліпідів ($44,0 \pm 5,2$ імп/с проти $52,7 \pm 2,1$ імп/с, $p < 0,2$) та перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій (6325 ± 2447 імп/6 хв проти 11756 ± 1612 імп/6 хв, $p < 0,1$), а також підвищення резистентності ліпідів мембран кардіоміоцитів до процесу переокиснення (2635 ± 1654 імп/6 хв проти 8314 ± 2305 імп/6 хв, $p < 0,1$), що поєднувалося також зі значним подовженням латентного періоду розвитку повільного спалаху ІХЛ ($115,0 \pm 20,5$ с проти $49,2 \pm 3,5$ с, $p < 0,02$).

За якісною оцінкою порушення активності системи ВРПОЛ у тканині міокарда щурів HSIAN засвідчували наявність структурно-функціонального ушкодження мембран кардіоміоцитів внаслідок тривалої активації процесу ліпопероксидації в серцевому м'язі.

Отже, встановлено, що у щурів контрольної групи HSIAN з уродженою стрес-індукованою артеріальною гіпертензією порівняно з нормотензивними щурами WKY виявлялися порушення активності системи ВРПОЛ у плазмі крові, тканині печінки та, особливо, тканині міокарда, характерні для тривалої активації процесу ліпопероксидації.

У плазмі крові гіпертензивних щурів, які отримували ірбесартан, порівняно з нормотензивними щурами WKY виявлялося накопичення первинних продуктів процесу ПОЛ – гідроперекисів ліпідів ($60,6 \pm 3,0$ імп/с проти $44,0 \pm 3,6$ імп/с, $p < 0,01$), прискорення швидкості окиснення ліпідів ($12,8 \pm 1,8^\circ$ проти $8,0 \pm 0,7^\circ$, $p < 0,05$), тенденція до накопичення перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій (13690 ± 2509 імп/6 хв проти 9004 ± 1025 імп/6 хв, $p < 0,2$) та до зниження резистентності її ліпідів до процесу переокиснення (10888 ± 2204 імп/6 хв проти 6631 ± 1352 імп/6 хв, $p < 0,2$). При цьому подовженими були латентний період розвитку повільного спалаху та час виходу кривої ІХЛ на плато

Таблиця 1

Активність системи вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові щурів з артеріальною гіпертензією за впливу ірбесартану, $M \pm m$

Група тварин	СХЛ, імп/хв	Fe ²⁺ -індукована хемілюмінесценція							
		h, імп/с	H, імп/с	I ₆ хв, імп/с	$\angle\alpha, ^\circ$	t ₁ , с	t ₂ , с	S ₁ , імп/6 хв	S ₂ , імп/6 хв
1. Контроль WKY	479 ± 129	44,0 ± 3,6	29,3 ± 4,2	28,0 ± 4,2	8,0 ± 0,7	57,5 ± 6,2	348,6 ± 8,3	9004 ± 1025	6631 ± 1352
2. Контроль HSIAN	654 ± 133	47,0 ± 6,7	37,0 ± 15,7	38,0 ± 14,6	6,5 ± 1,7	110,0 ± 14,0	352,5 ± 8,4	13199 ± 3906	9269 ± 4467
3. HSIAN + ірбесартан	464 ± 103	60,6 ± 3,0	42,0 ± 10,1	32,0 ± 10,1	12,8 ± 1,8	109,0 ± 12,9	360,0 ± 0,0	13690 ± 2509	10888 ± 2204
P ₁₋₂	< 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	< 0,5	< 0,01	> 0,5	< 0,5	> 0,5
P ₁₋₃	> 0,5	< 0,01	< 0,05	> 0,5	< 0,05	< 0,01	< 0,2	< 0,2	< 0,2
P ₂₋₃	> 0,5	< 0,1	> 0,5	> 0,5	< 0,05	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5

(табл. 1). Тоді як порівняно з контрольною групою щурів HSIAN після застосування ірбесартану виявлявся тільки приріст умісту в плазмі крові гідроперекисів ліпідів ($p < 0,1$) та суттєво зростала ($p < 0,05$) швидкість окиснення ліпідів (табл. 1).

Застосування у щурів з АГ ірбесартану призводило до активації системи ВРПОЛ у плазмі крові, що може бути пов'язане з його властивістю зв'язуватися з її білками [6].

На відміну від цього, у гомогенатах тканини печінки групи щурів, яким застосовували ірбесартан, не виявлено суттєвих порушень активності системи ВРПОЛ як порівняно з контрольними нормотензивними, так і контрольними гіпертензивними щурами (табл. 2). Останнє, вірогідно, зумовлене тим, що для реалізації свого фармакологічного ефекту ірбесартан не потребує метаболічної активації за участі гепатоцитів [7].

У гомогенатах тканини міокарда групи щурів HSIAN, яким застосовували ірбесартан, у порівнянні з нормотензивними щурами WKY контрольної групи знижувалася інтенсивність перебігу процесу ПОЛ ($21,3 \pm 6,4$ імп/с проти $38,0 \pm 9,0$ імп/с, $p < 0,2$) та нормалізувалися вміст перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій (9206 ± 2100 імп/6 хв проти 11756 ± 1612 імп/6 хв, $p < 0,5$) і резистентність ліпідів мембран кардіо-

оміоцитів до переокиснення (4575 ± 2103 імп/6 хв проти 8314 ± 2305 імп/6 хв, $p < 0,5$). При цьому зберігався подовженим латентний період розвитку повільного спалаху ІХЛ. У той самий час, у гомогенатах тканини міокарда групи щурів з АГ, яким застосовували ірбесартан, порівняно з щурами контрольної групи активність системи ВРПОЛ залишалася незмінною (табл. 3).

Ірбесартан у гіпертензивних щурів сприяє нормалізації таких важливих показників хемілюмінесценції гомогенатів міокарда, як вміст перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій і резистентність ліпідів мембран кардіоміоцитів до переокиснення, що засвідчувало наявність позитивних змін активності системи ВРПОЛ у серцевому м'язі.

Одним із механізмів нормалізуючого впливу ірбесартану на процеси ВРПОЛ є пониження артеріального тиску в щурів з АГ. Можливими механізмами є також пригнічення біологічних ефектів ангіотензину II та його судинозвужуючої дії. Сприяє регулюванню процесів ВРПОЛ під впливом ірбесартану зменшення перед- та післянавантаження на міокард, нормалізація вуглеводного та ліпідного обміну [5, 13, 15–17], а також функції нирок [18]. Для встановлення молекулярних механізмів дії ірбесартану на процеси ВРПОЛ у щурів з АГ необхідні подальші дослідження.

Таблиця 2

Активність системи вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у тканині печінки щурів з артеріальною гіпертензією за впливу ірбесартану, $M \pm m$

Група тварин	СХЛ, імп/хв	Fe ²⁺ -індукована хемілюмінесценція							
		h, імп/с	H, імп/с	I ₆ хв, імп/с	$\angle\alpha, ^\circ$	t ₁ , с	t ₂ , с	S ₁ , імп/6 хв	S ₂ , імп/6 хв
1. Контроль WKY	65 ± 90	76,6 ± 4,8	252,6 ± 15,7	93,1 ± 7,9	76,1 ± 2,4	25,0 ± 2,3	160,7 ± 9,8	65758 ± 3073	60546 ± 3222
2. Контроль HSIAN	868 ± 38	71,2 ± 5,2	236,0 ± 4,5	111,2 ± 11,2	78,6 ± 1,7	25,0 ± 3,2	163,0 ± 17,2	70006 ± 6904	65749 ± 5471
3. HSIAN + ірбесартан	830 ± 170	73,1 ± 4,8	244,0 ± 13,9	95,4 ± 10,3	79,1 ± 1,7	22,1 ± 1,5	161,4 ± 11,3	65960 ± 1924	60079 ± 2751
P ₁₋₂	< 0,01	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	< 0,5
P ₁₋₃	< 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	< 0,5	< 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
P ₂₋₃	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5

Активність системи вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у тканині міокарда щурів з артеріальною гіпертензією за впливу ірбесартану, $M \pm m$

Група тварин	СХЛ, імп/хв	Fe ²⁺ -індукована хемілюмінесценція							
		h, імп/с	H, імп/с	I ₆ хв, імп/с	∠α, °	t ₁ , с	t ₂ , с	S ₁ , імп/6 хв	S ₂ , імп/6 хв
1. Контроль WKY	559 ± 106	52,7 ± 2,1	38,0 ± 9,0	38,0 ± 9,0	9,0 ± 1,7	49,2 ± 3,5	360,0 ± 0,0	11756 ± 1612	8314 ± 2305
2. Контроль HSIAN	574 ± 111	44,0 ± 5,2	24,0 ± 9,0	24,0 ± 9,0	8,6 ± 1,7	115,0 ± 20,5	360,0 ± 0,0	6325 ± 2447	2635 ± 1654
3. HSIAN + ірбесартан	712 ± 128	50,9 ± 1,2	21,3 ± 6,4	21,3 ± 6,4	6,7 ± 1,6	85,0 ± 9,8	360,0 ± 0,0	9206 ± 2100	4575 ± 2103
P ₁₋₂	< 0,5	< 0,2	< 0,5	< 0,5	> 0,5	< 0,02	> 0,5	< 0,01	< 0,01
P ₁₋₃	< 0,5	< 0,5	< 0,2	< 0,2	< 0,5	< 0,01	> 0,5	< 0,5	< 0,1
P ₂₋₃	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5

Висновки

1. У щурів контрольної групи HSIAN з уродженою стрес-індукованою артеріальною гіпертензією порівняно з контрольними нормотензивними щурами WKY встановлено порушення активності системи ВРПОЛ у плазмі крові, тканині печінки та, особливо, у тканині міокарда, характерні для тривалої активації процесу ліпопероксидації.

2. Ірбесартан, який вводили внутрішньощлунково щурам HSIAN протягом 60 днів у дозі 30 мг/кг маси тіла, викликав незначну функціональну активацію системи ВРПОЛ у плазмі крові, що, вірогідно, може бути пов'язане з його властивістю зв'язуватися з її білками. У той самий

час його застосування не призводило до порушення активності системи ВРПОЛ у тканині печінки, вірогідно, внаслідок того, що для реалізації фармакологічного ефекту ірбесартан не потребує метаболічної активації за участю гепатоцитів.

3. Ірбесартан у щурів HSIAN нормалізує в гомогенатах міокарда вміст перекисних продуктів вільнорадикальних реакцій і сприяє резистентності ліпідів мембран кардіоміоцитів до перекиснення, що характерно для контрольних нормотензивних щурів лінії WKY, та свідчить про наявність позитивного впливу препарату на активність системи ВРПОЛ у серцевому м'язі.

1. Вплив біпрололу та метаболічних препаратів на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / І. С. Чекман, Р. С. Довгань, Л. О. Стеченко, Т. П. Куфтирева // Наук. вісн. Нац. мед. універ. – 2008. – № 2. – С. 40–49.
2. Довгань Р. С. Вплив біпрололу на проникливість мембран еритроцитів щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / Р. С. Довгань // УНМЖ. – 2008. – № 1–2. – С. 4–6.
3. Загородний М. І. Вплив корвазану на вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів у щурів зі спонтанною гіпертензією / М. І. Загородний, В. А. Стежка // Укр. молодіжн. жур. – 2009. – № 4. – С. 30–35.
4. Загородний М. І. Вплив тіотриазоліну на систему вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / М. І. Загородний, В. А. Стежка, В. В. Москаленко // Науковий Вісник Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця. – 2010. – № 2. – С. 21–28.
5. Кисляк О. А. Блокаторы ангиотензиновых рецепторов. Современные подходы к лечению артериальной гипертензии / О. А. Кисляк // РМЖ. – 2004. – № 15. – С. 935–940.
6. Комплексний вплив активаторів і блокаторів мембранних каналів на показники геодинаміки щурів з нормальним артеріальним тиском та зі спонтанною артеріальною гіпертензією /

- Тарасова К. В., Карвацкий И. М., Шевчук В. Г. [та ін] // Фізіологічний журнал. – 2004. – Т. 50, № 4. – С. 117–122.
7. Малишевский М. В. Ирбесартан в клинической практике / М. В. Малишевский // Кардиология. – 2012. – Т. 52, № 11. – С. 66–74.
 8. Рыжикова О. П. Нейрогенная вазоконстрикция пиальных артериальных сосудов различных порядков ветвления у нормотензивных и спонтанно-гипертензивных крыс / О. П. Рыжикова, В. Н. Шуваева, Д. П. Дворецкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, №1. – С. 12–15.
 9. Corder R. Effects of lisinopril on tissue levels of neuropeptide Y in normotensive and spontaneously hypertensive rats / R. Corder // J. Hum. Hypertens. – 2000. – V. 14, № 6. – P. 381–384.
 10. Стежка В. А. Деклараційний Патент України на корисну модель № 14624, G01N21/76, G01N33/52. Спосіб визначення активності вільнорадикального перекисного окислення ліпідів у біологічних субстратах. Опубл. 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006.
 11. Чекман І. С. Спонтанна артеріальна гіпертензія у щурів, патогенетичні механізми розвитку / І. С. Чекман, Я. М. Корнійкова, Р. С. Довгань // Ліки. – 2007. – № 1–2. – С. 10–14.
 12. Effects of lisinopril and amlodipine on antioxidant status in experimental hypertension / D. Mantle, V. Patel, H. J. Why [et al.] // J. Clin. Chim. Acta. – 2000. – V. 299, № 1–2. – С. 1–10.
 13. Renin-Angiotensin System Inhibitors Prevent the Recurrence of Atrial Fibrillation: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials / M. Han, Y. Zhang, S. Sun [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2013. – V. 62, №4. – P. 405–415.
 14. Huang K. The effect and mechanism of firsinopril on ventricular hypertrophy of SHR and left ventricular pressure overloading rat / K. Huang, G. Dai // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. – 2002. – V. 22, № 1. – P. 17–20.
 15. Potential of the Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) Telmisartan, Irbesartan, and Candesartan for Inhibiting the HMGB1/RAGE Axis in Prevention and Acute Treatment of Stroke / K. Kikuchi, S. Tancharoen, T. Ito [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14, № 9. – P. 18899–18924.
 16. Cardiac and renal protective effects of irbesartan via peroxisome proliferator-activated receptor- γ hepatocyte growth factor pathway independent of angiotensin II Type 1a receptor blockade in mouse model of salt-sensitive hypertension / H. Kusunoki, Y. Taniyama, H. Rakugi, R. Morishita // J. Am. Heart. Assoc. – 2013. – V. 2, № 2. – e000103.
 17. Action of irbesartan on blood pressure and glucose/lipid metabolism, in hemodialysis patients with hypertension / A. Onishi, Y. Morishita, M. Watanabe [et al.] // Int. J. Gen. Med. – 2013. – V. 6. – P. 405–411.
 18. Renal and cardiovascular effects of irbesartan in dialysis patients – a randomized controlled trial protocol (SAFIR study) C. D. Peters, K. D. Kjorgaard, B. Jespersen [et al.] // Dan. Med. J. – 2013. – V. 60, № 4. – A4602.

А. А. Нагорная, В. А. Стежка

Влияние ирбесартана на активность свободнорадикального перекисного окисления липидов у крыс с врожденной стресс-индуцированной артериальной гипертензией

Проведено исследование активности системы свободнорадикального перекисного окисления липидов (СРПОЛ) с использованием метода регистрации спонтанной и Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции в плазме крови и гомогенатах ткани миокарда и печени крыс линии HSIАН с врожденной стресс-индуцированной артериальной гипертензией. Эти показатели регистрировали у нормотензивных крыс линии WKY, контрольных крыс линии HSIАН, а также у гипертензивных животных линии HSIАН, которые в течение 60 дней получали ирбесартан в дозе 30 мг/кг массы тела (исходная масса тела 190–210 г). Подтверждено наличие у крыс контрольной группы HSIАН по сравнению с контрольными нормотензивными крысами WKY нарушений активности системы СРПОЛ в плазме крови, ткани печени и, особенно, ткани миокарда, характерных для длительной активации процесса липопероксидации. Применение ирбесартана у гипертензивных крыс вызвало незначительную функциональную активацию системы СРПОЛ в плазме крови, что, вероятно, может быть связано с его способностью связываться с ее белками. В то же время применение препарата не приводило к нарушению активности системы СРПОЛ в ткани печени, вероятно, вследствие того, что для реализации своего фармакологического эффекта ирбесартан не требует метаболической активации при участии гепатоцитов. Применение у крыс HSIАН ирбесартана сопровождалось нормализацией в гомогенате миокарда содержания перекисных продуктов свободнорадикальных реакций и резистентности липидов мембран кардиомиоцитов до уровней, характерных для контрольных нормотензивных крыс WKY, что свидетельствовало о положительном влиянии ирбесартана на активность системы СРПОЛ в сердечной мышце.

Ключевые слова: ирбесартан, артериальная гипертензия, свободнорадикальное перекисное окисление липидов

A. A. Nahornaya, V. A. Stezhka

Irbesartan influence on free radical lipid peroxidation in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension

It has been investigated the activity of free radical lipid peroxidation (FRLP) using the registration method of spontaneous and Fe^{2+} -induced chemiluminescence in plasma, myocardial tissue homogenates and liver of rats with hereditary stress induced arterial hypertension (HSIAH). These data have been registered in normotensive rats WKY, control rats HSIAH and the animals HSIAH line receiving irbesartan 30 mg / kg of body within 60 days, (initial body weight 190–210 g). It has been confirmed in the rats of control group HSIAH compared with control normotensive WKY rats FRLP system activity disturbance in plasma, liver tissue, especially myocard tissue, typical for long-term activation of the process of lipid peroxidation. The use of irbesartan in rats HSIAH caused insignificant functional activation of FRLP in the plasma, which probably can be attributed to its binding with proteins ability. At the same time, its application does not lead to disturbance of the FRLP system activity in liver tissue, probably because irbesartan does not require metabolic activation with the hepatocytes participation for realization of pharmacological effect. The use of irbesartan in rats HSIAH accompanied by normalization in myocardial homogenates content peroxidation products of free radical reactions and resistance of membranes lipids to the levels of peroxidation typical for control normotensive rats WKY, that was proved the presence of positive changes in the FRLP system activity in heart muscle.

Key words: irbesartan, arterial hypertension, free radical lipid peroxidation

Надійшла: 21.11.2013 р.

Контактна особа: Нагорна Олена Олександрівна, кандидат медичних наук.
Тел.: + 38 0 44 498 43 01. Електронна пошта: office@alexharm.ua

К. О. Степанова

Вивчення лікувальних властивостей нових песаріїв «Клімедекс» за умов експериментального вагініту

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: фармакологічне дослідження, песарії, експериментальний вагініт, протизапальна та репаративна активність

Проблема запальних захворювань жіночих статевих органів (ЗЗЖСО) й досі залишається однією з найважливіших в акушерстві та гінекології. Основою розвитку та формування ЗЗЖСО є взаємопов'язані процеси, що розпочинаються з гострого запалення, а закінчуються деструктивними змінами [1–2].

Неефективність традиційних схем, відсутність єдиних підходів та рекомендацій щодо лікування ЗЗЖСО залишає відкритим питання вибору оптимальних схем лікування [3–4]. Саме тому пошук та розробка нових лікарських засобів комплексної дії, що здатні одночасно впливати на всі ланки етіопатогенезу даних захворювань, проявляти антимікробну, протизапальну та репаративну активність, залишаються актуальними.

Сьогодні комбіновані препарати для місцевого застосування вже широко використовують у країнах Європи, Азії та Південної Америки [5]. Все це зумовило актуальність розробки нових песаріїв, під умовною назвою «Клімедекс».

Одними з найпоширеніших екзогенних факторів, що призводять до змін піхвової мікрофлори та сприяють розвитку неспецифічних вагінітів, є порушення особистої гігієни статевих органів, часті піхвові душі й спринцювання з використанням антисептичних засобів та неконтрольоване використання сперміцидів. *Мета дослідження* – вивчення протизапальних та репаративних властивостей нових песаріїв, умовно названих «Клімедекс» (уміст: основа – ПЕО, загальна кількість дію-

чих речовин 555 мг), що були розроблені на кафедрі технології ліків Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Т. Г. Ярних [6], на моделі вагініту, що викликаний хімічним агентом.

Матеріали та методи. Модельну патологію відтворювали шляхом введення у піхву дослідних тварин тампона з 10 % розчином азотнокислого срібла та його експозицією протягом 5 хв [7], яких попередньо поділяли на вісім експериментальних груп по 10 тварин у кожній: 1 група – інтактний контроль (ІК); 2 група – позитивний контроль (ПК), неліковані тварини з відтвореним експериментальним вагінітом; 3 група – тварини, яким на фоні вагініту вводили основу песаріїв, що містила суміш ПЕО-1500 та ПЕО-400 (9:1); 4 група – тварини, яким на фоні експериментального вагініту вводили нові песарії «Клімедекс»; 5 група – тварини, яким на фоні експериментального вагініту вводили препарат порівняння – вагінальні таблетки «Мікожинакс»; 6 група – тварини, яким на фоні експериментального вагініту вводили препарат порівняння «Супозиторії з обліпиховою олією».

Висновок про виразність розвитку патологічних процесів проводили на основі вивчення динаміки маси тіла, яку оцінювали на 1 (до моделювання патології) та на 9 добу експерименту, та аналізу стану зовнішніх статевих органів. Після завершення експерименту у тварин визначали загальну площу ураження піхви, її відносну масу та інтегровані показники наступних ознак: набряку, гіперемії, крововиливів.

Для оцінки тяжкості перебігу патологічного процесу також вивчали гематологічні показники периферичної крові [8].

Статистичну обробку отриманих даних проводили за методами описової статистики та порівнянням вибірок (з використанням параметричних та непараметричних критеріїв). Статистично значущими вважали дані при $p \leq 0,05$. Обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета StatSoft.

Результати та їх обговорення. Як показали результати досліджень, введення в піхву 10 % розчину азотнокислого срібла призводить до розвитку виразних ерозивних ушкоджень слизової оболонки піхви (СОП) тварин, що підтверджувались зміною трофічних процесів та гематологічних показників периферичної крові.

Згідно з отриманими даними, у групі ПК на 9 добу маса дослідних тварин на 7,69 % була нижчою, ніж у групі тварин ІК ($p < 0,05$).

Динаміка маси тварин у групах, де лікування проводили песаріями «Клімедекс», відповідала показникам групи ІК ($p > 0,05$). У групах препаратів порівняння також спостерігали тенденцію до відновлення трофічних процесів, зокрема, збільшувалася маса тіла тварин відносно групи ПК (табл. 1).

Аналіз стану статевих органів вказував на наявність виразної запальної реакції в групі ПК, що супроводжува-

лася набряком та гіперемією СОП та зовнішніх статевих органів.

Повну відсутність набряку та запалення вже на 3 добу реєстрували у групі тварин, яким вводили песарії «Клімедекс». У тварин, які отримували «Супозиторії з обліпиховою олією», набряк та запалення повністю зникали на 4 добу. Частково зникнення ознак запалення на 4 добу також спостерігали й у групі препарату порівняння – вагінальних таблеток «Мікожинакс», гіперемію в цій групі реєстрували до 5 доби введення препарату.

Зміни масових коефіцієнтів піхви тварин наведено в таблиці 2.

Збільшення відносної маси піхви тварин у 2,31 разу в групі ПК відносно групи ІК ($p = 1 \cdot 10^{-7} < 0,05$) також свідчило про виразну запальну реакцію, яка супроводжувала перебіг модельної патології в щурів.

Дані макроскопічного дослідження піхви підтверджували розвиток модельної патології в щурів на фоні введення азотнокислого срібла, що проявлялося утворенням чисельних ерозивних ушкоджень СОП (табл. 3).

Загальна площа ураження піхви в групі ПК становила 65,35 % ($p = 1,00 > 0,05$). Інтегральні показники геморагії, набряку та гіперемії в цій групі мали максимальне значення. У

Таблиця 1

Динаміка маси тіла щурів на фоні вагініту та застосування песаріїв «Клімедекс», n = 10

Умови досліджу	Вихідні дані, г ($x \pm \Delta$)	9-доба, г ($x \pm \Delta$)
Інтактний контроль	202,50 $\pm$ 1,89	208,00 $\pm$ 1,85
Позитивний контроль (експериментальний вагініт)	201,00 $\pm$ 2,26	192,00 $\pm$ 2,50*
Експериментальний вагініт + основа	203,00 $\pm$ 1,85	193,50 $\pm$ 1,73*/@/ε/♯
Експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс»	202,00 $\pm$ 1,85	206,00 $\pm$ 1,51**
Експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс»	201,00 $\pm$ 2,26	202,00 $\pm$ 1,85*/**
Експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією»	200,50 $\pm$ 2,03	203,50 $\pm$ 1,73*/**

Примітка. Тут і в табл. 2–5: *відхилення показника достовірно відносно групи інтактного контролю, $p \leq 0,05$; **відхилення показника достовірно відносно групи позитивного контролю, $p \leq 0,05$; #відхилення показника достовірно відносно групи експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс», $p \leq 0,05$; ε відхилення показника достовірно відносно групи експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс», $p \leq 0,05$; @ відхилення показника достовірно відносно групи експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією», $p \leq 0,05$; n – кількість тварин у групі.

Таблиця 2

Масовий коефіцієнт піхви щурів на фоні вагініту та застосування песаріїв «Клімедекс», n = 10

Умови досліджу	Масовий коефіцієнт піхви, (x ± Δ)
Інтактний контроль	0,153 ± 0,003
Позитивний контроль (експериментальний вагініт)	0,353 ± 0,005*
Експериментальний вагініт + основа	0,346 ± 0,003*/@/&/#
Експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс»	0,195 ± 0,003**/*@/&/#
Експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс»	0,275 ± 0,002**/*@/&/#
Експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією»	0,245 ± 0,002**/*@/&/#

Таблиця 3

Показники стану слизової оболонки піхви щурів на фоні вагініту та застосування песаріїв «Клімедекс», n = 10

Умови досліджу	Загальна площа ураженої піхви, %, (x ± Δ)	Інтегральні показники стану піхви, бали			
		Набряк	Гіперемія	Інтенсивність крововиливів	Сумарний показник
Інтактний контроль	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Позитивний контроль (експериментальний вагініт)	65,35 ± 1,35*	3,00	3,00	3,00	9,00*
Експериментальний вагініт + основа	64,40 ± 0,98*/@/&/#	3,00	3,00	3,00	9,00*/@/&/#
Експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс»	0,47 ± 0,48**/*@/&/#	0,50	0,00	0,00	0,50**/*@/&/#
Експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс»	18,82 ± 0,92**/*@/&/#	2,00	2,00	1,00	5,00**/*@/&/#
Експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією»	7,85 ± 0,73**/*@/&/#	1,50	1,00	0,00	2,50**/*@/&/#

групі тварин, яким вводили песарії «Клімедекс», спостерігали поодинокі, незначні ураження піхви чи повну їхню відсутність. Застосування вагінальних таблеток «Мікожинакс» та «Супозиторіїв з обліпиховою олією» на фоні патологічного процесу призводило до статистично достовірного зменшення ерозивного ушкодження СОП у 3,47 разу ($p < 0,05$) та 8,32 разу ($p < 0,05$) відповідно до показників групи ПК. Інтегральні показники стану СОП тварин за всіма досліджуваними показниками в групах, де лікування проводили песаріями «Клімедекс», свідчили про повну

відсутність гіперемії, крововиливів та набряку тканин. Препарати порівняння дещо поступались досліджуваним песаріям, проте також позитивно впливали на дані показники. Однак статистично достовірну різницю відносно групи ПК реєстрували лише при застосуванні «Супозиторіїв з обліпиховою олією» ($p < 0,05$).

Зміни гематологічних показників надані в таблицях 4–5.

У тварин ПК на фоні впливу азотно-кислого срібла були визначені характерні ознаки системного запалення. Так, у крові реєстрували лейкоцитоз, що харак-

Таблиця 4

Гематологічні показники в щурів на фоні вагітності та застосування песаріїв «Клімедекс», n = 10

Умови досліджу	Еритроцити, $10^{12}/л$	Гемоглобін, г/л	ШОЕ, мм/год	Лейкоцити, $10^9/л$
Інтактний контроль	4,41 ± 0,03	134,90 ± 1,85	2,70 ± 0,35	11,08 ± 0,15
Позитивний контроль (експериментальний вагініт)	3,29 ± 0,03*	113,89 ± 1,63*	6,50 ± 0,38*	16,55 ± 0,14*
Експериментальний вагініт + основа	3,30 ± 0,03*/@/#	114,94 ± 2,00*/@/#	6,30 ± 0,35*/#	16,28 ± 0,13*/@/#
Експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс»	4,21 ± 0,02*/**/@/#	130,81 ± 1,59**/@/#	3,50 ± 0,38**	13,00 ± 0,15**
Експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс»	3,76 ± 0,02*/**/@/#	121,23 ± 1,05*/**/@/#	4,90 ± 0,23*	14,50 ± 0,14*
Експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією»	3,99 ± 0,03*/**/@/#	126,37 ± 0,99*/**/@/#	4,30 ± 0,48*	13,78 ± 0,13**

Таблиця 5

Лейкоцитарна формула крові щурів на фоні вагітності та застосування песаріїв «Клімедекс», n=10

Умови досліджу	Нейтрофіли, %	Еозинофіли, %	Лімфоцити, %	Моноцити, %
Інтактний контроль	25,70 ± 0,48	1,60 ± 0,37	69,90 ± 0,53	2,80 ± 0,30
Позитивний контроль (експериментальний вагініт)	36,30 ± 0,35*	4,10 ± 0,41*	55,30 ± 0,68*	4,30 ± 0,35*
Експериментальний вагініт + основа	36,40 ± 0,37*/@/#	3,90 ± 0,23*/@/#	55,30 ± 0,59*/@/#	4,40 ± 0,37*
Експериментальний вагініт + песарії «Клімедекс»	27,30 ± 0,48**	1,80 ± 0,30**	67,70 ± 0,48**	3,20 ± 0,30**
Експериментальний вагініт + вагінальні таблетки «Мікожинакс»	32,70 ± 0,35*	2,00 ± 0,34*	61,70 ± 0,48*	3,60 ± 0,37*
Експериментальний вагініт + «Супозиторії з обліпиховою олією»	30,00 ± 0,48	2,50 ± 0,38**	64,10 ± 0,79**	3,40 ± 0,37

теризувався достовірним збільшенням кількості лейкоцитів у 1,49 разу ($p < 0,05$) відносно даних, зафіксованих у групі ІК. У лейкоформулі – еозинофілія, нейтрофіліоз та лімфопенія (кількість нейтрофілів підвищена в 1,42 разу ($p < 0,05$), кількість еозинофілів – у 2,56 разу ($p < 0,05$), рівень лімфоцитів зменшений у 1,26 разу ($p < 0,05$)).

Поряд з лейкоцитозом та відповідними змінами у лейкоцитарній форму-

лі достовірною ознакою наявності вираженого запального процесу також було підвищення ШОЕ у 2,4 разу ($p < 0,05$) порівняно з групою ІК. У групі тварин ПК відмічено достовірне зниження кількості еритроцитів і гемоглобіну в 1,34 ($p < 0,05$) та 1,18 разу ($p < 0,05$) відповідно до показників групи ІК.

У групі тварин, яким протягом семи діб вводили песарії «Клімедекс», дані за всіма гематологічними показниками не

відрізнялись від групи ІК ($p > 0,05$), що вказувало на їх значний лікувальний ефект за експериментального вагініту.

Про пригнічення запального процесу в групах, де лікування проводили препаратами порівняння – вагінальними таблетками «Мікожинакс» та «Супозиторіями з обліпиховою олією», також свідчили дані гематологічних показників. В обох групах реєстрували зменшення кількості лейкоцитів на 37,47 % ($p > 0,05$) та 50,63 % ($p < 0,05$) відповідно та ШОЕ – на 42,10 % ($p > 0,05$) та 57,89 % ($p > 0,05$) відносно показників групи ІК, проте ці показники не були статистично достовірними та значно поступалися даним групи, де лікування проводили песаріями «Клімедекс».

Отже, результати вивчення лікувальної ефективності песаріїв «Клімедекс» на моделі експериментального вагініту вказують на наявність виражених протизапальних та репаративних власти-

востей досліджуваного препарату. За всіма показниками песарії «Клімедекс» перевершували препарати порівняння – вагінальні таблетки «Мікожинакс» та «Супозиторії з обліпиховою олією».

Висновки

Встановлено виразну лікувальну дію песаріїв «Клімедекс» на моделі вагініту, який викликали хімічним подразником, що підтверджувалося результатами проведених макроскопічних та гематологічних досліджень. Доведено, що песарії «Клімедекс» за лікувальним ефектом перевершують препарати порівняння: вагінальні таблетки «Мікожинакс» та «Супозиторії з обліпиховою олією». Отримані результати свідчать про доцільність подальшого поглибленого вивчення песаріїв «Клімедекс» як перспективного комбінованого лікарського засобу для лікування запальних захворювань жіночих статевих органів.

1. Кира Е. Ф. Инфекции и репродуктивное здоровье / Е. Ф. Кира // Журнал акуш. и женск. болезней. – 2000. – № 1. – С. 50–58.
2. Кисина В. И. Бактериальный вагиноз: современное состояние проблемы / В. И. Кисина, Н. А. Полищук, Е. Ю. Канищева // Вестник дерматологии и венерологии. – 2003. – № 4. – С. 16–22.
3. Кисина В. И. Критерии выбора рекомендованных и альтернативных методов лечения урогенитальных инфекций / В. И. Кисина, В. П. Ковалык, Г. Л. Колиева // Трудный пациент. – 2005. – Т. 3, № 2. – С. 3–6.
4. Анкирская А. С. Инфекции влагалища: лабораторная диагностика оппортунистических инфекций влагалища [Електронний ресурс] / А. С. Анкирская, В. В. Муравьева // Consilium medicum. – 2005. – Т. 7, № 3. – Режим доступа до журн.: http://old.consilium-medicum.com/media/consilium/05_03/206.shtml
5. Кира Е. Ф. Комбинированная терапия инфекционных заболеваний женских половых органов / Кира Е. Ф. // Гинекология. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 26–69.
6. Патент 61038 України на корисну модель, МПК А 61 К 9/02, А 61 К 31/00, А 61 К 36/72, А 61 Р 15/02. Засіб у формі песаріїв для лікування інфекційно-запальних гінекологічних захворювань / Степанова К. О., Должикова О. В., Малоштан Л. М., Левачкова Ю. В., Чушенко В. М., Ярних Т. Г.; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – № u 2010 13780; заявл. 19.11.2010; опубл. 11.07.2011, Бюл. № 13.
7. Патент 62115 України на корисну модель, МПК G 09 В 23/28, А 61 К 33/38. Спосіб моделювання асептичного запалення слизової оболонки піхви / Степанова К. О., Должикова О. В., Малоштан Л. М., Малоштан А. В.; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – № u 2011 01356; заявл. 07.02.2011; опубл. 10.08.2011, Бюл. № 15.
8. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностики: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.

К. О. Степанова

Изучение лечебных свойств новых пессариев «Климедекс» в условиях экспериментального вагинита

Работа посвящена изучению лечебных свойств новых пессариев, условно названных «Климедекс», на модели вагинита. Применение пессариев, условно названных «Климедекс», на фоне вагинита, вызванного химическим раздражителем, подтвердило наличие выраженных противовоспалительных и репаративных свойств и доказало их высокую эффективность и преимущество относительно препаратов сравнения – вагинальных таблеток «Микожинакс» и «Суппозиторий с облепиховым маслом». Полученные данные свидетельствовали о положительном влиянии новых песса-

риев «Климедекс» на течение экспериментального вагинита, который проявлялся в нормализации трофических процессов, устранении внешних признаков воспаления, уменьшении отечности и площади поражения влагалища животных.

Ключевые слова: фармакологическое исследование, пессарии, экспериментальный вагинит, противовоспалительная и репаративная активность

K. O. Stepanova

Study of the medicinal properties pessaries «Klimeseks» on the model of experimental vaginitis

The pharmacological properties of new pessaries for treating vaginitis conventionally identified as «Klimeseks» have been studied in the article. The study of «Klimeseks» carried out on the model of experimental vaginitis caused by chemical stimuli has confirmed the presence of expressed anti-inflammatory and reparative properties. Comparative studies have confirmed its high efficiency and superiority in comparison to vaginal tablets «Mycogynax» and «Suppository with sea buckthorn oil». The data obtained demonstrated significant positive effects of new pessaries «Klimeseks» on experimental vaginitis, which was manifested in normalization of the trophic processes, eliminating external signs of inflammation, reducing swelling and vaginal area affected in animals. Swelling and inflammation in the group of the animals which were treated by pessaries «Klimeseks» were observed on the third day. The macroscopic studies in this group have also confirmed its positive impact. Treated animals had only a few, minor lesions of the vagina or even demonstrated its complete absence. Integrated indicators of the vaginal mucosa of animals in all defined indices in the group with «Klimeseks» showed a complete absence of hyperemia, hemorrhage and edema of tissues. The results of the study of hematological parameters confirmed that the group of animals which have been treated with «Klimeseks» were without differences in comparison to the intact control group ($p > 0,05$), indicating a significant therapeutic effect. In conclusion, the results indicate the prospects of further study pessaries «Klimeseks» for inclusion in the scheme of local therapy as an effective tool for the treatment of vaginitis of various etiology.

Key words: pharmacological studies, pessaries, experimental vaginitis, anti-inflammatory and reparative activity

Надійшла: 16.12.2013 р.

Контактна особа: Степанова Катерина Олександрівна, кандидат фарм. наук, асистент, кафедра клінічної фармакології, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, буд. 3, вул. Челюскінців, м. Харків, 61001.
Тел./факс: + 38 057 7041554. Електронна пошта: StKatrin_NFaY@mail.ru

Г. М. Шаяхметова

Вплив етамбутолу на структурно-функціональні показники гонад та фертильність щурів-самців

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: етамбутол, фертильність, сім'яники

Приблизно в 7 % чоловіків репродуктивного віку клінічно діагностують безпліддя. У 75 % безплідних чоловіків виявляють первинну тестикулярну недостатність. Незважаючи на прогрес, головним чином в області генетики, етіологія даного захворювання лишається невідомою в 50 % випадків, так зване «ідіопатичне безпліддя» [1]. При цьому відомо, що чоловіча репродуктивна функція може зазнавати шкідливих впливів у результаті надходження до організму ксенобіотиків – репродуктивних токсикантів з навколишнього середовища, внаслідок шкідливих звичок (тютюнопаління) або хіміотерапії [2, 3]. Раніше нами було показано, що введення комбінації протитуберкульозних засобів I ряду етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду щурам-самцям протягом періоду сперматогенезу викликало значні біохімічні та морфо-функціональні порушення в гонадах, які, у кінцевому результаті призводили до фатального зниження запліднювальної здатності самців, зменшення плодовитості запліднених ними самиць, значного зростання рівня до- та післяімплантаційної смертності ембріонів [4, 5]. Зміни репродуктивних показників самців у даному випадку могли бути результатом прямої або опосередкованої токсичної дії на гонади, як одного, так і декількох із застосованих препаратів, що зумовило необхідність подальших досліджень.

Мета дослідження – вивчення впливу етамбутолу на фертильність та структурно-функціональні показники сім'яників щурів-самців.

Матеріали та методи. Субстанція етамбутолу (Ethambutolum, (+)-N,N'-етилєн-біс-(2-амінобутан-1-ол) була надана ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод». У дослідженні використовували самців та самиць щурів лінії Вістар з початковою масою тіла 150–170 г, наданих ПП «Біомодельсервіс», м. Київ. Щурів утримували в стандартних умовах віварію за температури 22–24 °C та відносної вологості 30–70 % з вільним доступом до корму та води. Групи самців-щурів (по 12 особин у кожній) формували за методом рандомізації з попередньою акліматизацією протягом 10 днів: 1 група – внутрішньошлункове введення етамбутолу в 1 % крохмальному гелі; 2 – контроль (внутрішньошлункове введення 1 % крохмального гелю). Етамбутол з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [6] вводили в дозі 155 мг/кг, яку застосовують у клініці для короткотермінової комбінованої терапії туберкульозу [7]. Уведення продовжували протягом 60 днів (період сперматогенезу з урахуванням терміну дозрівання сперматозоїдів в епідидимісі). Через 60 днів повторних введень щурів обох груп парували з інтактними самицями у співвідношенні 1 : 1 протягом 14 днів (2–3 естральних цикли). У цей час самцям щурів продовжували вводити етамбутол. Його вплив на статеву поведінку та запліднювальну здатність самців визначали за величиною індексу:

$$\frac{\text{число вагітних самиць}}{\text{число самиць парованих із самицями}} \cdot 100$$

Після закінчення терміну парування та через 24 год після останнього введення етамбутолу самців під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії дислокацією шийних хребців та виділяли

сім'яники з придатками (епідидимісами) для визначення структурно-функціональних показників [8, 9]. Самців піддавали евтаназії на 20 день вагітності. Першим днем вагітності вважали наявність сперматозоїдів у вагінальних мазках. Після лапаротомії вилучали роги матки з яєчниками, визначали кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантацій у матці, кількість живих плодів та таких, що були в стадії резорбції. Ці дані використовували для визначення показників доімплантаційної та післяімплантаційної загибелі згідно із загальноприйнятими методами [8, 9]. План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ «ІФТ НАМН України»; усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Результати та їх обговорення. Підрахунок кількості самиць, що завагітніли

показав значне зниження фертильності самців після введення етамбутолу (табл. 1). З 12 парованих самиць завагітніло лише 4, у той час як у контролі індекс запліднювальної здатності склав 92 %. Це може бути пов'язане як з інкреторним (стероїдогенним), так із гонадо- або сперматотоксичним впливом етамбутолу на організм тварин [8].

Важливим показником для тварин з багатоплідною вагітністю, який характеризує стан як материнського, так і батьківського організму, є плодючість – середня кількість живих плодів на одну самицю. На останній показник можуть впливати екзогенні та ендогенні фактори, що змінюють гормональний статус організму. Оцінка плодючості та результатів вагітності в даному випадку забезпечує оцінку ступеня ураження репродуктивної системи самців.

Згідно з даними таблиці 2 у самиць, яких парували з піддослідними самця-

Таблиця 1

Індекс запліднювальної здатності щурів-самців за умов введення етамбутолу

Група самців	Кількість парованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності
Контроль	12	11	91,66
Етамбутол	12	4	33,33

Таблиця 2

Показники фертильності, ембріо- та фетогенезу на 20 день вагітності інтактних щурів-самиць, запліднених самцями, яким вводили етамбутол

Показник		Експериментальні групи	
		Контроль	Етамбутол
Кількість вагітних самиць у групі		11	4
Загальна кількість жовтих тіл в яєчниках		123	34
Кількість жовтих тіл на 1 самицю, $M \pm m$		$8,50 \pm 0,73$	$11,18 \pm 0,41$
Загальна кількість місць імплантації		110	16
Кількість місць імплантації на 1 самицю, $M \pm m$		$10,00 \pm 0,73$	$4,00 \pm 1,03^*$
Доімплантаційна загибель	абс.	13	18
	%	11	53
Післяімплантаційна загибель	абс.	3	1
	%	3	6
Загальна смертність, %		13	56
Кількість живих плодів, абс.(%)		107 (97)	15 (94)
Кількість живих плодів на одну самицю, $M \pm m$		$9,72 \pm 0,78$	$3,75 \pm 0,47^*$

Примітка. Тут і в табл. 2–4: *відмінності вірогідні порівняно з контрольною групою ($p \leq 0,05$).

ми, фатально знижувався показник плодючості (кількість живих плодів на одну самицю була меншою, ніж у контролі в 2,6 разу).

Для отримання даних з репродуктивної токсичності корисним є застосування тесту домінантних леталей, у якому самиць піддають евтаназії в середині третього триместру вагітності. У даному тесті визначають до та післяімплантаційну загибель. Рівень ембріональної смертності в самиць, запліднених самцями, які піддавалися впливу ксенобіотиків, є одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію. Дані, наведені в таблиці 2, дозволяють порівняти характеристики ембріональної смертності потомства самців дослідної та контрольної груп у різні періоди ембріонального розвитку та свідчать про значний негативний ефект етамбутолу на чоловічу генеративну функцію. Зокрема, у дослідній групі спостерігали значне підвищення рівня доімплантаційної загибелі ембріонів, яка склала 53 %. Відповідним чином зростав і показник загальної ембріональної смертності.

Доімплантаційна загибель ембріонів може спостерігатись як внаслідок мутагенної дії речовини, так і немутагенних факторів, у результаті яких виникають проблеми з заплідненням (наприклад, зменшення кількості нормальних та рухливих сперматозоїдів, порушення транспорту сперматозоїдів або проникнення їх у яйцеклітину) [9].

Для визначення внеску мутагенної або немутагенної дії етамбутолу необхідно провести додаткові дослідження щодо його мутагенності та/або сперма-

тотоксичності. Але, принаймні в науковій літературі нами було знайдено повідомлення, що при введенні етамбутолу в дозах 25 мг/кг та 250 мг/кг щурам та півням, цей препарат викликав пошкодження сперматогенного епітелію з наступним блокуванням сперматогенезу [10].

Дані, що характеризують морфологічний стан гонад щурів-самців, які протягом періоду сперматогенезу отримували етамбутол, наведено в таблиці 3.

Вони свідчать про зниження абсолютної маси сім'яників у щурів дослідної групи на 13 % порівняно з контролем. Варто відзначити, що у випадку дослідження маси сім'яників саме абсолютна, а не відносна маса точніше характеризує стан даних органів. Пов'язано це з тим, що маса сім'яників статевозрілих тварин, так само як і мозку, практично не залежить від маси тіла [9]. Виявлене нами зниження маси сім'яників може свідчити про втрату гермінативних клітин та зменшення продукції рідини у сім'яних каналцях – це, у свою чергу, може бути пов'язано з втратою сперматид, що подовжуються та/або зниженням рівня тестостерону [9].

Результати дослідження епідидимальної суспензії показали, що етамбутол викликав зниження продукції статевих клітин сім'яниками на 67 % порівняно з контролем (табл. 3).

Мікроскопічний аналіз морфологічних особливостей сперматозоїдів виявив поряд з нормальними клітинами поодинокі петлеподібні форми, які з однаковою частотою зустрічались у щурів дослідної та контрольної груп,

Таблиця 3

Показники функціонального стану сперматозоїдів та маса гонад щурів-самців за умов введення етамбутолу протягом періоду сперматогенезу, $M \pm m$, $n = 12$

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Етамбутол
Маса сім'яників, г	$3,48 \pm 0,09$	$3,02 \pm 0,05^*$
Кількість сперматозоїдів, млн/мл	$47,07 \pm 5,30$	$15,58 \pm 2,34^*$
Час рухливості, хв	$620,58 \pm 19,11$	$238,00 \pm 44,99^*$
Резистентність до зростаючих концентрацій KCl, % KCl	$2,62 \pm 0,11$	$1,58 \pm 0,29^*$

недозрілих статевих клітин не спостерігали. Але, слід зазначити, що в суспензії сперматозоїдів із хвостової частини епідидимісів самців, яким вводили етамбутол, виявився високий відсоток клітин з відокремленими голівками. Такий феномен, скоріше за все, пов'язаний зі зміною механічних властивостей сперматозоїдів тварин даної групи та деструкцією клітин під час стандартного приготування суспензії для дослідження. Подібна аномалія, можливо, є свідченням підвищеного доступу етамбутолу до гермінативних клітин [8].

Були досліджені показники, які опосередковано свідчать про енергетичні можливості сперматозоїдів (характер рухової активності, тривалість руху) та їхню стійкість до змін оточуючого середовища – осморезистентність (табл. 3). Загальний час рухової активності статевих клітин після введення етамбутолу зменшувався на 62 % порівняно з контролем. У той самий час їхня життєздатність, що визначається за показником осмотичної резистентності відносно розчинів калію хлориду зростаючих концентрацій, знижувалася на 40 %.

Результати дослідження стану клітин, які належать до сперматогенного епітелію, представлені в таблиці 4. Згідно з ними індекс сперматогенезу, що відтворює збереження різних типів клітин сперматогенного епітелію, у сім'яниках щурів дослідної групи був вірогідно нижчим ніж у контролі. Негативного впливу зазнали первинні клітини сперматогенезу – сперматогонії, введення етамбутолу призвело до суттєвого зниження мітотичної актив-

ності, а отже зменшення їхньої кількості в поперечних зрізах каналців сім'яників. Кількість клітин у 12 стадії мейозу, що характеризує мейотичний поділ сперматоцитів I порядку, у сім'яниках дослідних щурів була в 1,8 разу меншою порівняно з контролем. Очевидно, що зниження мейотичної активності сперматоцитів I порядку узгоджується з даними щодо зниження продукції сперматозоїдів у цій групі самців (табл. 4).

Виявлено, що в щурів дослідної групи нерідко спостерігалися пусті та деформовані каналці, а також каналці з дисконкомплексованим сперматогенним епітелієм та поодинокі каналці, заповнені загиглими сім'ярдними клітинами. Набагато частіше, ніж у контролі, зустрічалися невеликі ділянки з відсутніми статевими клітинами, так звані «вікна», а також сперматозоїди в стані деструкції, що проявлялося їхньою адгезією і фрагментацією.

У щурів дослідної групи відсоток випадків злущування сперматогенного епітелію в просвіт каналця та відшарування епітелію від базальної мембрани був вищим, ніж в контролі у 2,8 та 3,2 разу відповідно (табл. 4).

Відомо, що до дезінтеграції процесів сперматогенезу залучаються різні механізми. Токсиканти можуть впливати на кожен з типів ранніх гермінативних клітин у базальному компартменті сім'яного епітелію або один чи більше типів зрілих гермінативних клітин у адлюмінальному компартменті. Дія ксенобіотики на більш розвинені гермінативні клітини після подолання гематотестикулярного бар'єру може бути пря-

Таблиця 4

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію в щурів за умов введення етамбутолу $M \pm m$, $n = 12$

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Етамбутол
Індекс сперматогенезу	$3,62 \pm 0,01$	$3,484 \pm 0,001^*$
Число сперматогоній	$69,39 \pm 0,75$	$57,84 \pm 0,47^*$
12 стадія мейозу, %	$3,56 \pm 0,36$	$2,00 \pm 0,32^*$
Злущений епітелій, %	$1,06 \pm 0,25$	$3,000 \pm 0,001^*$
Відшарування епітелію, %	$0,31 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,32$
Вікна, %	$0,50 \pm 0,16$	$1,40 \pm 0,51$

мою або опосередкованою порушенням функцій клітин Сертолі [8]. З іншого боку, на сперматогенний епітелій, зокрема на процес перетворення сперматид у спермії, безпосередньо впливає тестостерон, у той час як гонадотропні гормони гіпофізу стимулюють клітини Лейдіга, які продукують андрогени, підтримують мейотичну та постмейотичну фази сперматогенезу [8, 11].

Отримані дані спонукають до проведення подальших досліджень для з'ясування біохімічних та/або ендокринних механізмів негативної дії етамбутолу на чоловічу репродуктивну функцію.

Висновки

Уведення етамбутолу в терапевтичній дозі щурам-самцям протягом періоду сперматогенезу викликає значні морфологічні та морфометричні порушення в сперматогенному епітелії, що призводить до зниження продукції

сперматозоїдів та зменшення їхньої життєздатності. Результатом подібних змін у гонадах є погіршення фертильності самців, фатальне зменшення фертильності, кількості запліднених ними самиць, значне зростання рівня доїмплантаційної та загальної загибелі ембріонів.

Значне занепокоєння викликає той факт, що етамбутол має широке застосування в комбінованій терапії туберкульозу в чоловіків репродуктивного віку. У той самий час без проведення специфічних досліджень досить важко отримати відповідні клінічні дані. Тим більшу цінність мають отримані нами результати, які визначають пріоритетні напрями подальших експериментів. Вважаємо, що для визначення підходів до профілактики негативного впливу етамбутолу на чоловічі гонади необхідним є дослідження біохімічних та/або ендокринних механізмів його дії.

1. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis / C. Krausz // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2011. – V.25, №2. – P. 271–285.
2. Esteves S. C. Novel concepts in male infertility / S. C. Esteves, A. Agarwal // Int Braz J Urol. – 2011. – V. 37, № 1. – P. 5–15.
3. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience / S. E. Hofherr, A. E. Wictor, B. R. Kipp [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – V. 28, № 11. – P. 1091–1098.
4. Вплив комбінації протитуберкульозних засобів на рівень експресії мРНК ізоформ цитохрому Р-450 у сім'яниках щурів та стан їх сперматогенного епітелію / Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, А. В. Матвієнко, В. М. Коваленко // Одеський медичний журнал. – 2012. – № 4. – С. 11–14.
5. Shayakhmetova G. M. Damage of testicular cell macromolecules and reproductive capacity of male rats following co-administration of ethambutol, rifampicin, isoniazid and pyrazinamide / G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, V. M. Kovalenko // Interdiscip Toxicol. – 2012. – V. 5, № 1. – P. 9–14.
6. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER [Електронний ресурс]. – режим доступу: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
7. Jochi J. M. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics / J. M. Jochi // Lung India. – 2011. – V. 28, № 3. – P. 193–200.
8. Principles and Methods of Toxicology, 4th edition. / Ed. by A. Wallace Hayes, 2001. – 1887 p.
9. Current Protocols in Toxicology / Ed. by M. Maines, John Wiley & Sons, Inc. – 2005. – P. 2758.
10. Asole A. Effects of ethambutol on the seminal epithelium of the rat and chicken / A. Asole, R. Panu, G. Palmieri // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. – 1976. – V. 52, № 12. – P. 846–848.
11. Chedrese P. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. – Springer, 2009. – 361 p.

А. М. Шаяхметова

Влияние этамбутола на структурно-функциональные показатели гонад и фертильность крыс-самцов

В опытах на белых крысах-самцах показано, что введение этамбутола в терапевтической дозе приводило к морфологическим изменениям в сперматогенном эпителии, уменьшению продукции сперматозоидов (на 67 %) и их жизнеспособности (на 62 %). Нарушения сперматогенеза обуславливали снижение фертильности подопытных самцов на 58 % по сравнению с контролем. У самок, оплодотворенных подопытными самцами, в 2,6 раза снижался показатель плодовитости, а также

повышался уровень доимплантационной и общей смертности эмбрионов. Полученные результаты побуждают к дальнейшим исследованиям, направленным на определение биохимических и/или эндокринных механизмов влияния этамбутола на мужскую репродуктивную функцию, что в дальнейшем позволит обосновать подходы к профилактике его отрицательного влияния на мужские гонады, возможно сопутствующего противотуберкулёзной терапии.

Ключевые слова: этамбутол, фертильность, семенники

G. M. Shayakhmetova

Ethambutol action on structure and functional indices of gonads and male rats fertility

The necessity to minimize adverse effects of tuberculosis chemotherapy requires a comprehensive evaluation of the effects of anti-tuberculosis drugs on the organism. As previously we demonstrated the negative effect of first line anti-tuberculosis drugs co-administration on the rats' male reproductive capability, it was reasonable to investigate the effect of ethambutol on male gonads. The males rats (150–170 g) were divided into two groups: group I – ethambutol (155 mg/kg b.w./day during 60 days) suspended in 1% starch gel per os, group II (control) – received only starch gel in corresponding volumes. Following 46 days of ethambutol repeated administrations, the males from all groups were mated with intact females at the ratio 1 male : 1 female during 14 days. It was shown, that administration of ethambutol in therapeutic dose led to morphological changes in spermatogenic epithelium, decrease of spermatozooids production (by 62 %) and reduction of its vitality (by 67 %). In experimental males sperm resistance to rising concentration of KCl solution was declined by 40 %. Spermatogenesis disorders led to decrease of ethambutol-treated males' fertility by 58 % as compared with control. The index of fertility in females, which were mated with experimental males, was lower at 2.6 times, as well as pre-implantation and total embryos deaths were increased approximately by 42 %. There is a necessity to find out biochemical and/or endocrine mechanisms of ethambutol action on male reproductive function. Future research is needed to expand our understanding of these relationships. This will allow us to ground the approaches to the prevention of ethambutol negative effects on the male gonads, which may accompany anti-tuberculosis treatment.

Key words: ethambutol, fertility, testis

Надійшла: 12.11.2013 р.

Контактна особа: Шаяхметова Ганна Михайлівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник, відділ загальної токсикології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 67 949 45 30.
Електронна пошта: anna_shayakhmetova@yahoo.com

К. О. Шебалдова¹, Д. С. Кравець¹, В. Д. Лук'яничук¹,
І. Й. Сейфулліна², О. Е. Марцинко²

Порівняльна фармакокінетика ВІТАГЕРМ-3 у нормі та за умов гострої гіперкапнічної гіпоксії

¹ДЗ «Луганський державний медичний університет»

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Ключові слова: фармакокінетика,
ВІТАГЕРМ-3, гостра гіперкапнічна гіпоксія

Гостра гіпоксія в поєднанні з гіперкапнією є однією з форм кисеньдефіцитних станів, що відрізняються тяжким перебігом і нерідко закінчуються фатально. Гострі гіпоксично-гіперкапнічні стани виникають, як правило, при порушенні звичайного забезпечення киснем, коли в повітрі, що вдихається, уміст кисню зменшується, а концентрація CO₂ швидко збільшується. Такі екстремальні ситуації можливі при аваріях у глибоких вугільних шахтах, коли гірники опиняються в замкнутому просторі, на підводних човнах, у підземних приміщеннях закритого типу (командні пункти, герметичні сховища) тощо. Підтримка життєздатності за умов гострого гіпоксично-гіперкапнічного стану можлива, головним чином, за умов попереднього застосування антигіпоксантив, арсенал яких, на жаль, обмежений, а існуючі засоби свою ефективність реалізують не при всіх видах гіпоксії, мають низку побічних реакцій, що у відомому сенсі також обмежує їхнє застосування.

Тому пошук нових високоефективних та безпечних антигіпоксантив є актуальною задачею фармакології, що, власне, і було підґрунтям для наших досліджень.

Проведеними нами раніше дослідженнями встановлено [1], що за умов гіпоксичної гіпоксії з прогресуючою гіперкапнією, яку відтворювали на моделі гіпоксії замкнутого простору (ГЗП), найбільшу протекторну активність проявляє калій діетилентріамінпентаацетатогідроксогерманат, сполука з лабораторним шифром ВІТАГЕРМ-3.

Визначення та аналіз фармакокінетичних параметрів потенційного лікарського засобу є невід'ємною частиною його доклінічного дослідження, оскільки отримані при цьому дані дозволяють об'єктивно з'ясувати тропність потенційного лікарського засобу до різних органів і тканин, а також встановити терапевтично важливі показники абсорбції та елімінації, що врешті-решт у подальшому дозволить проводити максимально ефективну фармакотерапію та прогнозувати можливі її ускладнення.

Мета дослідження – порівняльне вивчення фармакокінетики нового антигіпоксанта ВІТАГЕРМ-3 у нормі та за умов ГЗП.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на 96 білих нелінійних щурах обох статей масою 180–200 г відповідно до методичних рекомендацій Державного фармакологічного Центру (ДФЦ) МОЗ України [2] у сертифікованій лабораторії кафедри фармакології Луганського державного медичного університету.

Тварин було розподілено на дві групи: щури без патології («Норма») і дослідні тварини (ГЗП). Тваринам обох груп ВІТАГЕРМ-3 вводили одноразово внутрішньоочеревинно в попередньо визначеній середньоефективній дозі (49 мг/кг).

Експериментальною моделлю екстремального стану, що вивчається, обрано патологічний процес, який формується у тварин за умов замкнутого простору. Моделювання гіпоксії з прогресуючою гіперкапнією здійснювали шляхом розміщення щурів в ізольованих гермооб'ємах (10 дм³), які перевертали до верху дном та поміщали в ємність з водою, щоб запобігти у такий спосіб попадання в них повітря. Експозиція складала 30 хв.

ВІТАГЕРМ-3 тваринам вводили за 36 хв до їхнього розміщення в гермооб'ємі.

Визначення вмісту германію в центральній камері кінетичної моделі розподілу (сироватка крові) проводили колориметричним методом [3] у динаміці через 1, 3, 6, 12 і 24 год після введення ВІТАГЕРМ-3.

У роботі досліджували низку фармакокінетичних параметрів, що характеризують різні етапи проходження ВІТАГЕРМ-3 в організмі щурів у «нормі» та після перенесеної ГЗП, а саме: абсорбцію (константа швидкості абсорбції, час досягнення максимальної концентрації, максимальна концентрація), розподілу з центральної камери в периферичні (період напіврозподілу, константи швидкості прямого та зворотного масопереносу, об'єм розподілу в центральній камері та площу під фармакокінетичною кривою), а також елімінацію (період напівелімінації, константа швидкості елімінації, загальний кліренс та середній час перебування сполуки в організмі).

Фармакокінетичні показники розраховували за двочастковою моделлю зі всмоктуванням за допомогою спеціально розробленої на кафедрі фармакології ЛугДМУ комп'ютерної програми [4].

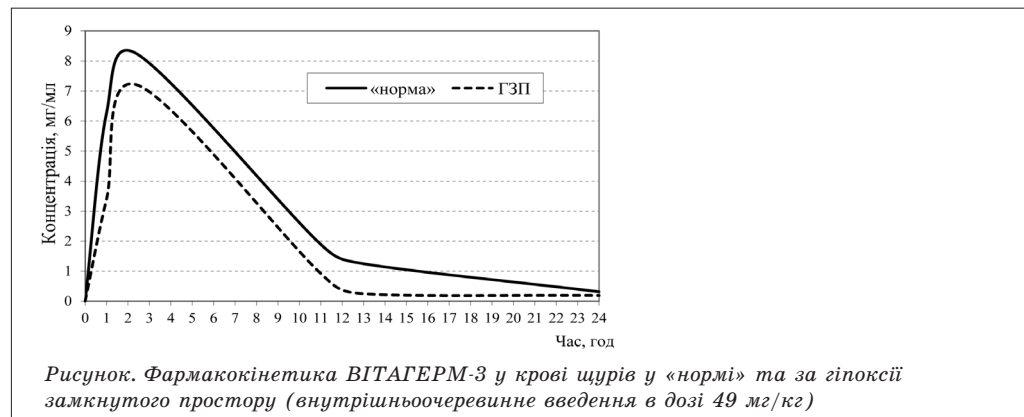
Результати та їх обговорення. На підставі отриманих даних побудовано фармакокінетичні криві, що представлено на рисунку, з якого видно, що в обох порівнювальних групах ВІТАГЕРМ-3 визначається в максимальних концентраціях у межах від 7,45 до 8,22 мг/л на відрізку часу, що становить відповідно 1,47 та 1,62 год.

Фармакокінетичні параметри, що характеризують процес абсорбції ВІТАГЕРМ-3 за умов експерименту, що представлені в таблиці 1, свідчать, що в тварин, яких не піддавали дії гіпоксії, тобто в «нормі», показник константи швидкості абсорбції на 27,2 % більший, ніж у щурів з гіпоксично-гіперкапнічним станом. Це, на нашу думку, може бути наслідком порушень при гострій гіперкапнічній гіпоксії енергозабезпечення транспортних механізмів, що відповідають за перенос молекул ВІТАГЕРМ-3 крізь мембрани клітин очередини.

Підґрунтям для таких міркувань є відомості, що за умов гіпоксії, а тим більше такої її гострої форми як ГЗП, має місце роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування. Це, певна річ, викликає дисбаланс у системі аденілових нуклеотидів, тобто призводить до зниження швидкості аеробного окиснення субстратів з одного боку, а, з іншого, – до порушення функціонування всіх АТФ-залежних ферментних комплексів, що беруть участь у мембранотранспортних механізмах.

Слід зауважити, що потенційний антигіпоксant ВІТАГЕРМ-3 є гідрофільною речовиною, а, отже, він спроможний проникати крізь клітинні та субклітинні мембрани шляхом саме активного транспорту, що, як відомо, є енергозалежним процесом. До цього варто додати, що ВІТАГЕРМ-3 відрізняється досить великою молекулярною масою та просторовою структурою.

Аналіз періоду напівабсорбції в обох порівнювальних групах свідчить, що різниця значень цього параметра є достовірною. Як видно з таблиці 1, час



Таблиця 1

**Фармакокінетичні параметри, що характеризують процес абсорбції
ВІТАГЕРМ-3 за умов його внутрішньоочеревинного введення
в дозі 49 мг/кг, n = 7**

Параметр	Позначення, розмірність	Група тварин		P
		«Норма»	ГЗП	
Константа швидкості абсорбції	$K_{01}, \text{год}^{-1}$	$1,87 \pm 0,12$	$1,47 \pm 0,10$	$< 0,05$
Період напівабсорбції	$t_{1/2a}, \text{год}$	$0,370 \pm 0,003$	$0,47 \pm 0,03$	$< 0,05$
Час досягнення максимальної концентрації	$t_{\max}, \text{год}$	$1,62 \pm 0,15$	$1,47 \pm 0,14$	$> 0,05$
Максимальна концентрація	$C_{\max}, \text{мг/л}$	$8,22 \pm 0,73$	$7,45 \pm 0,69$	$> 0,05$

Примітка. P – порівняно з «нормою». n – кількість тварин у групі.

напівабсорбції за умов гіпоксичного пошкодження більший ($P < 0,05$) порівняно з «нормою». Виявлені зміни K_{01} та $t_{1/2a}$, з нашої точки зору, можуть бути наслідком порушень функціонування мембранотранспортних систем під впливом низки первинних та вторинних продуктів ПОЛ, а також продуктів ендотоксикозу, що в надлишковій кількості продукуються за умов ГЗП, особливо в поєднанні із гіперкапнією.

Що стосується аналізу часу досягнення максимальної концентрації, то варто зазначити, що різниця між «нормою» та групою тварин з гіпоксією є недостовірною. Однак у здорових тварин цей показник дещо більший, ніж при ГЗП. Також не має достовірної різниці ($P > 0,05$) між величинами максимальних концентрацій в обох групах порівняння.

Наступним етапом дослідження фармакокінетики ВІТАГЕРМ-3 є вивчення його розподілу із центральної камери

до периферичних. Розраховані фармакокінетичні параметри представлені в таблиці 2.

Показано, що в групі тварин з моделлю гіпоксичного синдрому величина періоду напіврозподілу на 4,22 % менша, ніж у нормі, але ця різниця не є вірогідною ($P > 0,05$). Що ж стосується величини константи швидкості прямого масопереносу, то вплив гіпоксії на цей показник є також недостовірним ($P > 0,05$). Аналогічні дані отримані й при визначенні величини константи швидкості зворотного масопереносу в «нормі» та за умов патологічного стану.

Аналіз величин, що характеризують об'єм розподілу в центральній камері, також свідчить, що в обох групах цей параметр знаходиться на однаковому рівні ($P > 0,05$).

Цікаво було дослідити в порівняльному аспекті площу під фармакокінетичною кривою в «нормі» та при ГЗП.

Таблиця 2

**Фармакокінетичні параметри, що характеризують процес розподілу
ВІТАГЕРМ-3 з центральної камери в периферичні за умов його
внутрішньоочеревинного введення в дозі 49 мг/кг, n = 7**

Параметр	Позначення, розмірність	Група тварин		P
		«Норма»	ГЗП	
Період напіврозподілу	$t_{1/2\alpha}, \text{хв}$	$1,73 \pm 0,19$	$1,66 \pm 0,17$	$> 0,05$
Константа швидкості прямого масопереносу	$K_{12}, \text{хв}^{-1}$	$0,42 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,04$	$> 0,05$
Константа швидкості зворотного масопереносу	$K_{21}, \text{год}^{-1}$	$0,40 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,04$	$> 0,05$
Об'єм розподілу в центральній камері	$V_d, \text{л}$	$0,86 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,06$	$> 0,05$
Площа під фармакокінетичною кривою	$AUC, \text{мг} \cdot \text{год} \cdot \text{мл}^{-1}$	$326,87 \pm 30,73$	$332,31 \pm 31,24$	$> 0,05$

Примітка. Тут і в табл. 3: P – порівняно з «нормою».

Як видно із таблиці 2, цей параметр знаходиться у відповідності до вже проаналізованих показників, які характеризують процес розподілу ВІТАГЕРМ-3 із центральної камери до периферичних.

Таким чином, узагальнення отриманих результатів цього фрагмента досліджень дозволяє заключити, що ВІТАГЕРМ-3, незалежно від наявності в організмі гіпоксичних змін, розподіляється із центральної камери в периферичні приблизно однаково.

Порівняльний аналіз величин періоду напівелімінації показує, що в щурів з ГЗП цей показник на 23,30 % ($P < 0,05$) менше порівняно з «нормою» (табл. 3). Ці дані знаходять своє пояснення, якщо звернутися до раніше наведених результатів (табл. 1), згідно з якими на тлі гострої гіпоксичної гіпоксії в поєднанні з гіперкапнією має місце суттєве ($P < 0,05$) зниження K_{01} при одночасному збільшенні $t_{1/2, \alpha}$. Причиною цього можуть бути функціональні порушення основних органів, що відповідають за метаболічні (печінка) та екскреторні (нирки) процеси за умови їхнього гіпоксичного пошкодження.

Порівняльний аналіз константи швидкості елімінації, яка, як відомо, знаходиться в зворотно пропорційній залежності до періоду напівелімінації, показує, що величина K_{el} під впливом гіпоксичного чинника вірогідно ($P < 0,05$) збільшується (на 27,27 %) відносно «норми». Про це свідчать дані, наведені в таблиці 3. Трамбування цих даних, на нашу думку, не потребує спеціальних пояснень, оскільки зміни K_{el} підпорядковуються таким же чинникам впливу, як і $t_{1/2}$. Разом з тим, варто

зазначити, що, оскільки найбільша питома вага в екскреторних процесах будь-якого ксенобіотика, у тому числі й ВІТАГЕРМ-3, належить нирковій складовій, то стає зрозумілим, що за умов ГЗП, тобто на тлі різкого енергодефіциту, страждають енергозалежні процеси реабсорбції. У кінцевому підсумку це може впливати й на прискорення (відносно «норми») швидкості елімінації.

На особливу увагу заслуговує порівняльна оцінка такого важливого, з точки зору елімінаційних процесів, фармакокінетичного параметру, як загальний кліренс. Із таблиці 3 видно, що рівень Cl_T за умов експерименту в обох групах є практично незмінним ($P > 0,05$). Цей експериментально доведений факт можна пояснити одночасним зменшенням K_{01} та збільшенням K_{el} у тварин з ГЗП, що й призводить у кінцевому підсумку до деякої рівноваги цих процесів та нівелює будь-яку різницю показника Cl_T в обох групах.

І, зрештою, порівняльна оцінка середнього часу знаходження в організмі ВІТАГЕРМ-3 за умов експерименту чітко вказує на те (табл. 3), що на тлі гострого кисеньдефіцитного стану даний показник вірогідно ($P < 0,05$) зменшується порівняно з «нормою». Ці дані можна пояснити тим, що в групі гіпоксичних тварин має місце певне пригнічення процесів всмоктування ВІТАГЕРМ-3 та прискорення його елімінації, що призводить до зменшення MRT ВІТАГЕРМ-3 в організмі щурів із ГЗП.

Підсумовуючи результати визначення фармакокінетичного профілю елімінації ВІТАГЕРМ-3 у «нормі» та при ГЗП, вважаємо за потрібне підкреслити, що на фоні гіпоксичного пошко-

Таблиця 3

Фармакокінетичні параметри, що характеризують процес елімінації з центральної камери ВІТАГЕРМ-3 при його внутрішньочеревинному введенні в дозі 49 мг/кг, n = 7

Параметр	Позначення, розмірність	Група тварин		P
		«норма»	ГЗП	
Період напівелімінації	$t_{1/2}$, год	$8,24 \pm 0,65$	$6,32 \pm 0,51$	$< 0,05$
Константа швидкості елімінації	K_{el} , год ⁻¹	$0,08 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$< 0,05$
Загальний кліренс	Cl_T , мл/хв	$0,83 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,07$	$> 0,05$
Середній час перебування в організмі	MRT, год	$12,50 \pm 1,11$	$9,09 \pm 0,96$	$< 0,05$

дження організму суттєвим змінам піддаються такі параметри, як $t_{1/2}$ та K_{el} . Ці дані свідчать про беззаперечну необхідність враховувати їх при проведенні клінічних досліджень та в подальшому при наданні допомоги постраждалим від ГЗП на дошпитальному етапі. Безумовно, що корекція режиму дозування ВІТАГЕРМ-3 за умов невідкладної допомоги має бути в

суворій відповідності до стану постраждалого, тобто, величина дози ВІТАГЕРМ-3 має бути прямо пропорційною тяжкості гіпоксії.

Таким чином, на кінетику ВІТАГЕРМ-3 значний вплив має екстремальний кисеньдефіцитний стан, що розвивається за умов ГЗП. Цей факт експериментально доведено при дослідженні всіх етапів фармакокінетики ВІТАГЕРМ-3.

1. Порівняльні скринінгові дослідження в ряду координаційних сполук германію на моделі гіпоксії замкнутого простору / В. Д. Лук'ячук, І. Й. Сейфулліна, К. О. Шебалдова [та ін.] // Український журнал екстремальної медицини ім. Г. О. Можаєва. – 2013. – № 1. – С. 81–84.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / під ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2002. – 567 с.
3. Кресюн В. Й. Екстракційно-фотометричне визначення мікрокількостей германію у тканинах експериментальних тварин / Кресюн В. Й., Відавська А. Г., Шемонаєва К. Ф. // Одеський медичний журнал – 2000. – № 6 (62). – С. 7–11.
4. Кравець Д. С. Оптимизация методических приемов расчета параметров хемобиокинетики с помощью прикладных программ для ЭВМ / Кравець Д. С. // Український медичний альманах. – 2000. – Т. 1, № 2. – С. 90–91.

Е. А. Шебалдова, Д. С. Кравець, В. Д. Лук'ячук,

І. Й. Сейфулліна, Е. Э. Марцинко

Сравнительная фармакокинетика ВІТАГЕРМ-3 в норме и в условиях острой гиперкапнической гипоксии

На модели острой гипоксической гипоксии, развивающейся у крыс в замкнутом пространстве, в сравнительном аспекте исследованы основные показатели фармакокинетики потенциального антигипоксанта – ВІТАГЕРМ-3.

Установлено, что на фоне гипоксического повреждения организма существенным изменениям подвергаются такие параметры, как период полужизни и константа скорости элиминации, а именно: увеличивается величина $t_{1/2}$ и уменьшается значение K_{el} , что свидетельствует о необходимости учитывать эти изменения в последующем при оказании помощи пострадавшим от гипоксии замкнутого пространства на догоспитальном этапе.

Также показано, что на кинетику ВІТАГЕРМ-3 существенное влияние оказывает изучаемое экстремальное кислороддефицитное состояние. Этот факт экспериментально доказан при исследовании всех этапов фармакокинетики ВІТАГЕРМ-3 в обеих группах сравнения: всасывания, распределения и элиминации.

Ключевые слова: фармакокинетика, ВІТАГЕРМ-3, острая гиперкапническая гипоксия

K. O. Shebaldova, D. S. Kravets, V. D. Lukyanchuk, I. I. Seifullina, E. E. Martsinko Comparative pharmacokinetics VITAGERM-3 in the normas and in the conditions of acute hypercapnic hypoxia

Identification and analysis of pharmacokinetic parameters of the potential drug is an integral part of their pre-clinical studies. The data obtained allow objectively ascertain potential drug tropism to different organs and tissues, and to establish therapeutically important indicators of absorption and elimination, which, in turn, allow to select the most efficient drug therapy and predict its possible complications. Therefore, the aim of the study was to compare pharmacokinetics of the new antihypoxants VITAGERM-3 in health and under acute hypercapnic hypoxia. The main pharmacokinetic parameters of the potential antihypoxant – VITAGERM-3 were studied under the model of acute hypoxic hypoxia in confined space on rats. It has been found that in hypoxic condition the significant changes in parameters of half elimination period and elimination constant, namely: increasing the value of $t_{1/2}$ and decreases the value of K_{el} , were observed. The changes need to be taken into account in the provision of assistance to victims of hypoxia enclosed space in the prehospital stage after clinical researches. It was found also that the kinetics VITAGERM-3 significantly affected under extreme oxygen deficit condition. This fact is proved experimentally in the study of all phases of pharmacokinetics VITAGERM-3 in both groups of rats, namely on the stages of absorption, distribution and elimination.

Key words: pharmacokinetics, VITAGERM-3, acute hypercapnic hypoxia

Надійшла: 28.11.2013 р.

Контактна особа: Лук'ячук Віктор Дмитрович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, ДЗ «Луганський державний медичний університет», буд. 1, кв. 50-річчя Оборони Луганська, м. Луганськ, 91045. Тел.: +38 0 642 63 02 77.

Л. В. Яковлева¹, О. О. Єгорова², О. Ю. Кошова¹

Експериментальне обґрунтування корекції Елгацином гіпофункції сім'яників щурів

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²ДУ «Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського»,
м. Сімферополь

Ключові слова: поліфеноли, елагова кислота, антиоксидантна дія, сперматогенез, запалення, гіпофункція сім'яників

Одним з пріоритетних завдань сучасної геронтології є профілактика прискореного старіння та вікових патологій, яка спрямована на збільшення середньої тривалості життя, збереження активного довголіття людини [1]. Прискорене постаріння населення зумовлено виснаженням функціональних можливостей організму, незбалансованим харчуванням, обмеженням рухової активності, зростанням психоемоційної напруги внаслідок стресових навантажень, збільшенням темпу життя [2]. Зниження адаптивних можливостей організму, несприятлива екологія, повсякденний стрес, соціальні та економічні проблеми є чинниками, що призводять до раннього прояву збоїв генеративної функції та з віком посилюють дисфункції репродуктивної системи. У літніх чоловіків зустрічається більш висока частота порушень ерекції та захворювань передміхурової залози, виробляється менша кількість тестостерону, зменшена кількість рухливих сперматозоїдів, що негативно відображається на психоемоційному стані, суттєво погіршує якість життя [3].

Для поліпшення репродуктивного здоров'я чоловіків проводиться пошук засобів корекції порушень генеративної функції та дослідження сполук з новими механізмами гонадопротекторної дії. З метою активації сперматогенезу (залежно від ступеня виразності порушень) застосовується різноманітна терапія: вітаміни групи Е і С, полівітаміни, препарати цинку, засоби, що поліпшують регіональний кровообіг

(трентал, актовегін); гонадотропіни; антиестрогени; препарати тестостерону, біологічно активні добавки [4].

Останнім часом досить широко використовують препарати з рослинної сировини, що виявляють комплексну дію завдяки широкому спектру фармакологічних властивостей: протизапальну, антисептичну, імуностимулюючу, безпечну, антиоксидантну тощо [5]. До таких засобів відносяться таблетки «Елгацин» – оригінальний препарат, діючими компонентами якого є елаготаніни – дубильні речовини, здатні до гідролізу. Субстанція елгацину отримана із суплідь (шишок) вільхи клейкої та сірої (*Alnus glutinosa* L., *Alnus cinerea* L.) род. Березових (*Betulaceae*).

У Центральній науково-дослідній лабораторії НФаУ (ЦНДЛ НФаУ) проведено повний комплекс доклінічних досліджень субстанції та таблеток «Елгацин» як кардіопротекторного засобу. На даний час таблетки «Елгацин» проходять другу фазу клінічних досліджень як кардіопротекторний засіб метаболічної дії. У попередніх дослідженнях, проведених у ЦНДЛ НФаУ, на щурах різного віку встановлено, що Елгацин виявляє виразну геропротекторну дію: попереджає розвиток вікових патологій печінки, серця, вуглеводного та ліпідного обмінів [6, 7].

Мета дослідження – визначення ефективності таблеток «Елгацин» щодо корекції гіпофункції сім'яників щурів, викликаной серотоніну гідрохлоридом.

Матеріали та методи. Досліди проводили на 28 статевозрілих неінбредних білих самцях щурів масою 280–310 г, отриманих з віварію ЦНДЛ НФаУ. Під час експерименту тварини знаходи-

лися за стандартних умов при 18–24 °С, вологості 50–60 %, природному світловому режимі «день-ніч», на збалансованому харчовому раціоні та вільному доступі до води [8]. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з санітарно-гігієнічними нормами та принципами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Strasburg, 1986) відповідно до норм GLP [9].

Тварини були розподілені на групи по 7 щурів у кожній: 1 група – інтактні тварини, яких не піддавали будь-якому впливу; 2 група – тварини контрольної патології (КП), тобто: щури, у яких моделювали ураження сім'яників; 3 і 4 групи – тварини, яким профілактично за 2 доби до початку досліду та далі одночасно з серотоніном протягом 14 діб внутрішньошлунково вводили таблетки «Елгацин» (виготовлені на ЗАТ НВЦ «Борщаківський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) у дозі 12 мг/кг або препарат порівняння, таблетки «Спеман®» (виробництва Хімалая Драг Компані, Індія) у дозі 90 мг/кг. Доза Спеману® визначена за допомогою коефіцієнта перерахунку доз за площею тіла з дози для людини [10]. Спеман® – це комбінований рослинний препарат, який широко застосовується в терапії захворювань передміхурової залози та порушень сперматогенезу. Дія Спеману® обумовлена властивостями компонентів, що входять до його складу, та виявляється у стимуляції сперматогенезу: збільшенні кількості сперматозоїдів, покращанні їхньої морфологічної структури, підвищенні рухливості сперматозоїдів та нормалізації в'язкості сперми, засіб має антисептичні, протизапальні, протиспазматичні та сечогінні властивості.

Гіпофункцію сім'яників моделювали підшкірним введенням щурам серотоніну гідрохлориду (виробництва Sigma) у дозі 10 мг/кг щоденно протягом 14 діб [11, 12]. На 15 добу після останнього введення серотоніну проводили евтаназію тварин декапітацією під ефірним наркозом. Збирали зразки крові для біохімічного дослідження, вилучали сім'яники, їхні придатки та передміхурову залозу (ПЗ), визначали масу органів

з подальшим розрахунком їхньої відносної маси (г/100 г маси тіла тварини).

У суспензії сперматозоїдів, вилучених з придатків сім'яників, оцінювали загальноприйняті показники морфологічного стану гамет [13, 14].

Стан анти/прооксидантного статусу щурів оцінювали за активністю в сироватці крові каталази [15], церулоплазмину за методом Равіна [16], рівнем відновленого глутатіону (ВГ) за методом Beutler E.D. et al [17], речовин, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-Р) [18]. Для оцінки функціонального стану передміхурової залози в сироватці крові визначали активність лужної фосфатази (ЛФ) і кислій фосфатази (КФ) за методом A. Bodansky [15].

Ступінь андрогенної насиченості простати щурів визначали за фосфатазним індексом, який розраховували за формулою: $\Phi I = K\Phi / L\Phi$ [19] та за типом кристалізації секрету передміхурової залози. Для цього робили відбиток її вентральної частки на предметному склі за методом [20]. При нормальній андрогенній насиченості на склі з'являється малюнок «листя папороті». Порушення кристалізації свідчить про зниження андрогенної насиченості [20].

Отримані експериментальні дані обробляли за допомогою пакета статистичних програм «Statistica, v.6,0». Для отримання статистичних висновків застосовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA (або критерій Крускала-Уоліса – для непараметричних даних), критерії Ньюмана-Кейлса або Мана-Уїтні [21]. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Згідно з отриманими даними, введення серотоніну гідрохлориду щурам викликає порушення функціонального стану сперматозоїдів. У тварин з групи контрольної патології спостерігали суттєве зменшення кількості спермій, їх рухливості, часу рухливості, зростання кількості патологічно змінених форм. Так, при порівнянні з показниками інтактних щурів, концентрація сперматозоїдів знижувалася в 7,3 разу, тривалість руху сперматозоїдів – у 2,3 разу, відносна кількість патологічних форм підвищувалася в 1,3 разу (табл. 1).

Таблиця 1

Показники функціонального стану сперматозоїдів за умов гіпофункції сім'яників щурів та впливу таблеток «Елгацин» та «Спеман®», n = 7

Показник	Експериментальні групи			
	Інтактний контроль	Конт- рольна патологія	Таблетки «Елгацин», 12 мг/кг	Таблетки «Спеман®», 90 мг/кг
Концентрація сперматозоїдів, млн/мл (M ± m)	41,71 ± 3,10	5,71 ± 1,00*	22,67 ± 2,30*/**	25,00 ± 3,30 */**
Відносна кількість нерухомих сперматозоїдів, % (Me (Q25; Q75))	74,2 (70; 80)	100,0 (88; 100) *	77,0 (70; 82) **	72,8 (69; 80)**
Відносна кількість патологічних форм, % (Me (Q25; Q75))	10 (8; 12)	15 (12; 21)*	8 (4; 10)**	7,5 (6; 11)**
Тривалість руху, хв (M ± m)	403 ± 11	179 ± 29*	372 ± 33**	360 ± 32**
Осмотична резистентність сперматозоїдів, % NaCl (M ± m)	3,1 ± 0,2	2,30 ± 0,04*	3,0 ± 0,2*/**/**	2,5 ± 0,1*/ **
Кислотна резистентність, рН (M ± m)	4,4 ± 0,4	7,1 ± 0,2*	4,7 ± 0,5**	5,1 ± 0,7**

Примітка. n – кількість тварин у групі; *відмінності статистично значущі щодо групи інтактного контролю, p < 0,05;

відмінності статистично значущі щодо групи контрольної патології, p < 0,05; *відмінності статистично значущі щодо групи тварин, яким вводили таблетки Спеману, p < 0,05.

За умов даної патології в крові щурів також спостерігали підвищення активності ЛФ у 2,8 разу, зниження активності кислої простатичної фосфатази – у 1,9 разу та підвищення ТБК-Р у 1,4

разу порівняно з групою інтактних тварин (табл. 2). Отримані дані свідчать про розвиток запалення в простаті, яке супроводжується посиленням процесів вільно-радикального окиснен-

Таблиця 2

Біохімічні показники у сироватці крові щурів за умов гіпофункції сім'яників та впливу таблеток «Елгацин» та «Спеман®», M ± m, n = 7

Показник	Експериментальні групи			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Таблетки «Елгацин», 12 мг/кг	Таблетки «Спеман®», 90 мг/кг
Активність лужної фосфатази, ммоль/л·год	3,48 ± 0,42	9,86 ± 0,89*	4,59 ± 0,59**	4,81 ± 0,41**
Активність кислої фосфатази, ммоль/л·год	0,83 ± 0,09	0,44 ± 0,08*	0,70 ± 0,11	0,50 ± 0,05*
Фосфатазний індекс (КФ/ЛФ)	0,26 ± 0,05	0,05 ± 0,01 *	0,17 ± 0,03 */**	0,12 ± 0,01 */**
Уміст ТБК-Р, ммоль/л	0,64 ± 0,09	0,90 ± 0,10*	0,59 ± 0,06**	0,64 ± 0,04**
Уміст Церулоплазміну, г/л	0,28 ± 0,01	0,54 ± 0,02*	0,52 ± 0,02*	0,47 ± 0,04*
Уміст GSH, ммоль/л	4,38 ± 0,21	6,35 ± 0,34*	5,52 ± 0,29 */**/**	6,75 ± 0,21*
Активність каталази, мкат/л	2,32 ± 0,86	5,25 ± 0,70	3,91 ± 0,59	5,40 ± 1,11

Примітка.*Відмінності статистично значущі щодо групи інтактного контролю, p < 0,05; **відмінності статистично значущі щодо групи контрольної патології, p < 0,05; n – кількість тварин у групі.

ня. Це узгоджується з даними інших авторів, які повідомляють про активацію процесів ПОЛ при серотоніновому пошкодженні сім'яників щурів [11, 22]. У відповідь на збільшення рівня продуктів ПОЛ підвищувалася активність антиоксидантного захисту: у крові тварин з групи контрольної патології спостерігали підвищення вмісту відновленого глутатіону, церулоплазміну та каталази. Зміни всіх досліджуваних показників, крім активності каталази, були достовірно значущими порівняно з інтактним контролем.

Оскільки вентральна доля передміхурової залози щурів є андрогензалежним органом, відбиток її секрету дозволяє оцінити рівень андрогенів у тварин. За умов серотонінової патології кристалізація секрету ПЗ була майже відсутня, переважала аморфна структура (рисунки В, С), що свідчить про зниження андрогенної насиченості органу. Іншим показником, який опосередковано характеризує ступінь насиченості андрогенами є фосфатазний індекс (ФІ), зниження якого є маркером запальних процесів не тільки в сім'яниках, а й у передміхуровій залозі (ФІ < 0,1). У нашому досліді ФІ у групі контрольної патології достовірно знижувався майже в 2 рази порівняно з показниками інтактних тварин (табл. 2).

Наслідком патологічних змін функціонального стану органів статеві сис-

теми було зниження відносної маси сім'яників, епідидимісів та простати, яке мало виразну тенденцію до достовірного порівняно зі значеннями інтактних тварин (табл. 3).

Застосування Елгацину одночасно з ін'єкціями серотоніну гідрохлориду чинило захисну дію. Спостерігали відновлення функціональної активності сперматозоїдів: більшість з досліджуваних показників спермограми, крім концентрації сперматозоїдів, дорівнювала значенням показників інтактних тварин. Показник концентрації сперматозоїдів хоча не досягав значень фізіологічної норми, був достовірно вищим ніж у тварин з модельною патологією (табл. 1). Також реєстрували майже повне відновлення андрогенної насиченості організму тварин, на що вказувала нормалізація кристалізації секрету ПЗ (рисунки D, E, табл. 2) та зменшення проявів запалення: у сироватці крові реєстрували зниження активності ЛФ та підвищення – КФ (табл. 2).

Зниження процесів перекисного окиснення ліпідів (табл. 2) та відновлення показників відносної маси органів до рівня інтактних тварин під дією Елгацину свідчили про поліпшення трофічних процесів в організмі тварин (табл. 3).

Препарат порівняння, таблетки «Спеман®», чинив подібну до Елгацину дію: показники спермограми, крім концен-

Таблиця 3

Макрометричні показники органів статеві системи щурів за умов гіпофункції сім'яників та впливу таблеток «Елгацин» та «Спеман®», $M \pm m$, $n = 7$

Показник		Експериментальні групи			
		Інтактний контроль	Контрольна патологія	Таблетки «Елгацин», 12 мг/кг	Таблетки «Спеман®», 90 мг/кг
Відносна маса сім'яників, г/100г	правий	0,561 ± 0,028	0,481 ± 0,031	0,478 ± 0,034	0,500±0,045
	лівий	0,563 ± 0,029	0,459 ± 0,012 $p_{\text{ік}} = 0,06$	0,452 ± 0,039 $p_{\text{ік}} = 0,08$	0,481±0,039 $p_{\text{ік}} = 0,07$
Відносна маса епідидимісів, г/100г	правий	0,068 ± 0,005	0,071 ± 0,011	0,049 ± 0,002	0,058±0,004
	лівий	0,071 ± 0,006	0,060 ± 0,006	0,051 ± 0,005 $p_{\text{ік}} = 0,06$	0,050±0,004 $p_{\text{ік}} = 0,09$
Відносна маса передміхурової залози, г/100г		0,157 ± 0,004	0,124 ± 0,015 $p_{\text{ік}} = 0,08$	0,186 ± 0,011 **	0,203±0,022 **

Примітки. $P_{\text{ік}}$ – відмінності статистично значущі щодо інтактного контролю при $0,05 < p < 0,1$;

**відмінності статистично значущі щодо групи контрольної патології, $p < 0,05$;

n – кількість тварин у групі.

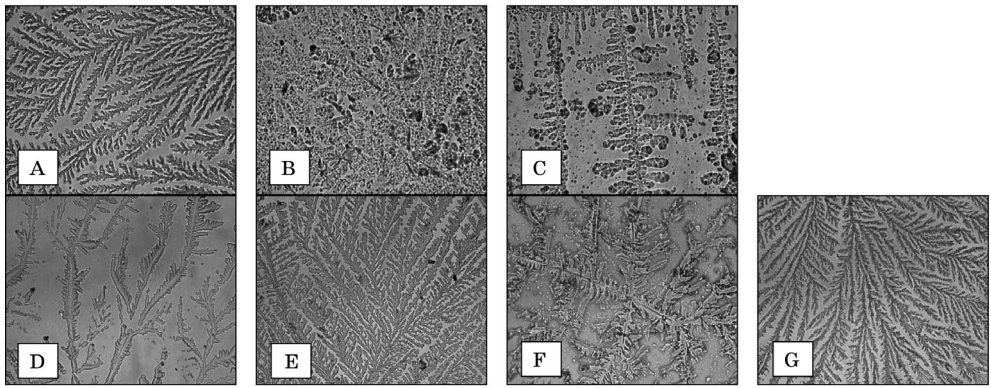


Рисунок. Кристалізація секрету передміхурової залози щурів за умов гіпофункції сім'яників, викликаній серотоніном, та впливу таблеток «Елгацин» та «Спеман®»: (А)– група інтактного контролю (типовий феномен «листя папороті»: кристали добре виразні, багато поперечних розгалужень, бокове гілля розходить від стебел під кутом не більше 15–35°); (В, С) – група контрольної патології (переважає аморфна структура, але присутні окремі кристали у вигляді безформних та потовщених стебел, листя папороті практично відсутнє); (D, E) – група тварин, яким вводили таблетки «Елгацин»; (F, G) – група тварин, яким вводили таблетки «Спеман®»; E, G – практично норма: листя папороті добре виражене, кристали дещо потоншені, простежується поодинокі деформація кристалів чи частини кристалів, D, F – порушення кристалізації: виразне витончення гілля кристалів, відсутність поперечних відгалужень, бокове гілля розходить від основного стебла під кутом від 45° до 90°.

трації сперматозоїдів та їхньої осмотичної резистентності, наближалися до значень інтактних тварин (табл. 1), знижувалася активність ЛФ, що вказує на зменшення запалення в передміхуровій залозі тварин (табл. 2). Відновлювалася андрогенна активність органу – спостерігали нормальну кристалізацію секрету простати (рисунок F, G), ФІ достовірно підвищувався порівняно з аналогічним показником у групі тварин з контрольною патологією, але залишався достовірно нижчим за значення інтактного контролю (табл. 2). Відносна маса передміхурової залози підвищувалася до значень інтактних тварин (табл. 3), проте показники відносної маси сім'яників та епідидимісів залишалися на рівні контрольної патології. Під дією Спеману® реєстрували зменшення інтенсивності утворення продуктів ПОЛ – рівень ТБК-Р був достовірно нижчим за значення контрольної патології, але цей процес відбувався на фоні підвищеної активності антиоксидантої системи: рівні церулоплазміну, відновленого глутатіону та активності каталази залишалися достовірно підвищеними порівняно з показниками інтактного контролю (табл. 2), що вказує на певну напругу антиоксидантної системи.

Уведення серотоніну гідрохлориду щурам протягом 14 діб викликає розвиток запалення, посилення процесів перекисного окиснення ліпідів і, як наслідок, активацію антиоксидантного захисту. У результаті це призводить до порушення функціональної активності як сперматозоїдів, так і простати, на що вказує зниження активності кислої фосфатази, порушення кристалізації секрету та зниження фосфатазного індексу. Відомо, що активність КФ тісно корелює з вмістом тестостерону в організмі [11]. Зафіксовані зміни рівня КФ свідчать, що при даній патології знижується андрогенна активність передміхурової залози та сім'яників щурів. За даними літератури застосування серотоніну гідрохлориду викликає вазоконстрикцію кровоносних судин сім'яників та епідидимісів, внаслідок чого тимчасово порушується кровопостачання в статевих органах щурів, що призводить до розвитку гіпоксії, активації процесів ПОЛ і в кінцевому рахунку – порушення їхньої трофіки [11, 21, 23], що в нашому досліді відображалось зниженням відносної маси не тільки сім'яників та епідидимісів, а також і ПЗ. Численними дослідженнями доведено, що яєчка

є дуже вразливими до вільно-радикального пошкодження, навіть незважаючи на достатньо складну систему антиоксидантного захисту [23–24]. Показано, що погіршення трофіки, у першу чергу, віддзеркалюється на клітинах Сертолї – у них на мікропрепаратах сім'яників щурів відсутні ліпіди, які за умов нормального функціонування органу є морфологічною ознакою функціональної активності цих клітин [25, 26]. Клітини Сертолї виконують функції, які забезпечують нормальний розвиток сперматогенних клітин – координують процес сперматогенезу, підтримують розвиток певної кількості гермінативних клітин [26]. Під впливом фолікулостимулюючого гормона суттєво зменшують синтезують андроген-зв'язуючий білок, а також секретують інгібін, активін і фолістатин. Наслідком зниження функціональної активності суттєво зменшують зростання сперматогенного епітелію, поява окремих дистрофічно змінених статевих клітин та затримка другого поділу визрівання [11, 26].

оксидантними властивостями, які добре досліджені раніше. В основі механізму дії Елгацину лежить виражена пряма антиоксидантна активність, що доведено в досліджах *in vitro* на моделях ферментативного та аскорбатзалежного ПОЛ мікросом із печінки щурів.

1. Hayflick L. Nature. The future of ageing / Hayflick L. – 2000. – V. 9, 408 (6809). – P. 267–9.
2. Anisimov V. N. Molecular and physiological mechanisms of aging / Anisimov V. N.: 2 V.. – 2nd ed. – St. Petersburg: Publishing house Nauka, 2008. – V. 2. – 434 p.
3. Анисимов В. Н. Средства профилактики ускоренного старения (геропротекторы) / Анисимов В. Н. // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. – С. 55–75.
4. Калинин С. Ю. Практическая андрология / С. Ю. Калинин, И. А. Тюзиков. – М.: Практ. медицина, 2009. – 399 с.
5. Фитотерапия в комплексном лечении заболеваний внутренних органов / [Крылов А. А., Марченко В. А., Максютин Н. П., Мамчур Ф. И.]. – К.: Здоров'я, 1991. – 240 с.
6. Яковлева Л. В. Вивчення впливу елгацину на морфоструктуру міокарда здорових шурів різного віку / Яковлева Л. В., Карбушева І. В., Лар'яновська Ю. Б. // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 36–41.

7. Яковлева Л. В. Дослідження впливу елгацину на міокард щурів різного віку / Яковлева Л. В., Карбушева І. В. // Фармацевтичний журнал. – 2004. – № 4 – С. 93–98.
8. Западнюк М. П. Лабораторные животные. Использование в эксперименте / М. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – К.: Высшая школа, 1983. – 878 с.
9. Директива Совета ЕС о сближении законов, постановлений и администрирование положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС) / 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.
10. Уланова И. П. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании: Под. ред. А. А. Летавета и И. В. Саноцкого / И. П. Уланова, К. К. Сидоров, А. И. Халепо. – Л.: Медицина, 1968. – Вып. 10. – С. 18–25.
11. Корекція порушень генеративної функції сім'яників глюкозаміна гідрохлоридом в експерименті / Зайченко Г. В., Бречка Н. М., Коренева Є. М. [та ін.] // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – № 1. – С. 65–71.
12. Csaba Z. Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis / Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. // J. Neuroendocrinol. – 1998. – V. 10, № 5. – P. 371–6.
13. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин / Бариляк І. Р., Неумержицька Л. В., Бишовець Т. Ф., Даниленко В. С. // Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації): За редакцією О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 139–152.
14. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / [Долгов В. В., Луговская С. А., Фанченко Н. Д., Миронова И. И.]. – М.–Тверь: ООО Издательство «Триада», 2006. – 145 с.
15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988, № 1. – С. 16–19.
16. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / Камышников В. С.: В 2 т. Т.1. – Мн.: Беларусь, 2002. – 495 с.
17. Beutler E. Improved method for the determination of blood glutathione / Beutler E., Duron O., Kelly B. M. // J. Lab clin med. – 1963. – V. 61, № 5. – P. 882–888.
18. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. // Методические рекомендации. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.
19. Юнда И. Ф. Простатиты / И. Ф. Юнда. – К.: Здоров'я, 1987. – 192 с.
20. Вартапетов Б. А. Предстательная железа и возрастные нарушения половой деятельности / Б. А. Вартапетов, А. Н. Демченко. – К.: Здоров'я, 1975. – 214 с.
21. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / А. А. Халафян. – М.: ООО «Бином–Пресс», 2007. – 512 с.
22. Hedger M. P. Acute and short-term actions of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat / Hedger M. P., Khatib S., Gonzales G. // Reprod. Fertil. Dev. – 1995. – V. 7, № 5. – P. 1101–1109.
23. Korman M. Effects of Serotonin and Angiotensin on Testicular Blood Vessels in the Rat / Korman M. // Angiologica. – 1970. – V. 7 – P. 291–295.
24. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility / Lanzafame F. M., La Vignera S., Vicari E., Calogero A. E. // Reproductive BioMedicine Online. – 2009. – Supplement 2, V. 19, Issue S2. – P.638–59.
25. Gharagozloo P. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy / Gharagozloo P., Aitken R. J. // Hum. Reprod. – 2011. – V. 26, № 7. – P. 1628–1640.
26. Бутенко І. Г. Корекція препаратами «Йохімбе-генез» і «Йохімбе-гармонія» порушень сперматогенезу у щурів, викликаних серотоніном / Бутенко І. Г., Лар'яновська Ю. Б. // Експериментальна та клінічна медицина. – 2000. – № 3. – С. 18–20.
27. Сахарова Т. С. Експериментальне дослідження впливу рослинних препаратів поліфенольного складу на функціонування антипероксидної ферментативної системи печінки / Т. С. Сахарова, Ю. В. Нікітченко, В. М. Дзюба // Медична хімія. – 2003. – Т. 5, № 2. – С. 52–55.
28. Яковлева Л. В. Експериментальне вивчення модулювального впливу елаготаніновмісних препаратів на активність прооксидних ферментів / Л. В. Яковлева, Є. М. Горбань, Т. С. Сахарова // Медична хімія. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 45–48.
29. Яковлева Л. В. Порівняльне дослідження впливу препаратів на основі рослинних поліфенолів на активність деяких глутатіонзалежних ферментів / Л. В. Яковлева, Т. С. Сахарова // Український біохімічний журнал. – 2002. – Т. 74, № 4а (додаток). – С. 93–94.
30. Нардід О. А. Дослідження впливу елаготаніновмісних препаратів на структурно-динамічний стан плазматичної мембрани еритроцитів / О. А. Нардід, Л. В. Цимбал, Т. С. Сахарова // Фізіологічно активні речовини. – 2002. – № 1 (33). – С. 81–83.

Экспериментальное обоснование коррекции Элгацином гипофункции семенников крыс

Статья посвящена исследованию защитного действия нового оригинального препарата антиоксидантного действия – таблеток «Элгацин» на модели гипофункции семенников крыс, вызванной серотином (подкожно в дозе 10 мг/кг ежедневно в течение 14 дней). В работе использовали 4 группы крыс: интактные животные, животные с модельной патологией, животные, которым профилактически за 2 суток до начала исследования и одновременно с серотином вводили таблетки «Элгацин» в дозе 12 мг/кг или препарат сравнения, таблетки «Спеман®» в дозе 90 мг/кг. Определяли относительную массу половых органов (г/100 г массы тела животного). В суспензии сперматозоидов, полученной из эпидидимиса, оценивали показатели спермограммы. В сыворотке крови исследовали содержание щелочной и кислой фосфатаз, показатели перекисления липидов и антиоксидантной системы. По отпечаткам секрета предстательной железы и соотношению показателей кислой фосфатазы к щелочной определяли степень андрогенной насыщенности органа. Установлено, что Элгацин оказывает защитное действие при функциональных нарушениях семенников, эпидидимиса и простаты: снижает выраженность воспаления и нормализует баланс в системе ПОЛ/АОС, в результате чего восстанавливается андрогенная насыщенность предстательной железы крыс и функциональная активность сперматозоидов.

Ключевые слова: полифенолы, эллаговая кислота, сперматогенез, воспаление, гипофункция семенников

L. Yakovleva, E. Egorova, E. Koshevaya

Experimental verification of testicular hypofunction correction by Elgacin in rats

In the present study we investigated the protective effect of a new original tableted antioxidant drug Elgacin in rats with testicular hypofunction induced by serotonin. Elgacin tablets – is an original drug containing ellagitannins, hydrolyzable tannins, as the active components. An elgacin substance is extracted from the inflorescences of black and grey alders (*Alnus glutinosa* L., *Alnus cinerea* L.). Serotonin was injected subcutaneously at a dose of 10 mg/kg daily during 14 days. There were 4 experimental groups in this study. The first group included control intact animals, the second – represented animals with serotonin-induced testicular hypofunction, two others were rats with serotonin-induced testicular hypofunction but treated either with Elgacin, or the reference drug Speman. In both cases treatment was started 2 days before the serotonin administration and continued till the end of experiment. Elgacin was administered at a dose of 12 mg/kg daily while the dose for the reference drug Speman was 90 mg/kg. To evaluate the efficacy of Elgacin treatment we measured testis and prostate relative weights, studied spermogram and performed diverse blood tests. Specifically the levels of alkaline and acid phosphatases, catalase, reduced glutathione and ceruloplasmin were measured in serum. The androgenic status of animals was calculated using abovementioned factors. Elgacin administration showed a protection effect on a model of serotonin-induced testicular hypofunction in rats. We observed a restored functional activity of sperm cells. The spermograms of animals treated with elgacin were similar to intact animals, with the exception of the total motile sperm cells number, which was decreased. The activity of a reference drug Speman tablets was comparable to Elgacin. We showed that Elgacin administration protect possesses the ability to protect testis and prostate functions. Pretreatment with Elgacin decreased inflammatory reactions in reproductive tract, inhibited reactive oxygen species production and lipid peroxidation, restored functional activity of sperms cells and normalized the androgenic status of animals.

Key words: polyphenols, ellagic acid, antioxidant effect, spermatogenesis, inflammation, testicular hypofunction

Надійшла: 05.11.2013 р.

Контактна особа: Егорова О. О., асистент, кафедра клінічної фармакології та фармакотерапії, ДУ «Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського», буд. 5/7, вул. Леніна, м. Сімферополь, 95000. Тел.: + 38 0 50 572 31 63. Електронна пошта: elena212007@rambler.ru

I. V. Kizub, K. I. Klymenko, A. I. Soloviev

Endothelium-dependent sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction can be mediated by signaling via myoendothelial gap junctions

SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kiev

Key words: hypoxia, hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary artery, gap junctions, 18 β -glycyrrhetic acid

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is the local process that optimizes pulmonary ventilation/perfusion matching in response to alveolar hypoxia diverting blood away from poorly ventilated regions of the lung [1]. In pathological conditions associated with global hypoxia however, HPV causes a detrimental increase in pulmonary artery pressure leading to increase of the load on the right heart [1]. However, despite many years of extensive researches, the precise mechanisms underlying HPV remain unresolved [1].

In isolated intrapulmonary arteries (IPA), contractile response to acute hypoxia typically is biphasic, characterized by a rapid transient vasoconstriction (phase 1) that is followed by a slowly developing sustained contraction (phase 2) [1-3]. The first phase of HPV is associated with a transient elevation in intracellular Ca^{2+} following Ca^{2+} release from ryanodine-sensitive stores, capacitative or store operated Ca^{2+} entry (SOCE), and voltage-dependent Ca^{2+} channels [1, 4, 5], whereas the phase 2 is associated with SOCE and RhoA/Rho-kinase (ROCK) dependent Ca^{2+} sensitization pathways [1, 6, 7]. Furthermore, there are good evidence that phase 2 of HPV also has yet nonidentified endothelium and glycolysis dependency [3, 7, 8].

There is growing evidence that direct communications within and between endothelial cells (EC) and smooth muscle cells (SMC) through gap junctions (GJ) is an important modulator of vascular tone and essential in the control and coordina-

tion of normal vascular function [9]. The vascular GJ are composed of intercellular channels clusters that directly connect the cytoplasm of adjacent cells, allowing the direct passage of electrical current and small signaling molecules between adjacent cells [11]. In vascular tissues GJ consist of four proteins called connexins (Cx, namely Cx37, Cx40, Cx43 and Cx45) forming single-membrane channels, or connexons, which align with their counterparts in adjacent cell membranes to form a complete intercellular channel [11]. In wall of small resistance arteries the endothelium is coupled to the inner layer of SMC by myoendothelial gap junctions (MEGJ) that form at the end of thin cytoplasmic projections from the EC [9, 11].

The electrical and biochemical properties of gap junction channels are regulated by phosphorylation and dephosphorylation of connexins, Ca^{2+} concentration and on both transcriptional and translational levels leading to modification of gap junctional activity [9]. In the context of our study it is also important to note that connexins phosphorylation is highly sensitive to glucose concentration through the activation of a protein kinase C (PKC) dependent signaling pathway [12, 13].

The aim of the present study was to test the hypothesis whether signalling via GJ may contribute to development of the endothelium-dependent sustained phase of HPV.

Materials and Methods. Adult male Wistar rats (250–275 g) were killed by cervical dislocation in accordance with Schedule 1 as prescribed and approved by the UK Home Office and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and

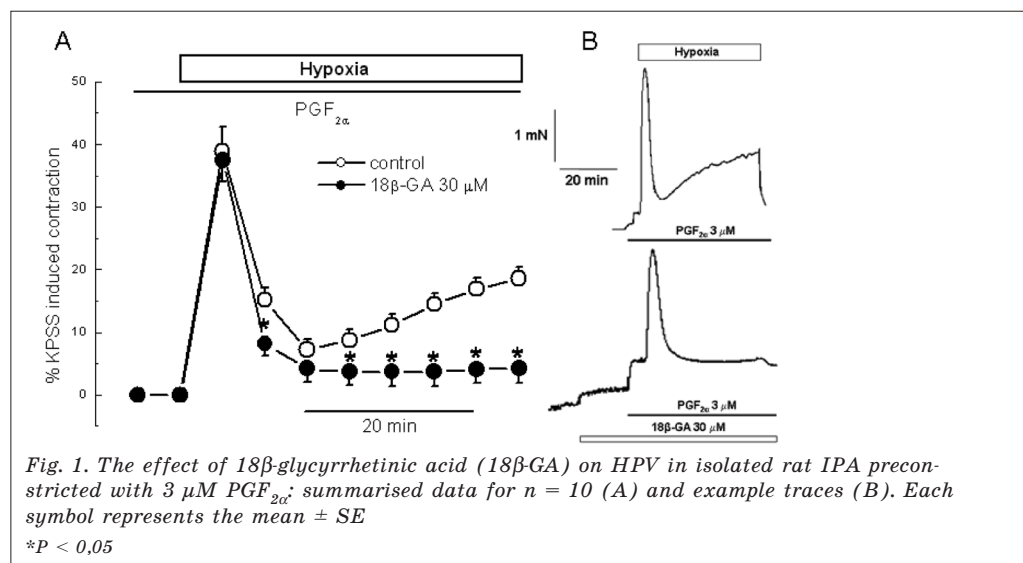
Other Scientific Purposes. The heart and lungs were rapidly removed and placed into cold Krebs physiological saline solution (PSS; in mM: 118 NaCl, 24 NaHCO₃, 1 MgSO₄, 0.44 NaH₂PO₄, 4 KCl, 5.5 glucose, and 1.8 CaCl₂). Small IPA (150–400 μ m in diameter) were dissected free and cleaned of connective and adipose tissues, then mounted on a Mulvany-Halpern wire myograph (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark), and bathed in PSS gassed with 5 % CO₂ and balance air (pH 7.4) at 37 °C. Vessels were stretched to a tension equivalent to 30 mmHg, which is close to the physiological pulmonary artery blood transmural pressure, and stimulated then by repeated 2-min exposures to 80 mM K⁺ containing PSS (KPSS, in mM: 38 NaCl, 24 NaHCO₃, 1 MgSO₄, 0.44 NaH₂PO₄, 80 KCl, 5.5 glucose, and 1.8 CaCl₂) until the resulting contraction reached a stable level.

Before inducing of HPV arteries were precontracted with prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α} , typically 3–5 μ M). Arteries were then exposed to a solution gassed with hypoxic gas mixture (5% CO₂, balance N₂) for 40 min. Vessels were allowed to recover in PSS under normoxic conditions for 1 h between exposures to hypoxia. Drugs were added to the solution 15 min before the imposition of hypoxia. Three HPV responses were elicited in each artery and only the third HPV was preceded by pre-incubation

with drugs. Oxygen tension (PO₂) in the chamber was monitored by a dissolved oxygen meter (Diamond General oxygen electrode, Ann Arbor, MI; Strathkelvin oxygen meter, Glasgow, UK). During the hypoxic challenge the chamber PO₂ was 2–3 mmHg, compared with the control PO₂ of 135–145 mmHg. Tension development during hypoxia was expressed as a percentage of the maximal contraction, recorded at the beginning of experiments during a 2-min exposure of the artery to KPSS. The endothelium was disrupted by gently rubbing the luminal surface of the artery with a human hair. The absence of the endothelium was determined by the inhibition of carbachole (10 μ M)-induced relaxation following the contraction with PGF_{2 α} (20 μ M).

For registration of vascular rings contractile activity and its following analysis Acquisition Engine 1.1.7 (Cairn Research Ltd., UK) software was used. Results are expressed as means $\pm$ SE. Student's t-test for paired data used to evaluate statistical significance using SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) software. Differences were assumed to reach statistical significance if the confidence range was no less than 95% or $P < 0.05$.

Results and Discussion. Hypoxia elicited a biphasic response in tension in IPA precontracted with 3 μ M PGF_{2 α} as illustrated in Fig. 1. The first phase (phase 1) of HPV consisted of a transient contrac-



tion, which peaked within 3–5 min of the onset of hypoxia, followed by a relaxation, which reached a nadir within 10–15 min. This event was followed by a second phase (phase 2), characterized by a slowly developing contraction. Reoxygenation resulted in a rapid return of tension to the initial $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced values and, on subsequent washing with PSS, the vessel returned to the baseline resting values preceding application of $\text{PGF}_{2\alpha}$. As it is shown in Fig. 1, prior exposure of gap junction inhibitor 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA, 30 μM) for 20 min was without effect on the phase 1 of HPV, however, suppressed the phase 2. These data show that GJ are involved to sustained phase of HPV development.

It should be noted that 18 β -GA itself caused tone increase of isolated IPA segments as it illustrated in Fig. 1 and 2. As it can be seen in Fig. 2, endothelium removal was without effect on vasoconstriction in response to 30 μM 18 β -GA. The enhancement of $\text{PGF}_{2\alpha}$ induced pre-tone caused by 30 μM of 18 β -GA application in deendothelized IPA was similar to that observed in intact tissue.

The mechanical removal of the endothelium in IPA precontracted with 3 μM $\text{PGF}_{2\alpha}$ altered the biphasic response to hypoxia abolishing the slow contraction in phase 2 (Fig. 2). The amplitude of the phase 1 of HPV after 40 min of hypoxia in endothelium-denuded IPA was reduced whereas the phase 2 of HPV was abolished. The

application of 30 μM 18 β -GA 20 min prior to hypoxia had no effect on HPV in endothelium-denuded IPA (Fig. 2). Taken together this findings suggests that sustained HPV is endothelium-dependent and may involve myoendothelial GJ signaling.

HPV in isolated vessels is characterized by an initial transient vasoconstriction (phase 1) followed by a sustained increase in tone (phase 2) [1–3]. The latter is endothelium-dependent [1, 3, 7, 8]. Our results demonstrate that the phase 2 of HPV is critically dependent on GJ, considering that its inhibition with 18 β -GA abolishes the phase 2 in IPA. Our data consistent with the data previously obtained by us in rat main pulmonary arteries [14] and report of Morio and coauthors who mentioned that 18 α -glycyrrhetic acid, another GA derivative, abolished HPV [15]. These authors showed also that GJ inhibition with 18 α -glycyrrhetic acid abolished hypoxia-induced perfusion pressure increment in isolated rat lungs [15].

Our data demonstrating endothelium-dependency of the phase 2 of HPV allow us to conclude that GJ in IPA can mediate yet unknown endothelium-derived signal. In the view of recently obtained data pointing toward phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation and diacylglycerol (DAG) levels increase involvement in HPV, it may be reasonable to suggest that the signal that passes through GJ in hypoxia may be due to

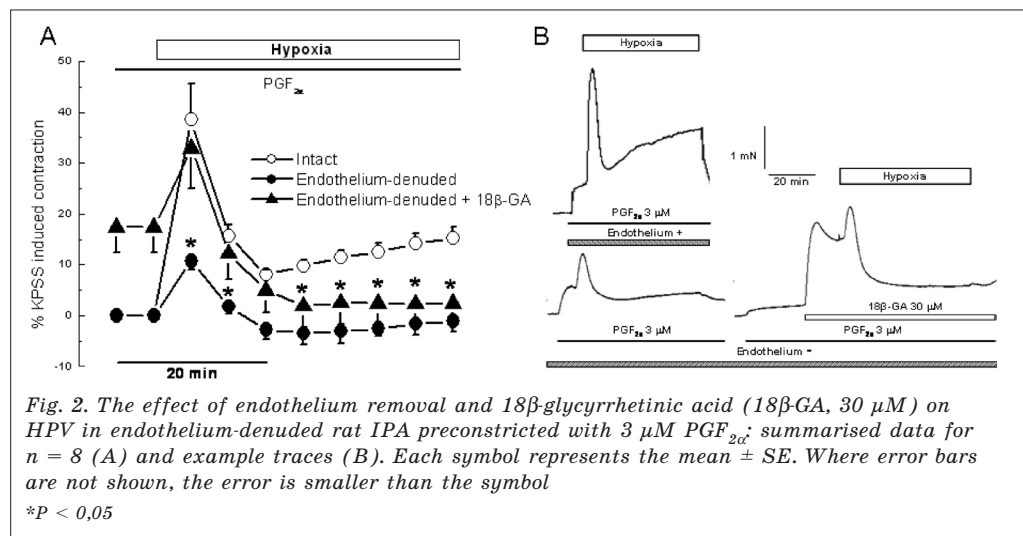


Fig. 2. The effect of endothelium removal and 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GA, 30 μM) on HPV in endothelium-denuded rat IPA precontracted with 3 μM $\text{PGF}_{2\alpha}$; summarised data for $n = 8$ (A) and example traces (B). Each symbol represents the mean $\pm$ SE. Where error bars are not shown, the error is smaller than the symbol

* $P < 0,05$

activating G_q-protein coupled receptors [16, 17].

Since endothelial and smooth muscle cells are coupled electrically via MEGJ, a passive electrotonic spread of hyperpolarization into the media contributes to relaxation. Numerous studies suggest the contribution of the MEGJ intercellular communication to EDHF-mediated vasodilation in different systemic arteries [11]. However, the physiological role of MEGJ in EDHF-mediated pulmonary vasodilatation is doubtful [15, 18]. As it have been shown in rat and mice pulmonary arteries [18] and isolated rat lungs [15], MEGJ-mediated EDHF activity does not contribute to regulating either normal pulmonary vascular tone or HPV. It is also well known that MEGJ allowing the direct passage of small signaling molecules up to $\approx 1,2$ kDa [9].

Taken together, the available data allow to hypothesize that MEGJ in pulmonary arteries may play another role: MEGJ-mediated signaling may involve reactive oxygen species (ROS). Evidence that mitochondria act as the O₂ sensor in PA has been acquired from numerous studies [1, 8, 19]. One of the three widely supported hypotheses concerning signal transduction in HPV suggests hypoxia-induced inhibition of mitochondrial electron transport chain (ETC) and consequent generation of ROS such as superoxide (O₂⁻) [1, 8, 19, 20]. Superoxide is transformed then by mitochondrial Mn-superoxide dismutases (Mn-SOD) and cytosolic Cu, Zn-SOD to more stable hydrogen peroxide (H₂O₂) but it is likely that superoxide and peroxide independently contribute to signaling in HPV [19, 21, 22]. As it has been recently shown superoxide and hydrogen peroxide mimic HPV in activating mechanisms that have been implicated in this process. In small rat IPA superoxide anion triggers ROCK-mediated Ca²⁺ sensitization [22, 23] whereas H₂O₂ evokes Ca²⁺ release from ryanodine sensitive stores and PKC-dependent Ca²⁺ sensitization [20, 21] leading to vasoconstriction. It is well known that the endothelium can produce ROS which, depending on the tissue type, possesses dilator or constrictor properties [10]. Considering this, it is likely that

hypoxia may induce the increase in ROS production in pulmonary artery endothelium which then can be transferred through MEGJ to PASMC facilitating the ROCK/PKC-mediated Ca²⁺ sensitization during sustained HPV development.

Lipophilic compound 18 β -GA is widely used as GJ inhibitors in vascular tissues [24-27]. 18 β -GA is a triterpenoid saponin isolated from licorice root that disrupts gap junction plaques [24, 25]. It affects the structural integrity, number, and distribution of connexins [27]. But it is known also that 18 β -GA in concentrations close to those needed to block GJ may have nonspecific effects on vascular smooth muscle contractility [24, 25, 27, 28]. Our findings suggest that 18 β -GA potentiates PGF_{2 α} -induced IPA constriction. This effect is endothelium-independent. Such vasoconstrictor effect of 18 β -GA in IPA may in part be explained by uncoupling of the endothelium and media with the consequent loss of a tonic hyperpolarizing influence on SMC [28] or by changes in myogenic vasoconstriction resulting from the inhibition of GJ [27].

In marked contrast to our results obtained in IPA, the data obtained by other authors in systemic vasculature showed that 18 β -GA evokes vasorelaxation or attenuates myogenic constriction [26, 27] accompanied by reduction of intracellular [Ca²⁺]_i in vascular wall [27, 28] as a result of potassium currents activation [28]. The increase in SMCs input resistance also was observed [28].

The present study also confirms an importance of GJ for contractile tone modulation of vascular smooth muscle mediated by the activation of diverse receptor systems [26]. Contrary to our results, it has been shown that 18 β -GA caused a significant diminishing of the contractile responses elicited by PGF_{2 α} and other vasoconstrictors, such as phenylephrine, norepinephrine, vasopressin, endothelin-1 and 5-hydroxytryptamine in systemic vessels [28] accompanied by hyperpolarization in SMC [26, 28] and voltage-dependent Ca²⁺ entry inhibition [28]. However, phenylephrine-induced vasoconstriction and [Ca²⁺]_i were not altered by gap junction blockers in mesenteric resistance arteries [27].

In summary, our results suggest an important role of GJ in the acute contractile response of rat pulmonary arteries to hypoxia. Since GJ inhibitor attenuate phase 2 of HPV we may conclude that MEGJ may provide yet unknown signal from the endothelium to SMC. The nature of this specific endothelium-derived agent remains to be determined. More direct measurements and more specific tools are also needed to rigorously test a possible role of gap junctional intercellular communication in the mechanisms of HPV.

Acknowledgments. This work is the part of project supported by The Physiological Society Junior Fellowship Grant 2008; The Royal Society International Travel Grant for Collaboration 2010/R1; and Disease Models and Mechanisms Journal Travelling Fellowship Grant 2010. The authors would like to thank Prof. J.P.T. Ward for his kind support of the present study and the collective of Division of Asthma, Allergy and Lung Biology of King's College London, UK for the assistance in the experimental work.

1. Hypoxic pulmonary vasoconstriction / J. T. Sylvester, L. A. Shimoda, P. I. Aaronson, J. P. T. Ward // *Physiol. Rev.* – 2012. – V. 92. – P. 367–520.
2. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia / R. E. Bennie, C. S. Packer, D. R. Powell [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* – 1991. – V. 261. – P. L156–L163.
3. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries / R. M. Leach, T. P. Robertson, C. H. Twort, J. P. T. Ward // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 1994. – V. 266. – P. L223–L231.
4. Prominent role of intracellular Ca^{2+} release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery / R. I. Jabr, H. Toland, C. H. Gelband, X. X. Wang, J. R. Hume // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – V. 122. – P. 21–30.
5. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat / T. P. Robertson, D. Hague, P. I. Aaronson, J. P. T. Ward // *J. Physiol.* – 2000. – V. 525. – P. 669–680.
6. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction / Z. Wang, N. Jin, S. Ganguli [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2001. – V. 25. – P. 628–635.
7. Robertson T. P. Ca^{2+} sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent / T. P. Robertson, P. I. Aaronson, J. P. T. Ward // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2003. – V. 284. – P. L1121–L1126.
8. Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor / R. M. Leach, H. M. Hill, V. A. Snetkov [et al.] // *J. Physiol.* – 2001. – V. 536. – P. 211–224.
9. Figueroa X.F. Gap Junctions in the Control of Vascular Function / X.F. Figueroa, B.R. Duling // *Antiox. Redox. Sens.* – 2009. – V. 1. – P. 251–266.
10. Ellis A. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone / A. Ellis, C. R. Triggle // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – V. 81. – P. 1013–1028.
11. Brisset A.C. Connexins in vascular physiology and pathology / A. C. Brisset, B. E. Isakson, B. R. Kwak // *Antiox. Redox. Sens.* – 2009. – V. 11. – P. 267–282.
12. Lin D. Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C1 domain: effects on gap junctions / D. Lin, D. J. Takemoto // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 13682–13693.
13. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells / T. Sato, R. Haimovici, R. Kao [et al.] // *Diabetes* – 2002. – V. 51. – P. 1565–1571.
14. Kizub I. V. Role of glycolysis and myoendothelial gap junctions in the development of hypoxic pulmonary vasoconstriction / I. V. Kizub, A. I. Soloviev // *Neurophysiol.* – 2003. – V. 35. – P. 323 (Abstract).
15. Morio Y. EDHF-mediated vasodilation involves different mechanisms in normotensive and hypertensive rat lungs / Y. Morio, E. P. Carter, M. Oka, I. F. McMurtry // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – V. 284. – P. H1762–H1770.
16. Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6 / B. Fuchs, M. Rupp, H.A. Ghofrani [et al.] // *Respir. Res.* – 2011. – V. 12. – P. 20.
17. Evidence for the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. / I. V. Strielkov, I. V. Kizub, A. S. Khromov, A. I. Soloviev // *Vasc. Pharmacol.* – 2013. – V. 58. – P. 292–298.
18. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of isolated mouse main pulmonary artery / J. F. Tolsa, M. Marino, A. C. Peyter, J. L. Beny // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2006. – V. 47. – P. 501–507.
19. Connolly M. J. Cell redox state and hypoxic pulmonary vasoconstriction: Recent evidence and possible mechanisms / M. J. Connolly, P. I. Aaronson // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2010. – V. 174. – P. 165–174.
20. Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells / G. B. Waypa, R. Guzy, P. T. Mungai [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – V. 99. – P. 970–978.

21. Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of Ca^{2+} release and PKC / G. E. Pourmahram, V. A. Snetkov, Y. Shaifta [et al.] // Free Rad. Biol. Med. – 2008. – V. 45. – P. 1468–1476.
22. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization / G.A. Knock, V.A. Snetkov, Y. Shaifta [et al.] // Free Rad. Biol. Med. – 2009. – V. 46. – P. 633–642.
23. Superoxide differentially controls pulmonary and systemic vascular tone through multiple signalling pathways / V.A. Snetkov, S.V. Smirnov, J. Kual [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2011. – V. 89. – P. 214–224.
24. Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18β -glycyrrhetic acid / X. Guan, S. Wilson, K. K. Schlender, R. J. Ruch // Mol. Carcinog. – 1996. – V. 16. – P. 157–164.
25. Blockade by 18β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles / Y. Yamamoto, H. Fukuta, Y. Nakahira, H. Suzuki // J. Physiol. – 1998. – V. 511. – P. 501–508.
26. Inhibitors of gap junctions attenuate myogenic tone in cerebral arteries / G. Lagaud, V. Karicheti, H.J. Knot [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – V. 283. – P. H2177–H2186.
27. Earley S. Disruption of smooth muscle gap junctions attenuates myogenic vasoconstriction of mesenteric resistance arteries / S. Earley, T. C. Resta, B. R. Walker // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V. 287. – P. H2677–H2686.
28. Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivatives in rat mesenteric small arteries / V. V. Matchkov, A. Rahman, H. Peng [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2004. – V. 142. – P. 961–972.

І. В. Кізуб, К. І. Клименко, А. І. Соловйов

Ендотелій-залежна тривала гіпоксична легенева вазоконстрикція може бути опосередкована сигналізацією через міоендотеліальні щільні контакти

Відомо, що гіпоксія викликає звуження легених артерій. Це явище спрямоване на підтримання оптимального вентиляційно-перфузійного співвідношення в погано вентиляваних ділянках легенів, однак призводить до розвитку легеневої гіпертензії. Хоча відомо, що тривала гіпоксична легенева вазоконстрикція (ГЛВ) залежить від ендотелію та гліколізу, її механізми залишаються остаточно не з'ясованими. Метою даного дослідження було вивчити вплив блокади щільних контактів (ЩК) за допомогою 18β -гліциретинової кислоти (18β -ГК) на розвиток гіпоксичних реакцій інтактних та деендотелізованих внутрішньолегених артерій щурів (ВЛА). В експериментах реєстрували зміни тону ізолюваних сегментів ВЛА за допомогою міографа. В попередньо скорочених простагландином $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 3 μM) ВЛА пригнічення ЩК під дією 18β -ГК (30 μM) не впливало на транзиторну фазу ГЛВ, однак усувало розвиток її тривалої фази. Видалення ендотелію не впливало на ефекти 18β -ГК. Отримані дані свідчать про те, що сигналізація через міоендотеліальні ЩК може бути залученою до формування тонічної фази ГЛВ.

Ключові слова: гіпоксія, гіпоксична легенева вазоконстрикція, легеневі артерії, щільні контакти, 18β -гліциретинова кислота

И. В. Кизуб, К. И. Клименко, А. И. Соловьев.

Эндотелий-зависимая длительная гипоксическая легочная вазоконстрикция может быть опосредована сигнализацией через миоэндоthелиальные плотные контакты

Известно, что гипоксия вызывает сужение легочных артерий. Это явление направленно на поддержание оптимального вентиляционно-перфузионного соотношения в плохо вентилируемых участках легких, однако приводит к развитию легочной гипертензии. Хотя известно, что длительная гипоксическая легочная вазоконстрикция (ГЛВ) зависит от эндотелия, механизмы её развития остаются окончательно не выясненными. Целью данного исследования было протестировать влияние блокады плотных контактов (ПК) при помощи 18β -глицирретиновой кислоты (18β -ГК) на развитие гипоксических реакций интактных и деэндоthелизированных внутрилегочных артерий крыс (ВЛА). В экспериментах регистрировали изменения тонуса изолированных сегментов ВЛА при помощи миографа. В предварительно сокращённых простагландинном $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 3 μM) ВЛА угнетение ПК под действием 18β -ГК (30 μM) не влияло на развитие транзиторной фазы ГЛВ, однако устраняло развитие её длительной фазы. Удаление эндотелия не влияло на эффекты 18β -ГК. Полученные данные свидетельствуют о том, что сигнализация через миоэндоthелиальные ПК может быть вовлечена в формирование тонической фазы ГЛВ.

Ключевые слова: гипоксия, гипоксическая легочная вазоконстрикция, легочные артерии, плотные контакты, 18β -глицирретиновая кислота

Надійшла: 16.12.2013 р.

Corresponding author: Igor V. Kizub, Ph.D., senior researcher, Department of Experimental Therapeutics, State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 14 E. Pottier Str., Kiev, 03680. Tel.: +38 0 44 456 02 88. E-mail: buzzmann@ukr.net.

X Національна школа молодих вчених-фармакологів імені академіка НАМН України О. В. Стефанова

Жовтень 2013 року ознаменувався подією, яку кожні два роки з нетерпінням очікують українські фармакологи – це X Національна школа молодих вчених-фармакологів. На початку дев'яностих років минулого століття академіком НАМН України О. В. Стефановим були закладені традиції заходу, який об'єднує під одним дахом, як відомих вчених, так і талановиту молодь. 23–24 жовтня 2013 року в Києві Школа молодих учених фармакологів зібралася вже вдесяте і стала логічним продовженням попередніх. До її програми було включено доповіді відомих українських учених, присвячені актуальним проблемам фармакології та суміжних дисциплін. У всьому світі існують серйозні проблеми, пов'язані з питаннями ефективності та безпеки лікарських засобів, які можуть бути спільно вирішені спеціалістами різного профілю. Крім підготовки в галузі медицини, фармакології та фундаментальних біологічних дисциплін, тут, безсумнівно, необхідний ентузіазм пізнання. При цьому важливо, щоб не тільки академічні вчені, а й практичні лікарі мали відомості щодо процесу відкриття та розробки лікарських засобів. Школа молодих учених-фармакологів повною мірою сприяє втіленню цієї ідеї серед покоління, яке визначатиме стан вітчизняної фармакологічної науки в XXI столітті.

Вице-президент Всеукраїнської громадської організації «Асоціація фармакологів України», доктор хімічних наук Г. С. Григор'єва мала честь відкрити Школу. Вона тепло привітала присутніх і відзначила, що Школа молодих учених-фармакологів є подією, що сприяє підтримці традицій української фармакології, підвищенню професійної кваліфікації та реалізації творчого потенціалу молодих вчених.

Наукову програму Школи розпочала лекція академіка НАМН України М. Я. Головенка «Конттури майбутнього фармакології». Він зазначив, що одна з головних подій у науковій стратегії початку XXI століття пов'язана зі зміною пріоритетів. Локомотивом сучасної науки є науковий напрям, який отримав найменування BioInfo-Cognito. Основною його є біотехнології (символ ген), інформаційні технології (символ біт) і когнітивні технології (символ нейрон). Безсумнівно, у цій стратегії є багато точок прикладання і для фармакології.

Також на засіданнях Школи прозвучали лекції академіка НАМН України О. Г. Резнікова «Сучасна методологія тестування протипухлинної активності лікарських препаратів на ксенографтах у мишей»; член-кореспондента НАМН України Ю. І. Губського, професора Н. І. Волощук «Гендерні аспекти фармакодинаміки і фармакокінетики ліків»; «Проблема болю в паліативній медицині: соціальний виклик і молекулярна фармакологія»; професора І. Ф. Беленічева «Участь білків теплового шоку (HSP) в реалізації механізмів нейропротекції і нейропластичності»; професора В. Й. Мамчура «Два препарати, один організм – механізми взаємодії при коморбідних патологіях»; професора А. І. Соловйова «Іонні канали як фармакологічні мішені»; професора О. В. Жолоса «Фармакотерапевтичний потенціал TRP-каналів»; член-кореспондента НАМН України Т. А. Бухтіарової і кандидата медичних наук Т. К. Єфімцевої «Сучасна розробка лікарських засобів: від експериментальних досліджень до клінічних випробувань»; професора В. М. Коваленко «Фармакокінетичні фактори лікарської взаємодії у конкретного пацієнта»; професора І. А. Зупанця



«Бренди і генерики: міфи та реальність».

У жвавих дискусіях після кожної з лекцій брали участь як молоді вчені, так і лектори. Приємним завершальним акордом було нагородження лекторів пам'ятними подарунками.

У рамках Школи пройшов конкурс наукових статей молодих учених. На конкурс були подані статті, опубліковані за останні три роки. Ольга Товчига (Національний фармацевтичний університет, м. Харків) була нагороджена за кращу публікацію «The influence of oxonate-induced hyperuricemia and allopurinol on behavioral reactions of randombred mice».

Варто відзначити, що наукова програма X Національної школи молодих

вчених-фармакологів імені академіка НАМН України О. В. Стефанова поєднала високу академічність і практичність розглянутих питань. Невимушене спілкування в неформальній обстановці сприяло плідному обміну інформацією й сприйняттю ідей. Кожен з учасників школи, безсумнівно, збагатився корисним досвідом і розширив свої професійні пізнання.

*Матеріал підготували:
віце-президент ВГО «Асоціація
фармакологів України», доктор
хімічних наук Г. С. Григор'єва,
секретар ради ВГО «Асоціація
фармакологів України» кандидат
біологічних наук Г. М. Шаяхметова*

И. Ф. Беленичев

Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции

Запорожский государственный медицинский университет

Сосудистые заболевания головного мозга – одна из ведущих причин смертности и инвалидизации населения всего мира. Окклюзия сосудов, питающих головной мозг, является начальным звеном в цепочке неблагоприятных изменений, которые приводят к грубым нарушениям метаболизма нейронов, структурно-функциональным изменениям, нередко заканчивающихся гибелью нервных клеток. Острая или хроническая ишемия мозговой ткани обуславливает каскад патобиохимических реакций, которые в конечном итоге приводят к развитию очагового неврологического дефицита, дисциркуляторной энцефалопатии или к гибели больного. Тесная взаимосвязь нарушений энергетического и пластического обмена, их влияние на течение и прогноз заболевания нередко не учитываются при разработке схем лечения, а основой патогенетической терапии считается восстановление гемодинамики. В последнее время нарушениям энергетического метаболизма и возможностям его коррекции уделяется большое внимание. Многие ученые считают, что метаболическая терапия, осуществляемая как в острый период инсульта, так и в восстановительный, является мощным превентивным фактором по отношению к повторным инсультам, инвалидизации больных и их гибели.

Фундаментальными исследованиями процессов энергопродукции в условиях ишемии установлено, что получение энергии осуществляется путем анаэробного гликолиза, реакции которого завершаются образованием только 2 молекул АТФ и накоплением лактата. На начальном этапе церебральной ишемии любой этиологии в митохондриях снижается скорость аэробного



Профессор И. Ф. Беленичев

окисления. Это ведет к уменьшению количества АТФ и возрастанию содержания аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинмонофосфата (АМФ) и, как следствие, к снижению коэффициента $АТФ/АДФ+АМФ$. При низком соотношении $АТФ/АДФ+АМФ$ активируется фермент гексокиназа (ГК), что позволяет резко увеличить пропускную способность реакций анаэробного гликолиза. Клетка в этих условиях расходует гликоген, обеспечивая себя энергией за счет бескислородного распада глюкозы. На этом этапе еще может идти адаптация к гипоксии и стабилизация энергообмена. Однако такая стабилизация обычно бывает недолгой и сопровождается достаточно быстрым истощением запасов гликогена, и анаэробный гликолиз не способен длительное время и в полном объеме обеспечивать энергетические нужды головного мозга. Конечным продуктом гликолиза является лактат, нарастание которого провоцирует внутриклеточный ацидоз. На ранних этапах ишемии клеточный ацидоз можно рассматривать в качестве

защитной реакции, так как снижение рН оказывает стабилизирующее действие на клеточные мембраны. Однако прогрессирование ацидоза вызывает денатурацию некоторых белков и формирование в цитоплазме зерен, что проявляется в появлении помутнения цитоплазмы («мутное набухание», «зернистая дистрофия»). Усиленное освобождение лактата при гипоксии приводит к метаболическому лактацидозу, который блокирует активность генов и лимитирует адаптацию. На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не работает из-за кислородного дефицита, а анаэробный – из-за ацидоза. В связи с этим, устойчивость к гипоксии формируется за счет перестройки энергетических путей, предполагающей мобилизацию механизмов поставки протонов для окислительного фосфорилирования и экономного использования недостающего кислорода. Считается, что основным из таких путей является сукцинатаксидазный, и многие компенсаторные механизмы направлены на анаэробный синтез сукцината (трансаминазный цикл М. И. Кондрашовой, цикл Робертса и др.). Поэтому на рубеже 80-90-х годов прошлого столетия метаболической терапии придавали важное значение для предотвращения повторных инсультов, инвалидизации больных и их гибели как в острый период инсульта, так и в восстановительный.

Однако клиническое применение препаратов янтарной кислоты (реамбирин, янтавит, полисар, цитофлавин и др.) показало их низкую терапевтическую эффективность в условиях острой церебральной ишемии. В последнее время благодаря революционным открытиям в области молекулярной биологии был приподнят занавес таинственности, скрывающий значение регуляторных белков в функционировании многих звеньев энергетического метаболизма. Так, в последнее время рядом экспериментальных работ установлена активация в условиях ишемии генов, кодирующих синтез белка HIF-1 (hypoxia – inducible factor), и особенно, его субъединицы HIF-1 α (120 кДа),

которая в условиях ишемии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще приблизительно 60 генов, продукты которых участвуют в процессах пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, стабилизации белковых молекул в условиях оксидативного стресса. Кроме того, в последнее время появились данные о роли белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1 α при церебральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозирующего стресса, глутаматной эксайтотоксичности. HSP индуцируются в клетках всех живых организмов в ответ на действие многочисленных стрессовых факторов, таких как тепловой шок, гипоксия, ишемия, метаболические нарушения, вирусная инфекция и воздействие фармакологических агентов. Гены этих белков активируются не только в условиях стресса, но и в ходе основных процессов клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Учитывая, что представления о доминирующей роли сукцинатаксидазного механизма сформированы на обобщении результатов опытов с изолированными органами, культурами тканей при ишемии и гипоксии разной степени выраженности, представилось целесообразным изучить состояние лимитирующих звеньев энергетического обмена и компенсаторных метаболических шунтов и молекулярных механизмов их регуляции при ишемии головного мозга. Причем, одновременное исследование различных метаболических процессов, уровня белков теплового шока (HSP 70) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), дает информацию о направленности и степени изменений этих процессов. Учитывая вышеизложенное, *целью настоящего исследования* явилось изучение показателей, характеризующих состояние транспортных систем доставки восстановительных эквивалентов и субстратов окисления в митохондриях, цикла Кребса, тканевого дыхания, а также изучение фондов макроэргических фосфатов (АТФ), активность ферментов, регули-

рующих митохондриально-цитозольный транспорт энергии; содержание HSP 70 и HIF-1a в митохондриях головного мозга монгольских песчанок при моделировании острой церебральной ишемии (ОЦИ).

Нарушение мозгового кровообращения моделировали путем необратимой односторонней перевязки сонной артерии у монгольских песчанок (*Meriones unculatus*) массой 65–70 г, которые по данным литературы последних лет наиболее часто используются для воспроизведения нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разьединением большого круга кровообращения, слабо развитой системой коллатерального кровообращения. Биохимические исследования головного мозга проводили через 1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 120 ч и 21 сутки после возникновения ишемии. Для этого обогащенную фракцию нейронов путем дифференцированного ультрацентрифугирования разделяли на две фракции – цитозольную и митохондриальную. В полученных цитозольной и митохондриальной фракциях спектрофотометрически исследовали следующие показатели: активность митохондриальной и цитозольной малатдегидрогеназы, НАД и НАДФ малатдегидрогеназы (мМДГ, цМДГ); сукцинатдегидрогеназы (СДГ), митохондриальной аспартаттрансферазы (АсТ), цитохромоксидазы (ЦХО), гексокиназы (ГК). Концентрацию в тканях головного мозга HIF- и HSP-белков определяли методом Вестерн-блот анализа. Выраженность неврологического дефицита определяли по шкале McGrow. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета программы «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.), для всех видов анализа статистически достоверными считали различия при уровне значимости менее 0,05.

Проведенными экспериментальными исследованиями в различные сроки ишемии (1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 120 ч и 21 сут) установлено, что в период наибольших ишемических нарушений, 24–72 ч, наблюдается гиперпродукция лактата на фоне угнетения ГК- фермен-

та, катализирующего первую «пусковую» реакцию гликолиза. При оценке динамики изменений окислительного метаболизма происходит резкое угнетение активности СДГ (77–85 %) и уменьшение содержания изоцитрата (56–70 %). Восстановление этих показателей начинается лишь к 21 сут эксперимента. Обращает на себя внимание первоначальное (с 1 по 24 ч) повышение активности мМДГ и цМДГ с увеличением уровня малата (20–50 %), а в дальнейшем (48–72 ч) умеренная депрессия этих ферментов (10 %) на фоне уменьшения содержания малата (16–38 %). Таким образом, наблюдается выраженное ингибирование цикла трикарбоновых кислот на участке цитрат-сукцинат. Столь резкое угнетение активности СДГ делает проблематичной реализацию сукцинатоксидазного пути доставки протонов в дыхательную цепь. Рост содержания малата с повышением активности мМДГ и цМДГ в первые часы церебральной ишемии свидетельствует об активации малат-аспартатного челночного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии. Исследование показателей биоэнергетики в острый период ишемии (до 24 ч) выявило интересные закономерности. Наиболее выражено изменялись такие показатели, как активность митохондриальных и цитозольных НАД-МДГ и НАДФ-МДГ, а также содержание HSP70, HIF-1a (рис.1).

Отмечался параллелизм в изменениях уровня малата и активности НАД-МДГ митохондрий, цитоплазматической АсТ и содержании HSP70 и HIF-1a. Установлена статистически достоверная корреляционная зависимость между изменениями уровня малата, активности НАД-МДГ и содержанием HSP70 ($\chi = 0,821$; $T - 2,94$). Также было установлено, что общая тенденция к снижению содержания малата была сопряжена с восстановлением активности НАДФ-МДГ и уровнем HIF-1a ($\chi = 0,839$; $T - 3,09$). Математическим анализом была установлена прямая зависимость между концентрацией HSP 70-белка и уровнем активности МДГ. Результаты данного бинарного регрессионного анализа показали тес-

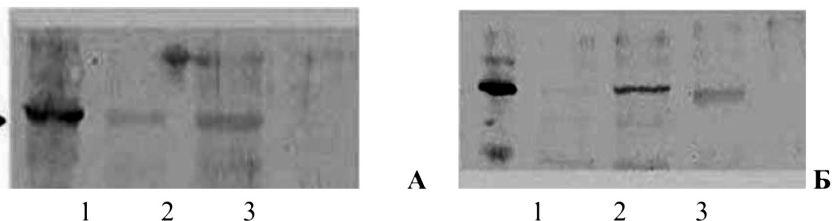


Рис. 1. Результаты иммунодетекции белков HIF 1a (А) и HSP 70 (Б)

Примечание.

- 1 – группа монгольских песчанок с легкой степенью неврологических нарушений;
2 – группа монгольских песчанок с тяжелой степенью неврологических нарушений;
3 – группа монгольских песчанок со средней степенью неврологических нарушений.

ную ассоциацию между уровнем экспрессии белков теплового шока, рассматриваемого в качестве независимого аргумента, и величиной активности МДГ митохондрий (рис. 2). Полученная зависимость носит прямой трансцендентный характер и статистически значимо аппроксимируется логарифмической моделью регрессии. Погрешность аппроксимации (0,19) и величина остаточной дисперсии показывают высокую точность линейной модели, таким образом, задачу регрессионного анализа можно считать решенной ($R = 0,93$, $R^2 = 0,86$, нормированный $R^2 = 0,84$ при $F = 53,25$, стандартная ошибка 0,604, $p = 0,00082$) (рис. 2).

Для выяснения роли малатного шунта в механизмах компенсаторной

продукции энергии и молекулярных механизмах его регуляции, была проведена рандомизация животных с ОЦИ по степени устойчивости к ишемии, исходя из бальной шкалы Р. McGrow через 24 ч ишемии. Анализ показал, что у животных с высокими баллами по Р. McGrow (выраженная неврологическая симптоматика) содержание малата, HSP70 и HIF-1a наиболее низкое (рис. 1). При этом уменьшение уровня малата в митохондриях коррелировало с высокой степенью достоверности со снижением HSP70 ($\chi = 0,899$; $T -11,4$) и активности НАД-МДГ митохондрий ($\chi = 0,976$; $T -6,3$), а также АсТ митохондрий ($\chi = 0,997$; $T -9,1$) и содержанием АТФ ($\chi = 994$; $T -9,3$). Эти факты убеждают в том, что

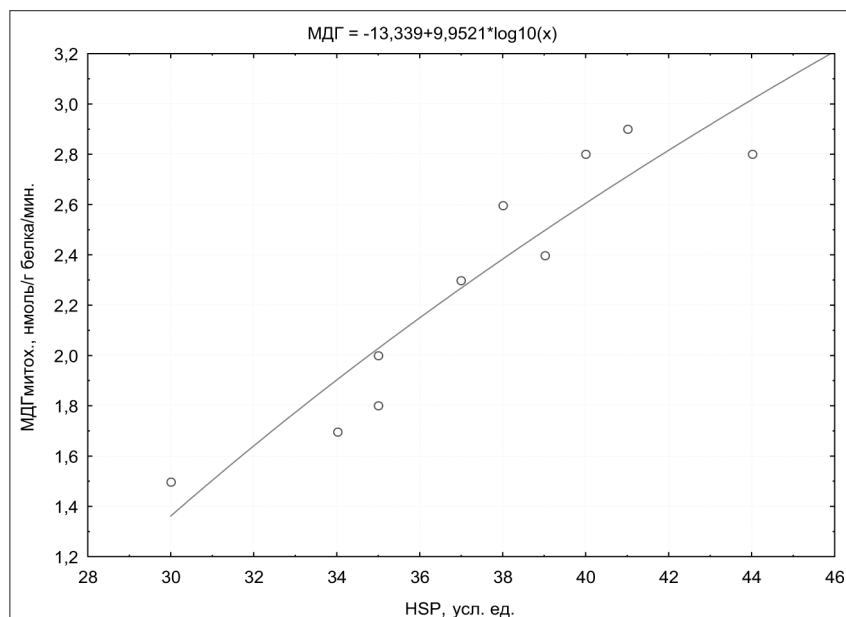


Рис. 2. Результаты регрессионного анализа взаимосвязи HSP и МДГ

продукция энергии в условиях острой церебральной ишемии зависит от функционирования малат-аспартатного шунта. Базируясь на многочисленных экспериментальных исследованиях, можно с определенной уверенностью сказать о преимуществе малат-аспартатного шунта, во-первых, как более устойчивого к гипоксии, а, во-вторых, обеспечивающего протонами в условиях острой ишемии электронно-транспортную цепь, что частично замещает сукцинатоксидазный механизм поставки протонов в электронную цепь. Кроме того, шунт Робертса лимитирован содержанием ГАМК в головном мозге [7, 10]. При этом рост малата является маркером производительности этой челночной системы, и уровень HIF-1a определяет возможность активации компенсаторного шунта энергии, а HSP70 – возможность его длительного функционирования. Данное утверждение подтверждается работами других исследователей. Так, исследованиями Dery M. A., Huang L. E. было установлено, что один из шаперонов, белок HSP90, способен связываться с доменом PAS B-фактора и стабилизировать его. Другой клеточный шаперон, HSP70, узнает иной структурный мотив молекулы HIF-1a, так называемый, домен кислородзависимой деградации (ODD). Следует отметить, что роль этих межбелковых взаимодействий неясна; предполагается, что они необходимы для стабилизации HIF-1a в условиях нормоксии. В условиях гипоксии, по крайней мере, один из шаперонов (HSP70) вытесняется из комплекса с HIF-1a белком ARNT, который в течение 20–30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от прицельного протеолиза. Таким образом, HSP70 способен увеличивать время жизни фактора HIF-1a в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода.

При оценке результатов исследования метаболизма нервной ткани можно выделить общие закономерности. Так, двухсторонняя перевязка общей сонной артерии сопровождается типичными для ишемии нарушениями биохимиче-

ских процессов – активацией гликолиза с гиперпродукцией лактата, угнетением ферментов цикла Кребса и электронно-транспортной цепи, дефицитом АТФ на фоне угнетения экспрессии HSP70 и HIF-1a. Вместе с тем, исследование этих процессов в условиях динамического наблюдения и дифференциации по степени тяжести неврологических нарушений позволяет оценить их с позиции молекулярно-биохимических механизмов адаптации, сравнить степень нарушения отдельных звеньев метаболизма, компенсаторных путей синтеза энергии и регуляторных белков (HSP70 и HIF-1a). Так, степень угнетения активности СДГ, поставляющей протоны на ФАД-зависимый участок электронно-транспортной цепи, намного выше, чем ЦХО, которая лимитирует поток электронов по всей цепи. Кроме того, имело место значительное снижение концентрации интермедиата ЦТК – изоцитрата. Эти факты позволяют предполагать, что цикл Кребса, контролируемый цитратсинтетазой и α -кетоглутаратдегидрогеназой, существенно угнетен. При этом реализация компенсаторного сукцинатоксидазного механизма затруднена. Вместе с тем дыхательная цепь функционирует, и продукция АТФ, хотя и на более низком уровне, осуществляется. Это предполагает наличие других компенсаторных механизмов поставки протонов к дыхательной цепи. В этой связи обращает на себя внимание факт увеличения содержания малата и активности НАД-МДГ-мх, коррелирующие с уровнем HSP70, как в первые минуты ишемии, так и у животных, устойчивых к ишемии. Подобное наблюдение объясняется активацией малат-аспартатного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии и участием в механизме активации и контроле его работы адаптационных белков – HSP70 и HIF-1a. Причем, угнетение продукции малата и активности НАД-МДГ-мх коррелирует со снижением уровней АТФ, HSP70 и HIF-1a, а также со степенью неврологических нарушений. Можно предположить, что в ответ на формирование ишемии головного мозга экспрессиру-

ется HIF-1a, который инициирует запуск компенсаторных механизмов выработки энергии. В дальнейшем регуляция этих процессов переключается на HSP70, который «продлонгирует» действие HIF-1a, а также самостоятельно поддерживает экспрессию активности НАД-МДГ-мх, тем самым длительно поддерживая активность малат-аспартатного челночного механизма. Также нами установлена роль генов, кодирующих синтез белков HIF-1a, HSP-70 в формировании митохондриальной дисфункции, а также в реализации клеточного ответа на ишемию головного мозга. Так, введение в инкубационную среду глутамата (100 мкМ), хлординитробензена (ХДБ) (80 мкМ), а также DNIC (250 мкМ) приводило к изменению характера экспрессии HSP70, HIF-1a, однако, данные изменения носили разнонаправленный характер. Так, в суспензиях с внесением глутамата и ХДБ наблюдалось постепенное увеличение концентрации белков HSP70 и HIF 16 с максимальным приростом на 30 мин инкубации. Далее к 60 мин наблюдалось падение концентрации HSP70 в среднем на 33 % по отношению к 15 мин, HIF-1a оказался более устойчив, уменьшение его активности составило в среднем 18 %. Исследования суспензии с добавлением DNIC показали, что накопление HSP70 и HIF-1a на 15 мин происходило менее интенсивно, чем в суспензиях с добавлением глутамата и ХДБ, и на 60 мин уменьшение HSP70 по отношению к 15 мин составило 66 %, а HIF 16 – на 50 %. Повышение в исследуемых суспензиях на 15 мин экспрессии HSP70 и HIF-1a объясняется шаперонной функцией HSP70 в условиях повреждающего действия различных токсических агентов на клетку. Считается, что белки теплового шока выполняют функции молекулярных шаперонов и предотвращают агрегацию поврежденных белков в клетке. В ряде работ было показано, что в условиях *in vitro* HSP 70 способен предотвращать агрегацию окислительно поврежденных цитратсинтазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидроге-

назы. Кроме того, одной из основных функций HSP70 является индукция, а также увеличение продолжительности жизни стабильной формы HIF-1a, которая включает дальнейшие приспособительные реакции в клетке. HIF-1a, в свою очередь, образует активный димер с субъединицей HIF-1 и начинает играть роль транскрипционного фактора, запускающая транскрипцию генов ответа на гипоксию. Кроме того, как было описано выше, HIF-1a является индукционным фактором в синтезе некоторых ферментов антиоксидантной защиты. Данным обстоятельством объясняется более длительное накопление в суспензии HIF-1a, кроме того, молекула HIF-1a более стабильна к окислительному стрессу. Принимая во внимание полученные нами данные о способности HSP70 в условиях токсического воздействия на клетку усиливать экспрессию фактора HIF-1a, играющего первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что HSP70 вмешивается в сигнальные пути ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1a. Подобная двухступенчатая защита клетки является, по нашему мнению, эволюционно развитой и необходимой для усиления трансдукционного клеточного сигнала в ответ на повреждающие агенты.

Разнонаправленный характер экспрессии исследуемых белков в суспензиях с добавлением глутамата, ХДБ и DNIC объясняется тем, что DNIC является более токсической молекулой, так как NO, и особенно, продукты его превращения, такие как пероксинитрит (ONOO⁻), ион нитрозония (NO⁺), нитроксил (NO⁻) и диазоттриоксид (N₂O₃) являются основными факторами реализации нитрозативного стресса в результате которого происходит прямое взаимодействие NO с металлами (гемовое железо гемоглобина, миоглобина, железосодержащих энзимов, а также негемовое железо железосерных белков и ДНК, медь и цинк активных центров ферментов), а также не прямое взаимодействие NO⁺ (S-,N-,O-нитрозирование) с тиольными, фенольными, гидроксильными и аминокислотными группами белков и ДНК. Слабой экспрессией факторов HSP70 и HIF-1a и

соответственно низкой их шаперонной активностью объясняется значительный прирост в суспензии выделенных нейронов с DNIC по отношению к глутамату и ХДБ нитротирозина – основного маркера окислительного повреждения белковых молекул.

Моделирование ишемического поражения на 4 сут эксперимента показало существенное увеличение концентрации белков HSP70, HIF-1a, что связано, по нашему мнению, с их шаперонной активностью в условиях развивающегося оксидативного стресса, направленной на интенсификацию резервно-адаптационных возможностей в острый период ишемии.

Известно, что в зависимости от концентрации образовавшихся активных форм кислорода окислительный стресс в конечном итоге ведет либо к некрозу, либо к апоптозу. Высокий уровень активных форм кислорода вызывает сильное повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, следствием чего является некроз. Умеренный окислительный стресс вызывает программируемую гибель клетки, то есть приводит к апоптозу. HSP70 и HIF-1a за счет позитивного влияния на синтез антиоксидантных ферментов, шаперонную активность, стабилизацию актиновых филаментов препятствуют развитию некроза. Нейропротективная роль HSP70 в условиях ишемии была показана и работами некоторых зарубежных исследователей. Так, работами М. С. Papadopoulos была показана роль повышения экспрессии HSP70 в клетках мозга (в астроцитах) в защите их от гибели, вызванной кислородным голоданием. Кроме того, была продемонстрирована способность очищенного препарата HSP70 повышать выживаемость нейронов, участвующих в глутаматергической синаптической передаче в обонятельной коре мозга крыс при тяжелой аноксии. Тем не менее, до сих пор неясно, каков механизм защитного действия HSP70. Принимая во внимание данные о способности HSP70 усиливать жизнеспособность нейрональной клетки в условиях гипоксии и факт взаимодействия HSP70 и HIF-1a, играющего первостепенную роль в кле-

точном ответе на гипоксию, можно предположить, что HSP70 участвует в регуляции сигнальных путей ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1a. Зафиксированное нами повышение экспрессии HSP70 на 4 сут экспериментальной ишемии подтверждает значимость шаперона HSP70 для стабилизации системы реакции клеток на ишемию; по-видимому, этот механизм лежит в основе защитной активности белка.

Кроме того, нейропротективный эффект HSP70 в условиях ишемии объясняется и его антиапоптотическим, а также митопротективным действием. В настоящее время в литературе постулируется три основных пути влияния белков теплового шока на процессы апоптоза. Во-первых, они могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo1 внутрь клетки, во-вторых, они могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома C из митохондрий и, наконец, в-третьих, эти белки могут влиять на формирование апоптосом и активацию каскада каспаз. HSP70 блокирует апоптоз, вызванный активацией рецептора Fas/Apo1. После связывания с лигандом рецептор взаимодействует с адаптерными белками, одним из которых может быть белок FAD. Этот адаптерный белок связывает неактивную про-каспазу 8 и способствует ее активации при связывании рецептора с лигандом. Каспаза 8 активирует каспазы 3, 6 и 7, и, тем самым, инициирует протеолиз белков – мишеней, что в конечном итоге приводит к апоптозу. Кроме того, каспаза 8 может активировать белок Bid, вызывающий высвобождение цитохрома C из митохондрий. Место действия HSP70 в этой сложной цепочке реакций пока точно не установлено. Альтернативный путь запуска апоптоза через Fas/Apo1 включает белок Daxx. Механизм действия этого белка не достаточно изучен. В норме Daxx локализован в ядре, где он связан с определенными белками, но способен перемещаться в цитоплазму и играть роль адаптерного белка, ответственного за запуск каскада JNK-киназ путем активации Fas/Apo. Предполагают, что

HSP70 способен перемещаться в ядро, где он взаимодействует с Дахх, препятствуя его выходу в цитоплазму и активации рецептора. Ранее отмечалось, что HSP70 может участвовать в регуляции апоптоза не только на уровне рецептора Fas/Apo1, но и на уровне определенных внутриклеточных белков-мишеней. Действительно, было показано, что HSP70 предотвращает апоптоз, инициируемый митохондриями, при этом авторы предлагают разные механизмы действия белков теплового шока. Как известно, падение мембранного потенциала, вызываемое ишемией головного мозга, приводит к высвобождению цитохрома С из митохондрий. В цитоплазме цитохром С связывается с белком Араф1, дезокси АТФ и прокаспазой 9, формируя так называемую апоптосому. Формирование апоптосомы сопровождается аутокаталитической активацией прокаспазы 9 и ее переходом в активную форму каспазы 9. Этот фермент активирует прокаспазу 3 и следующие за ней каспазы, участвующие в процессе апоптоза. HSP70 ингибирует апоптоз на этапе между высвобождением цитохрома С и расщеплением прокаспазы 9 в апоптосоме. В последнее время в литературе появились данные о том, что HSP70 способен взаимодействовать с цитохромом С. Вопрос о том, какая часть освободившегося из митохондрий цитохрома С связывается с HSP 70, остается открытым. Рядом работ было показано, что HSP70 связывает лишь очень незначительную долю выпущенного из митохондрий цитохрома С, и поэтому не может играть существенной роли в формировании апоптосомы. По данным этих авторов HSP70 препятствует снижению мембранного потенциала, вызываемого белком Вах, но не взаимодействует с этим белком. Авторы предполагают, что при митохондриальном пути развития апоптоза HSP70 действует на более ранних этапах этого сложного процесса и предотвращает нарушение структуры актиновых филаментов. Данная гипотеза подтверждается и нашими исследованиями. Так на 4 сут эксперимента на фоне значительного прироста HSP70 и HIF1a явления

митохондриальной дисфункции (открытие митохондриальной поры, сохранность заряда митохондрий) не были выражены. Однако регистрация этих показателей на 12 сут эксперимента показала существенное проявление данных изменений, а именно падение заряда митохондрий более чем на 60 %, а также открытие митохондриальной поры. Следует отметить, что данные изменения протекали на фоне снижения HSP 70 и HIF-1a.

Подобные динамические изменения объясняются, по нашему мнению, срывом адаптационных возможностей организма на 12 сут эксперимента, а также развитием нитрозативного стресса, о чем свидетельствует увеличение количества нитротирозина в головном мозге более чем на 75 % по отношению к показателю животным на 4 сут.

Это может быть связано с гиперпродукцией АФК и цитотоксических форм оксида азота, приводящих не только к модификации (обратимой и необратимой) макромолекул, в том числе и самих HSP70 и HIF-1a, но и снижению экспрессионной активности генов, кодирующих синтез последних. Рядом работ доказана роль дериватов оксида азота в подавлении генной активности и снижении уровня различных транскрипционных факторов. Нами в предыдущих работах было показано, что избыток таких форм оксида азота, как пероксинитрит и ион нитрозония вначале нитролизуют тиольные – редокс-зависимые участки этих генов, затем при повышении концентрации окисляют их. Пероксинитрит приводит к нитрозилированию гуанина и разрыву цепочек ДНК. В отношении повреждений генома известен еще один эффект NO: его дериваты с супероксидрадикалом ингибируют ферменты, ответственные за репарацию ДНК. В зависимости от источника (разные доноры NO) показано действие NO на алкилтрансферазу, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазу и лигазу. NO повышает активность PARP в клетках Беца и АДФ-рибозилирование при глобальной ишемии, возможно вследствие разрывов ДНК, но это скорее приводит к некрозу из-за истощения пула НАД и АТФ.

Таким образом, белки HSP70 и HIF-1 α являются неизбежными спутниками патобиохимических реакций, развивающихся при ишемическом повреждении головного мозга, и выполняют в данных условиях протективную функцию, реализующуюся посредством усиления синтеза антиоксидантных ферментов, стабилизации окислительно поврежденных макромолекул, прямого антиапоптотического и митопротективного действия. Подобная роль данных белков в клеточных реакциях при ишемии ставит вопрос о разработке новых нейропротективных средств, способных обеспечивать модуляцию/протекцию генов, кодирующих синтез белков HSP70 и HIF1 α . Нами предприняты попытки установить роль HSP70 в реализации нейропротективного действия некоторых препаратов. Проведенными экспериментальными исследованиями было установлено, что достаточно высокая нейропротективная эффективность селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (Тамоксифен, Ливиал) реализуется за счет активации β -эстрогеновых рецепторов (β -ER) и отсоединения от последних HSP70, что обеспечивает проникновение HSP70 внутрь клетки.

Нашими работами установлено также участие HSP70 в реализации нейропротективного и энерготропного действия нейротрофического церебропротектора – Цереброкурина. Цереброкурин в условиях острой церебральной ишемии способен через активацию глобальных факторов транскрипции, запустить синтез HSP70, связываться с ним и в таком виде презентовать его дендринным клеткам.

Выводы

1. Роль HSP70 в регуляции многих процессов жизнедеятельности клетки является значимой.

2. Полученные результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротективной терапии и являются экспериментальным обоснованием клинического применения препаратов, повышающих экспрессию белков теплового шока, как нейропротекторных средств.

3. Нейропротекторное действие исследуемых препаратов реализуется прямо или опосредованно через повышение HSP70.

Н. Я. Головенко

Контуры будущего фармакологии

Физико-химический институт НАН Украины, г. Одесса

«Будущее...» – это самое важное. От того, насколько ясно мы его представляем, зависят наши сегодняшние усилия и научная стратегия. Прогнозы – дело неблагодарное, хотя и совершенно необходимое. В настоящем сообщении мы попытались проанализировать развитие фармакологии в ближайшем будущем.

Прогнозирование развития любой науки может быть основано на различных методических подходах (интуиция, фантазия). Мы используем научный подход (форсайт-исследования), получивший широкое распространение в мире. Он позволяет не просто прогнозировать будущее, а создать своеобразные «дорожные карты» для развития различных областей науки и техники. Теоретик форсайта (от английского foresight – предвидение) профессор Университета Сассекса Бен Мартин определяет форсайт-исследования как «систематические попытки оценить долгосрочные перспективы науки, технологий, экономики и общества, чтобы определить стратегические направления исследований и новые технологии, способные принести наибольшие социально-экономические блага». Форсайт-проекты – это формирование будущего на основе мониторинга уже происходящих и только намечающихся изменений, расстановка приоритетов во многих областях. Для регулярного наблюдения за такими изменениями были созданы Международный научно-образовательный Форсайт-центр и журнал «Форсайт».

Одно из главных событий в научной стратегии начала XXI века связано со сменой вех ее приоритетов. Локомотивом современной науки является главное научное направление, получившее в мировой практике наименование BioInfoCognito (BIC). Основными его направлениями являются биотехнологии (символ ген), информационные тех-



Академик НАМН Украины
Н. Я. Головенко

нологии (символ бит) и когнитивные технологии (символ нейрон). Конечный результат реализации этого направления – анализ генов и белков, создание новейших компьютеров и понимание работы мозга. Несомненно, в этой мировой стратегии имеется много точек приложения и для фармакологии. Напомним, что фармакология рассматривает механизмы действия лекарственных веществ (первичные фармакологические реакции, влияние на ферменты, биологические мембраны, электрические потенциалы, рецепторные механизмы); изучает общие закономерности их действия на организм в зависимости от характера распределения, метаболизма, путей введения и выделения и в некоторых случаях включает разработку лекарственных веществ.

В ближайшие годы следует ожидать новые подходы в фармакологических исследованиях. В частности, будут разработаны новые пути изучения механизмов действия лекарств, основанные на данных о структуре и функции известных и, особенно, новых биомолекул. В настоящее время известно всего около 500 мишеней. Предполагается возможность установления структу-

ры 5–10 тыс. новых биомолекул. Это повлечет за собой синтез новых лигандов (препаратов), которые будут более эффективными и безопасными. Значительное внимание будет уделено такой проблеме, как «новые» пациенты», их генотипированию и индивидуальным откликам на лекарства, то есть особое развитие получит персонализированная медицина. Особое внимание будет уделяться такой проблеме, как кросс-резистентность – устойчивость клеток к тем препаратам, которые не использовались для отбора резистентных клеток (или для лечения). В этом случае необходимо учитывать следующие механизмы: 1) изменение скорости и направления метаболизма лекарств; 2) изменение активности или экспрессии определенных клеточных белков, таких как Р-гликопротеины, МЛУ-ассоциированный протеин (MRP), глутатион-S-трансфераза, протеинкиназа С; 3) изменения в клеточной физиологии, связанные с трансформацией структуры клеточной мембраны, цитозольного рН и характеристик внутриклеточного транспорта мембранных элементов (структура и функционирование лизосом); 4) формирование феномена десинтезаций нейрорецепторов.

Биологическая мишень – это макромолекулярная биологическая структура, предположительно связанная с определенной функцией, нарушение которой приводит к заболеванию и на которую необходимо совершать воздействие. К методам экспериментальной валидации мишеней относятся: а) геномные методы, которые заключаются в подавлении синтеза мишени в тестовой системе путем получения мутантов с генным нокаутом (в которых ген мишени попросту отсутствует); б) использование РНК-антисмысловых последовательностей, «выключающих» тот или иной ген; в) инактивация с помощью моноклональных антител или облучение мишени; г) модификация хромофоров, лазерным излучением или низкомолекулярными лигандами.

Биомишени являются объектами исследования таких направлений молекулярной биологии и генетики, как геномика и протеомика. В первом слу-

чае это идентификация всех генов человека и нарушений в них, приводящих либо к наследственным заболеваниям, либо к предрасположенности к ним. Полученные данные используются в клинической практике молекулярно-генетических методов лечения и диагностики, ориентированных на индивидуальный подбор лекарственного препарата и его дозы. Примером приложения геномики к фармации может быть гиперлипидемия, обусловленная генетическим вариантом В1В1 серт-гена. На этом принципе создано новое лекарство правастатин.

Протеомика устанавливает корреляцию между набором белков, нарабатываемых в ткани или клетке, и началом или развитием болезни. Протеомика – новая область биологии, позволяющая осуществить инвентаризацию всех белков клетки. Исследования, ведущиеся в этой отрасли, способствуют созданию новых диагностических тестов и лекарственных препаратов нового поколения.

Протеомика – это, грубо говоря, то, что последовало за геномикой. Когда был частично расшифрован геном человека, возникли так называемые постгеномные технологии. Они так называются потому, что основываются на информации, обнаруженной в геноме. Расшифровка генома человека, представляющего собой огромную матрицу, где содержится вся информация о человеке и о каждой клетке его организма, – длительное, мучительное и даже неблагодарное занятие. Данные геномики позволяют приступить к созданию постгеномных технологий – к изучению РНК и белка. Многие заболевания, например, рак, реализуются на уровне белков.

Детализацией перехода от геномики к протеомике занимаются новые направления, включенные в группу так называемых омик. Так, в транскриптомике идентифицируют все матричные РНК, кодирующих белки, определяют количества каждой индивидуальной мРНК и закономерности экспрессии всех генов, кодирующих белки. Транскриптом – набор всех РНК, находящихся в данном образце. Анализ транскриптома, определение качествен-

ного и количественного профиля всех синтезированных РНК отражает синтез кодируемых ими белков, а также синтез рибосомальных, транспортных и других РНК.

Пожалуй, самой громкой сенсацией биологии конца XX стало открытие принципиально нового класса РНК. Практически во всех на этот счет исследованных эукариотных организмах неожиданно было обнаружено огромное количество различных РНК, которые не кодируют белки и не являются ни рибосомальными, ни транспортными. Играть они, в основном, регуляторную роль – влияют на экспрессию генов (чаще всего на уровне трансляции). Это так называемые микроРНК длиной 19–22 нуклеотида. К ним относятся и так называемые короткие интерферирующие РНК (si-RNA), которые выключают синтез определенных белков путем разрушения их мРНК. МикроРНК регулируют экспрессию генов после их транскрипции. Рнмика – идентификация всех не кодирующих РНК, определение количества каждой индивидуальной нкРНК – определение закономерностей экспрессии всех нкРНК.

Метабономика – идентификация и количественное определение всех метаболитов, синтезируемых (или находящихся) в данных клетках, тканях, органах и в биологических жидкостях. На всех представленных этапах синтеза белка (биомишени) возможно использование лекарств, корригирующих процесс.

В связи с огромным количеством данных особое значение будет уделено информационным ресурсам (информатикам).

Биоинформатика – использование вычислительной техники, математики и информационной теории для анализа и моделирования молекулярно-биологических систем, в особенности систем, состоящих из генов, нуклеиновых кислот, белков и метаболитов. Хемоинформатика – применение методов информатики для решения химических проблем. Прогноз физико-химических свойств молекул (в частности, липофильности, водорастворимости). Биофармацевтическая информатика – создание баз данных фармакокинетиче-

ских параметров лекарств и их лекарственных форм.

Получение сведений о фармакологических свойствах веществ возможно при проведении их скрининга. Это оптимизированная конвейерная процедура, в результате которой большое количество химических соединений (> 10 000) проверяется на аффинность или активность по отношению к специальной тестовой (имитирующей биологическую) системе: она включает исследования *in vitro*, *in vivo*, *in silico* и в зависимости от производительности подразделяется на низко- (10 тыс. – 50 тыс. образцов), средне- (50 тыс. – 200 тыс. образцов) и высокопроизводительную (200 тыс. – 500 тыс. образцов).

Значительное развитие получают такие компьютерные методы, используемые в конструировании лекарств, как: а) молекулярное моделирование; б) виртуальный скрининг; в) дизайн новых лекарственных препаратов *de novo*; г) оценка свойств «подобия лекарств»; д) моделирование связывания лиганд-мишень; е) конценсусные модели.

Развитие получают оба варианта совместного использования высокопроизводительного скрининга и молекулярного моделирования:

1) *Последовательный итеративный скрининг*. На каждом шаге процедуры используется сравнительно небольшой набор лигандов; по результатам скрининга строится модель, объясняющая связь между структурой и активностью. Модель используется для выбора следующего набора лигандов для тестирования; 2) *«Разовый» скрининг*. На каждом шаге модель строится по обучающей выборке и используется для предсказаний на тестовой выборке. При этом будут использоваться две различные стратегии скрининга: диверсификационный – привлечение наиболее непохожих друг на друга лигандов с целью охватить как можно большую область химического пространства и сфокусированный – использование библиотеки родственных соединений, полученных методом комбинаторной химии, что позволяет выбрать более оптимальный вариант лиганда.

Наши представления о типах инновационных препаратов вряд ли существенно изменятся. Как и сейчас это будут: 1) препараты сегмента first-in-class (то есть первый препарат с данным механизмом действия); 2) препараты сегмента next (best)-in-class, то есть следующий (лучший) среди лекарств с одним и тем же механизмом действия; 3) средства доставки (таргетные препараты): антитела и «малые молекулы» (низкомолекулярные ингибиторы).

Большие надежды возлагаются на биотехнологические препараты, созданные на основе сложных белковых молекул (цитокины, другие эндогенные регуляторы функций, ферменты). Это средства таргетной терапии, производимые на основе моноклональных антител, гормонов (в основном инсулин), гемопоэтических ростовых факторов (преимущественно пролонгированного действия), иммуномодуляторов. Кроме того, важное место останется за препаратами, снижающими уровень холестерина в крови, и другими средствами для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Мозг и разум – последний великий рубеж наук о жизни. Привлекательными для фармацевтических компаний является и разработка когнитивных «энхансеров» – препаратов, которые позволяют искусственно (фармакологически) усиливать когнитивные способности человека.

Не исключена возможность появления на рынке и механических лекарств. В настоящее время разработка наноматериалов и медицинских приборов на их основе для терапии заболеваний охватывает практически все направления медицины (кардиология, неврология, эндокринология,

пульмонология, онкология и т. д.). Наиболее интересными, на наш взгляд, является наноустройства, в которых предусмотрен переход от отдельных элементов и их сборки до включения в один прибор сенсорной, логико-аналитической, передвижной и исполнительной функций. На их основе возможно создание микроробота (врача), в котором будут сочетаться функции диагноста, терапевта и хирурга. Они будут передвигаться в кровеносной, лимфатической или других системах человека. Уже созданы образцы таких роботов, и их называют ассемблерами или репликаторами. Их функциональные узлы имеют размеры около 1 мм и есть надежда на уменьшение их до микронного и субмикронного уровней. Собираются они будут из наночастиц общим размером 0,5–3 мкм (три микрона – минимальная величина капилляров). Нанороботы, которые будут находиться в тканях, могут иметь размер от 50 до 100 мкм, а те, которые будут предназначены для функционирования в бронхах, могут быть еще больше. Они будут сконструированы на базе углерода, так как его производные обладают значительной прочностью и химической инертностью. Их использование, порядок, срок работы и вывода из организма будут зависеть от конкретных задач. Основными источниками энергии питания нанороботов будет глюкоза или аминокислоты человеческого организма. Управление нанороботами будет осуществляться акустическим путем или по командам компьютера. Таким способом будут созданы аналоги эритроцитов, тромбоцитов, иммунных клеток, соответственно респирициты, клотоциты и микрофагоциты.

Ю. І. Губський

Проблема болю в паліативній медицині: соціальний виклик та молекулярна фармакологія

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Біль є суб'єктивним відчуттям та переживанням, що виникає як реакція організму на дію шкідливих, руйнівних подразнень. Механізм формування болю складається із взаємодії двох фізіологічних систем: власне больової (ноцицептивної) та протибольової (антиноцицептивної) системи.

Ноцицептивна система

Сприйняття пошкоджуючих подразників реалізується **ноцицепторами** (**ноцирецепторами**; больовими рецепторами), що є елементами сенсорних нейронів, які активуються різними подразнюючими стимулами [1]. Кінцеві структури ноцицепторних нейронів широко представлені в шкірі, м'язах, підшкірній, кістковій тканині, суглобах, внутрішніх органах. Ноцицептори можуть бути активовані механічними стимулами, термічними або хімічними подразненнями [1].

Нейрохімічні механізми ноцицепції.

Альгогени

Медіаторами ушкоджуючого больового подразнення є фізіологічні активні сполуки – **альгогени**, що в мінімальних концентраціях взаємодіють з рецепторними та каналними білками плазматичних мембран первинних терміналей ноцицепторів та ініціюють нервовий імпульс, що сприймається на рівні головного мозку, як больове відчуття [2–4]. Існує декілька груп альгогенів:

1) **тканинні альгогени** – сполуки, що виділяються в позаклітинне середовище при пошкодженні мембран тучних клітин (гістамін), тромбоцитів (АТФ, серотонін), нейтрофілів (лейкотрієни), макрофагів, ендотелію (інтерлейкін-1, фактор некрозу пухлин, ендотеліні, простагландини, оксид азоту NO);



Член-кореспондент НАМН України
Ю. І. Губський

2) **альгогени плазми крові** (брадикінін, калідін);

3) **нейрокініни** – алгогени, що вивільняються з периферичних закінчень С-ноцицепторів (субстанція Р, нейрокінін А, кокальцигенін);

4) **збуджувальні амінокислоти** (L-глутамат, L-аспартат), що вивільняються нейронами спинного мозку за дії ноцицептивних імпульсів.

Передача нейрохімічного ноцицепторного (больового) збудження після подразнення відповідних периферичних ноцицепторів до центральних структур спинного та головного мозку здійснюється спеціальними мієлінізованими Аδ-волокнами (швидкого типу) та немієлінізованими С-волокнами (повільного типу), що входять до складу соматичних нервів. Подальша передача ноцицептивних імпульсів включає нейрони спиноталамічного тракту спинного мозку, який закінчується у вентробазальному ядрі таламуса. Імпульсація від останнього передається на спеціальні зони соматосенсорної кори головного мозку, де і формується специфічне суб'єктивне відчуття болю [5].

© Ю. І. Губський, 2013

Антиноцицептивна система

Стимуляція структур антиноцицептивної системи головного мозку викликає явище та почуття знеболення у людини та тварин.

Складовими антиноцицептивної системи є:

- *опіоїддергічна система*, що містить опіоїдні нейропептиди (ендорфіни, енкефаліни);

- *серотонінергічна система*;

- *норадренергічна система*;

- *система ендogenous канабіноїдів*.

Патофізіологічні основи больового синдрому

З фізіологічної точки зору біль є важливим захисним механізмом, що сигналізує про життєву небезпеку та сприяє збереженню цілісного організму. Разом з тим, біль надзвичайної сили та тривале больове подразнення й відповідне важке відчуття болю формують стійкі патологічні реакції в периферичній та центральній нервовій системі. Такий біль звуть *патологічним*. Саме цей біль формує нейрофізіологічну та патофизиологічну картину важкого больового синдрому, що надає стільки страждань хворій людині за умов його тривалої та потужної дії, як це має місце за росту та метастазування злоякісної пухлини. У цій ситуації формується стійкий синдром хронічного болю, або **хронічний больовий синдром** (ХрБС), притаманний багатьом хронічним хворобам та практично усім розповсюдженим видам злоякісних пухлин.

Біль, що спостерігається в паліативній онкології, становить небезпеку для організму, спричиняючи додаткові нейрофізіологічні зміни та порушення гомеостазу цілісного організму. Саме тому ХрБС у термінальний період життя, особливо в онкологічних пацієнтів, значно відрізняється від гострого болю багатьма проявами, що зумовлені стійкістю та силою болю, які відчуває пацієнт. Згідно з документом «Контроль болю в онкології. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах» МОЗ України, 2011 (Хобзей М. К., Губський Ю. І. та ін.), – **хронічний біль** визначається як постійний біль,

який може бути від тривалого і рецидивного достатньої тривалості та інтенсивності, до такого, який негативно впливає на здоров'я пацієнта, рівень функцій і якість життя (*Wisconsin Medical Society Task Force on Pain Management, 2004*). Якщо пацієнт раніше не обстежувався, слід спробувати відрізнити нелікований гострий біль від хронічного, нейропатичного болю. В основі останнього лежить до кінця нез'ясоване явище гіперсенситизації нервових структур, коли мінімальні, підпорогові стимули викликають значне зростання імпульсації в ноцицепторній системі [1], що клінічно проявляється патологічним зростанням чутливості до невольових подразнень (*гіпералгезія, аллодинія*).

У класифікаціях останніх років, з урахуванням рекомендацій Міжнародної Асоціації вивчення болю (International Association for the Study of Pain; IASP) виділяють різні патогенетично обґрунтовані типи болю. Кожен тип болю зумовлений різним ступенем ушкодження м'яких тканин, кісток та внутрішніх органів, як самою пухлиною, так і її метастазами. Згідно з сучасними клінічними класифікаціями, розрізняють такі типи хронічного болю за джерелами його виникнення: 1) ноцицептивний; а) соматичний; б) вісцеральний; 2) невропатичний; 3) каузалгію.

Частота ХрБС у онкологічних хворих

Синдром хронічного болю, особливо в пацієнтів у III–IV клінічній стадії хвороби, це найпоширеніший та найстрашніший щодо порушення якості життя прояв розвитку злоякісних новоутворень. Саме тому, як свідчать численні клінічні спостереження та науковий аналіз, найважливіше місце в системі фармакологічних заходів паліативної медицини, зокрема в паліативній онкології, займає боротьба з хронічним больовим синдромом [6].

Залежно від клінічної форми та стадії розвитку патології, синдром хронічного болю спостерігається в 45–100 % хворих на рак, особливо в термінальній стадії захворювання [7]. На початкових стадіях росту пухлини (тобто фактично

в період першого звернення пацієнта по медичну допомогу) біль зустрічається в 30–40 % хворих, у стадії розповсюдження процесу – у 60–70 %, а при генералізації пухлинного процесу – у 90 % Біль, відчуття втоми, втрата апетиту та розвиток кахексії є найпоширенішими та важкими симптомами, що погіршують якість життя людини в усіх випадках пізніх стадій раку [8].

Місце та значення ХрБС в паліативній онкології

За оцінками експертів ВООЗ, до 2020 року у світі щорічно будуть захворювати на злоякісні новоутворення близько 20 млн осіб, до того ж – 70 % з них – у «злиднених» країнах, до категорії яких ВООЗ відносить країни, що виділяють на боротьбу з онкологічними хворобами менше 5 % ВВП. Так, станом на 2007–2008 роки в Україні мешкало близько 980 тис. осіб, що страждали на онкологічні захворювання, а кількість померлих у ці роки (у перерахунку на загальну чисельність населення України) склала: у 2007 році – 89 869 осіб, у 2008 році – 88 964 особи [6].

При цьому, як свідчить клінічний аналіз, біль є головним клінічним симптомом, що супроводжує хворих із злоякісними новоутвореннями, особливо в IV стадії ракового процесу, тому медична та соціальна актуальність боротьби з болем є однією з центральних проблем паліативної онкології [8, 9].

Фармакологічний контроль больового синдрому

Необхідність застосування комплексу фармакологічних заходів, спрямованих на контроль хронічного болю в пацієнтів із злоякісними пухлинами, ґрунтується на результатах чисельних клінічних спостережень і наукових досліджень, які вказують, що, виходячи з можливостей сучасної клінічної медицини, зокрема фармакотерапії високоефективними анальгетиками, біль у онкохворих може бути ліквідований у 80–90 % пацієнтів, навіть у III–IV стадіях розвитку пухлинного процесу.

Лікарські засоби, що застосовуються для ефективної терапії ХрБС, спрямо-

вані на такі ланки патогенезу болю [5, 7, 10]:

- пригнічення синтезу та виділення альгогенів у пошкоджених тканинах;
- обмеження надходження ноцицептивних імпульсів із зони пошкодження в ЦНС;
- активацію структур ноцицептивної системи;
- відновлення механізмів контролю збуджуваності ноцицептивних нейронів;
- усунення генерації ектопічних імпульсів у периферичних нервах;
- усунення болісної м'язової напруги;
- нормалізацію психологічного стану пацієнтів.

З метою контролю болю різного ступеня в паліативній онкології застосовують такі класи ЛЗ:

- ненаркотичні анальгетики та НПЗЗ;
- наркотичні (опіюїдні) анальгетики;
- допоміжні або ад'ювантні ЛЗ, дія яких спрямована на оптимізацію дії анальгетиків (психотропні, заспокійливі засоби) та усунення інших симптомів, що супроводжують розвиток пухлинного процесу.

На жаль, усі опіюїдні ЛЗ мають аддиктивні властивості, тобто вже навіть за нетривалого їхнього застосування можуть розвиватися такі вкрай несприятливі явища, як толерантність та залежність, що за клінічних ситуацій обмежує можливість застосування цих високоефективних препаратів. Саме тому медичне застосування всіх опіюїдних анальгетиків, у тому числі в паліативній медицині, є об'єктом контролю з боку спеціальних державних органів та інституцій (Controlled Substances Act, USA, 1970). Згідно з чинним законодавством України, опіюїдні анальгетики віднесені до наркотичних засобів, обіг яких, у тому числі застосування в медичній практиці, контролюється згідно з Законом України від 15.02.1995 р. В Україні цю функцію виконує Державна служба з контролю за наркотиками, як центральний орган державної виконавчої влади [6, 11].

Необхідно також взяти до уваги, що гострий та особливо хронічний, довго-

тривалий біль супроводжується системною патофізіологічною реакцією цілісного організму з розвитком синдрому оксидативного стресу (ОС), що призводить до суттєвих порушень функціонування життєво важливих систем, зокрема біохімічних та імунологічних реакцій у цілісному організмі.

Таким чином, розв'язання клітинних та молекулярних механізмів болю, що супроводжує ріст злоякісних пухлин та більшість запальних і дегенеративних станів, на які страждають особи похилого та старечого віку, залишається актуальною проблемою біомедицини, а проблема ефективного контролю болю – одним з найактуальніших завдань сучасної клінічної та молекулярної фармакології [10, 12].

Антиоксиданти як модулятори розвитку БС та дії анальгетиків

Нами було висловлено припущення [13, 14], що саме утворення вільних радикалів з розвитком оксидативного стресу (ОС) та вивільнення прозапальних цитокінів та інтерлейкінів у гліальних клітинах спинного мозку являє собою системну реакцію організму людини та тварин, що сприяє генералізації больового синдрому за умов дії пошкоджуючих альгогенних факторів.

Виходячи з цих концептуальних уявлень, метою наших експериментальних досліджень [13, 14] стало вивчення впливу ЛЗ з класу антиоксидантів (АО) на перебіг больового синдрому (БС) та розвиток оксидативного стресу в експериментальних тварин з гострим ноцицептивним болем, а також модифікуючого впливу антиоксидантів (АО) щодо фармакологічних ефектів ЛЗ анальгетичної дії (рис. 1).

Згідно з отриманими даними, експериментальний больовий синдром запального ґенезу, модельований на дорослих білих щурах, супроводжується змінами

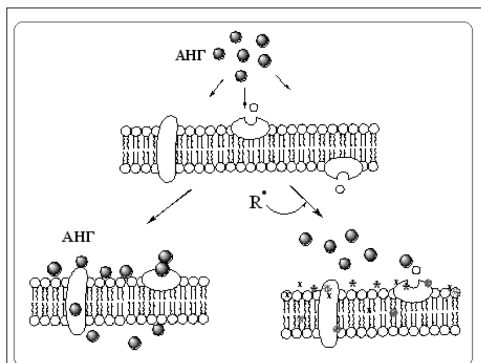


Рис. 1. Больовий синдром, як різновид оксидативного стресу. Вільні радикали $R^\bullet$, що утворюються за ОС, протидіють взаємодії анальгетиків (АНГ) з біомембранами

активності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) як у сироватці крові, так і в еритроцитах (таблиця) та головному мозку піддослідних тварин (рис. 2), що характерні для оксидативного стресу. При цьому спостерігається суттєва активація процесів обмеженого протеолізу, а також збільшення вмісту в крові окремих фракцій середньо-молекулярних пептидів.

Методом флуоресцентного зондування були виявлені біофізичні зміни мембран, що можуть бути наслідком адсорбції олігопептидів на мембранах еритроцитів [14]. За умов больового синдрому спостерігається також зростання величини позитивного заряду поверхневих ділянок мембран еритроцитів, на що вказує збільшення майже в два рази значень константи зв'язування 1,8-АНС та ущільнення структури білкових мембранних молекул, про що свідчить зниження значень констант Штерна-Фольмера.

Разом з тим, як свідчать результати, наведені на рисунках 3 і 4, введення тваринам з БС потужного антиоксиданта α -токоферолу певною мірою зменшувало вираженість больового синдрому,

Таблиця

Активність ПОЛ в мембранах еритроцитів щурів за гострого больового синдрому

Групи тварин	Швидкість накопичення МДА, мкмоль/мг протеїну		
	НЗП	АЗП	НК
Контроль	313,0 $\pm$ 32,3	29,7 $\pm$ 9,2	28,4 $\pm$ 5,7
ГБС	340,6 $\pm$ 25,3	42,2 $\pm$ 5,1	35,1 $\pm$ 4,6

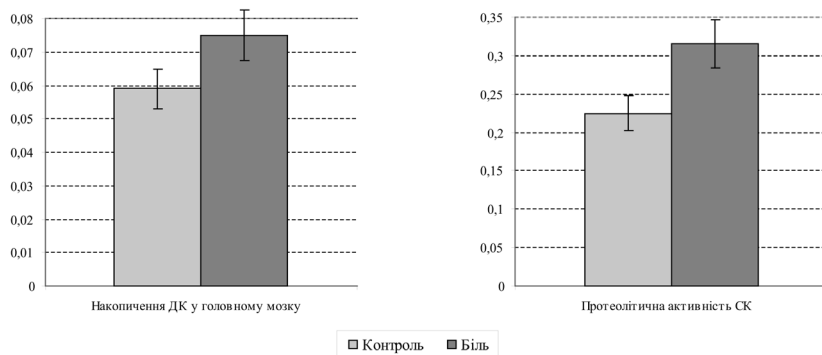


Рис. 2. Активність ліпореокиснення та обмеженого протеолізу в головному мозку щурів за умов ГБС (ДК – дієнові кон'югати, СК – сироватка крові)

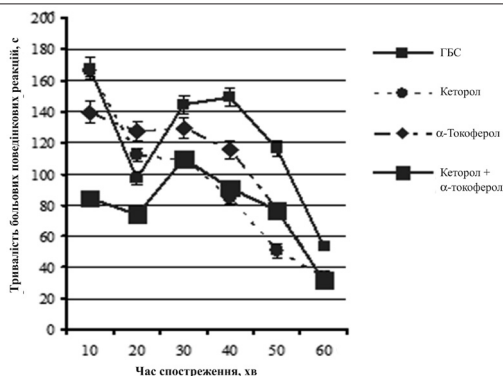


Рис. 3. Динаміка інтенсивності больової реакції при застосуванні кеторолаку, α-токоферолу та комплексу анальгетика з антиоксидантом

контрольованого як за поведінковими реакціями, так і виходячи з рівня порушення показників ліпореокиснення та біофізичного стану мембран еритроцитів. На підставі проведених досліджень та аналізу існуючих літературних даних, запропоновано схему модулюючого впливу АО на розвиток структурно-функціональних порушень

у біомембранах при ОС, ініційованому розвитком больового синдрому (рис. 5).

У відділах біохімічної фармакології та фармакології протизапальних засобів ДУ «ІФТ НАМН України» проводяться подальші дослідження щодо впливу на вираженість фізіологічних та біохімічних змін при оксидативному стресі в тварин з больовим синдромом ЛІЗ та

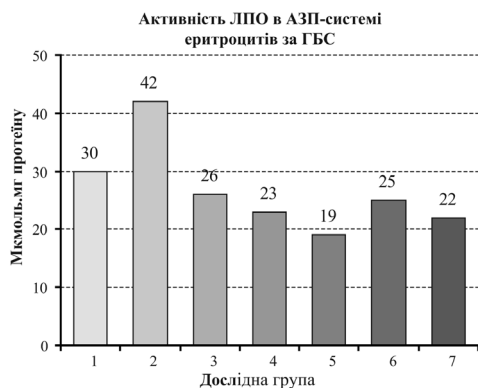
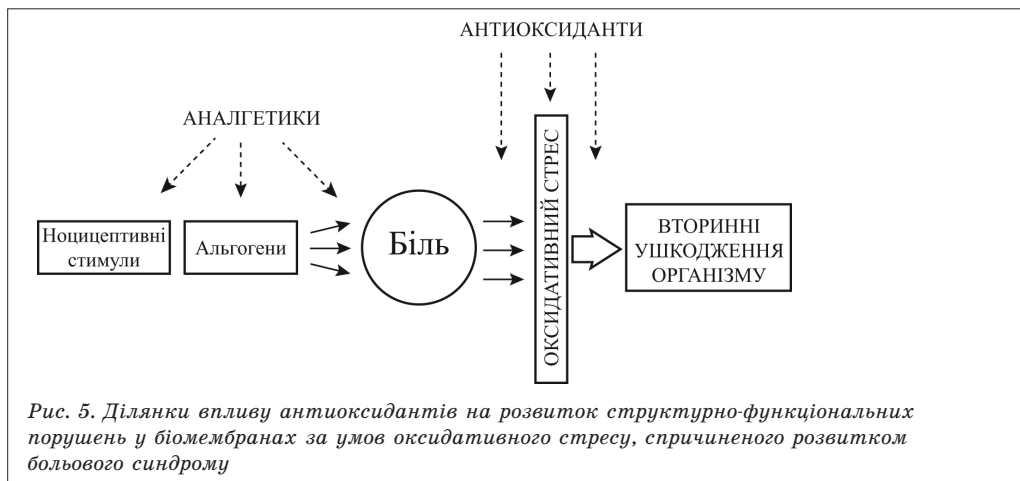


Рис. 4. Вплив АО на активність ліпореокиснення у неферментативній системі ПОЛ еритроцитів за ГБС: 1 – контроль; 2 – ГБС; 3 – ГБС + мексидол; 4 – ГБС + кверцетин; 5 – ГБС + α-токоферол; 6 – ГБС + кеторолак; 7 – ГБС + α-токоферол + кеторолак



ФАС з класів ненаркотичних анальгетиків та НПЗЗ, а також модифікуючого впливу щодо означених процесів сполук антиоксидантної дії. Отримані результати, що свідчать про зменшення інтенсивності патофізіологічних стресорних реакцій, які супроводжують синдром гострого болю, за умов попереднього введення ЛЗ антиоксидантної дії, зокрема α -токоферилацетату, відповідають існуючим даним літератури [5, 15], які

вказують на перспективність застосування антиоксидантів у комплексі з анальгетиками як засобів контролю важкого болю. Означене робить також необхідним виконання подальших поглиблених досліджень молекулярних і клітинних механізмів реакції цілісного організму на потужний біль, зокрема особливостей розвитку оксидативного стресу за умов гострого (запального) та хронічного нейропатичного болю.

1. Basbaum A. I. The perception of pain: Kandel E. R., Schwartz J., Jessell T., editors. Principles of Neuroscience / A. I. Basbaum, T. Jessell. – New York: Epplenton and Lange; 2000. – P. 472–491.
2. Cellular and Molecular mechanisms of pain / Basbaum A. I., Bautista D. M., Scherrer G., Julius D. // Cell. – 2000. – V. 139, № 2. – P. 267–284.
3. Kidd B. L. Mechanisms of inflammatory pain / Kidd B. L., Urban L. A. // Brit. J. Anaesthesiol. – 2001. – V. 87, № 1. – P. 3–11.
4. Lee Y. Painful channel in sensory neurons / Lee Y., Lee Ch., Oh U. // Mol. Cells. – 2005. – V. 20, № 3. – P. 315–324.
5. Боль: руководство для врачей и студентов / под ред. Н. Н. Яхно. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 304 с.
6. Губський Ю. І. Фармакотерапія в паліативній та хоспісній медицині. Клінічні, фармацевтичні та медико-правові аспекти: Монографія / Губський Ю. І., Хобзей М. К. – К.: Здоров'я, 2011. – 352 с.
7. Лечение болевого синдрома в онкологии: Ред. И. П. Шлапак, Е. А. Ярош / [Бобров О. Е., Брындинов Л. Н., Кравченко А. В. и др.]. – Ровно.: Каллиграф, 2003. – 196 с.
8. Онкология: под ред. Д. Касчиато; пер. с англ. – М., Практика, 2008. – 1039 с.
9. Donnelly, S. The Symptoms of Advanced Cancer / Donnelly, S., Walsh, D. // Seminal Oncology. – 1995. – V. 22 (2 Suppl.). – P. 67–72.
10. Бобров О. Е. Проблема обезболивания в паллиативной онкологии / Бобров О. Е. // Лекарь. – 2008. – № 6 (12). – С. 12–18.
11. Нормативно-правова база та застосування наркотичних (опіоїдних) анальгетиків в паліативній та хоспісній медицині в Україні: стан та проблеми / Губський Ю. І., Хобзей М. К., Царенко А. В., Бабійчук О. М. // Фармацевтичний журнал. – 2011. – № 1. – С. 3–9.
12. Паллиативная помощь онкологическим больным: под ред. Г. А. Новикова, В. И. Чиссова. – М.: ООД «Медицина за качество жизни», 2006. – 192 с.
13. Застосування лікарських засобів у паліативній геріатрії: фармакологічні та медико-правові аспекти / Губський Ю. І., Бухтіарова Т. А., Марченко О. М. [та ін.] // Проблемы старения и долголетия. – 2010. – Т. 10, № 3. – С. 268.
14. Вивчення біохімічних та структурно-динамічних параметрів мембран еритроцитів за умов гострого больового синдрому та дії кеторалаку і α -токоферолу ацетату / Губський Ю. І., Бухтіарова Т. А., Горюшко Г. Г. [та ін.] // Медична і клінічна хімія. – 2012. – Т. 53, № 4. – С. 5–11.
15. Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgetics / Rokyta R., Holcecek V., Pekarkova I. [et al.] // Neuroendocrinology Letters. – 2003. – V. 24, № 5. – P. 172–176.

В. И. Мамчур

Два препарата, один организм – механизмы взаимодействий при коморбидной патологии

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Классическая фармакология – это, как известно, медико-биологическая наука о действии лекарственных средств (ЛС) (а также всего того, что претендует на роль лекарства) на организм (т.е. на «живое» *in vivo* и *in vitro*), а также о взаимодействии лекарственного препарата и организма между собой.

Однако сегодня уже очевидно – мы с Вами не становимся моложе, да и человечество в целом стареет. Болезнь, еще болезнь, еще... и диагноз уже в 3–5 этажей. Назначили 2–3 препарата, затем еще 3–4, потом добавили лекарств еще из нескольких фармакотерапевтических групп. Возникает проблема коморбидности (полиморбидности) и полифармации. С точки зрения фармакологии сегодня – это механизмы взаимодействий уже нескольких препаратов с организмом, у которого уже несколько нозологий.

Коморбидность (лат. «morbus» – болезнь) – наличие двух или нескольких самостоятельных заболеваний или синдромов у одного и того же пациента. Может быть связана с единой причиной или едиными механизмами патогенеза этих состояний, или совпадающих во времени (напр.: паркинсонизм и болевой синдром [1, 2], депрессия и боль [3, 4], эпилепсия и болевой синдром... [5, 6].).

Полифармация или полипрагмазия (от лат. «polypragmasia») – чрезмерное назначение многочисленных и разнообразных по механизму действия лекарственных средств (даже противоположного действия) в одно и то же время при одном и том же заболевании или нескольких заболеваниях (или симптомах), результатом которого может быть выраженное изменение и даже извращение активности препаратов, увеличение риска возникновения побочных реакций.



Профессор В. И. Мамчур

Итак, проблема существует. На наш взгляд, наиболее продуктивны следующие возможности ее решения:

во-первых, искать и искать новые молекулы с полифункциональными свойствами или с базовым свойством общим для различных заболеваний; использовать уже существующие лекарственные препараты, учитывая общие (как правило, неспецифические) звенья, (моменты, стадии) патогенеза различных заболеваний (напр., антиоксиданты, антигипоксанта, противовоспалительные средства и др.) [7];

во-вторых, обосновывать и создавать новые сочетания лекарственных средств (ЛС+ ЛС+ ЛС+ ЛС+ ...) разных фармакотерапевтических групп (не путать с при этом с полифармацией или полипрагмазией);

в-третьих, предлагать рациональные сочетания двух, трех и более лекарственных препаратов = путь (!?!) и возможности (!?!) создания в одной лекарственной форме комбинированного лекарственного средства.

Рациональные лекарственные комбинации – комбинации, в которых препарат одной группы усиливает необходи-

мый эффект и не увеличивает, а, возможно, даже уменьшает нежелательное действие препарата другой группы. «Время монотерапии закончилось, по крайней мере для пациентов группы высокого риска. В XXI столетии комбинации соревнуются между собой» (G. I. Bakris из статьи Г. В. Дзяк, 2008).

Показать эти интереснейшие взаимоотношения в современных условиях «полиморбидность – полифармация» или «два препарата, один организм – механизмы взаимодействий при коморбидной патологии» нам бы хотелось на примерах собственных исследований – «боль – анальгетики» в условиях экспериментальных эквивалентов «депрессия – антидепрессанты», «эпилепсия – противосудорожные», «паркинсонизм – антипаркинсонические средства».

В условиях «экспериментальных эквивалентов депрессии» (модель Порсолта или вынужденное плавание; резерпиновая модель и тест «Tail suspension») [8–10] НПВС усиливают своё болеутоляющее действие, но проявляют:

а) продепрессивную активность (мелоксикам, 1 мг/кг);

б) нейтральны (метамизол, 100 мг/кг; амизон, 150 мг/кг и мелоксикам, 2 г/кг; диклофенак, 10 мг/кг) и

в) антидепрессивную активность (парацетамол, 300 мг/кг; целекоксиб, 25 и 50 мг/кг; диклофенак, 20 мг/кг) [11].

Нашими исследованиями установлено, что в условиях моделируемой депрессии использование и антидепрессантов (как средств базовой антипаркинсонической терапии – амитриптилин, эсциталопрам и милнаципран), и анальгетиков (с антидепрессивными свойствами – парацетамол, целекоксиб, диклофенак), именно комбинация амитриптилин + целекоксиб = «амитрикси» проявляет наиболее выраженный антидепрессивный и антиноцицептивный эффекты [12].

При повышенной судорожной готовности мозга или в условиях «экспериментальных эквивалентов эпилепсии»: МЭШ (Я. Буреш, 1991), аудиогенные судороги у крыс (Р. И. Кругликов,

1970; Л. В. Крушинский, 1960), пентилентетразоловые судороги (Г. Н. Крыжановский, А. А. Шандра, 1985), тиосемикарбазидные судороги (М. Е. Barton, 2001), фармакорезистентная «эпилепсия» (J. A. Ferrendelli, 1999), «раскачка» гиппокампа у кроликов (Ю. Г. Григорьев, 1984; Г. Н. Крыжановский, 1987) у животных наблюдалось снижение болевой чувствительности [13].

Анальгетики – морадол, промедол, трамадол, индометацин, 5 мг/кг и бруфен, 50 мг/кг в среднем в 1,5 раза усиливают свое антиноцицептивное действие у животных с экспериментальными моделями судорог; метамизол, индометацин, 10 мг/кг, наоборот, ослабляют (в среднем в 2 раза); анальгезирующее действие клонидина остается без изменений.

Исследование влияния анальгетиков на характер судорожной активности позволило разделить их на две группы:

а) провоцирующие судороги (проконвульсивный эффект) – морадол, промедол, трамадол, индометацин, 5 мг/кг, бруфен, 50 мг/кг, а также – кетопрофен, диклофенак, кеторолак, трамадол);

б) ограничивающие распространение судорожных разрядов (антиконвульсивный эффект) – метамизол, индометацин, 10 мг/кг, а также в меньшей степени парекоксиб, целекоксиб, парацетамол, лорноксикам, анальбен, бензофуракаин [14, 15].

Показано, что если состояние повышенной судорожной готовности снижает перцепцию боли, то противоэпилептические препараты в этих условиях, уменьшая пароксизмальную активность, нивелируют антиноцицептивное действие анальгетиков. В свою очередь, обезболивающие средства, оказывая просудорожное влияние, ослабляют эффективность антиконвульсантов.

При комбинированном (последовательном) введении антиконвульсантов и анальгетиков с протисудорожным компонентом действия последние значительно утрачивают свои антиноцицептивные свойства, а следовательно, и свою эффективность [16].

Таким образом, это дает основание для рекомендации ограничения приме-

нения анальгетиков у больных эпилепсией только короткими курсами. При хроническом болевом синдроме в схему анальгезирующей терапии показано введение антиоксидантов, в частности тиотриазолина.

Новый композиционный препарат «Карбатрил» (карбамазепин, 150 мг + тиотриазолин, 100 мг) повышает эффективность болеутоляющей терапии и фармакотерапии эпилепсии [17].

В условиях экспериментальной каталепсии (акинетико-ригидная форма паркинсонизма – модели медикаментозной, то есть галоперидоловой и трифтазиновой каталепсии) и экспериментального тремора (треморная форма паркинсонизма – модель ареколинового тремора) обезболивающий потенциал НПВС и ННА не меняется [18].

Установлено, что между анальгетиками и противопаркинсоническими препаратами наблюдается фармакодинамический антагонизм, который проявляется ослаблением противопаркинсонической активности, сохранением антиноцицептивного потенциала анальгетиков с преимущественно с центральным компонентом болеутоляющего действия (парацетамол, метамизол и кеторалак) и фармакодинамический синергизм, который проявляется усилением противопаркинсонического и болеутоляющего действия леводопы и амантадина при совместном использовании с селективными ингибиторами ЦОГ-2 (мелоксикам, целекоксиб и парекоксиб) [19].

При дофаминергическом дефиците, вызванном 20-дневным введением галоперидола (0,5 мг/кг) (акинетико-ригидная форма паркинсонизма), показана позитивная динамика при использовании селективных ингибиторов ЦОГ-2 совместно с леводопой, которые нивелируют токсическое действие последней по показателям свободно-радикального действия в структурах мозга (кора, ствол и мозжечок): введение леводопы способствовало достоверному (в 2 раза) снижению повышенного уровня МДА в коре в условиях моделируемой патологии при добавлении парекоксиба и в 1,2 раза при добавлении целекоксиба [20].

Несмотря на то, что в клинических ситуациях возможен выбор различных болеутоляющих средств, нами выделены наиболее безопасные и эффективные анальгетические средства в зависимости от базовой антипаркинсонической терапии. А наличие у антипаркинсоников антиоксидантных свойств, а также эксперименты с совместным введением известных антиоксидантов, позволили запатентовать комбинацию – лидер «Бромотрил» (бромокриптин + тиотриазолин).

В условиях приема леводопосодержащих препаратов рекомендовано использовать селективные ингибиторы ЦОГ-2 (целекоксиб и парекоксиб), на фоне введения бромкриптина достаточно эффективен и безопасен – парацетамол, совместно с амантадином позитивный эффект оказывает мелоксикам. При этом данные композиции проявили усиление противопаркинсонического действия в сравнении с монотерапией антипаркинсониками и сохранение выраженного антиноцицептивного действия на различных моделях болевого раздражения. Композиции мелоксикам и целекоксиб с леводопой также проявили повышение эффективности антипаркинсонической терапии в условиях индуцированного МФТП – паркинсонизма (эквивалент смешанной акинетико – ригидно – треморной формы паркинсонизма) [21, 22].

Показано, что в патогенезе паркинсонизма важную роль играет повышенный уровень продукции гомоцистеина (гипергомоцистеинемия), которая является фактором риска сосудистых заболеваний и деменции, присущие паркинсонизму сосудистого генеза. При этом по данным литературных источников и результатам проведенных исследований установлено, что терапия леводопосодержащими средствами способствует увеличению уровня гомоцистеина, что лежит в основе ряда побочных эффектов длительной антипаркинсонической терапии. Показано, что добавление к леводопе целекоксиба нивелирует проявления гипергомоцистеинемии, зарегистрировано увеличение содержания H_2S в сыворотке крови на 60 %, что почти в 3 раза ниже показателей

группы контроля и увеличение активности цистатион – γ – лиазы (в 1,3 раза) и цистатион – β – синтазы (в 2,1 раза) в тканях мозга в сравнении с показателями группы контроля, которые принимают участие в метаболизме серосодержащих соединений [23, 24].

На основании фармакологических, физиологических, биохимических, патоморфологических исследований доказана эффективность и безопасность совместного применения леводопы с целекоксибом при паркинсонизме, сопровождающимся болевым синдромом миофасциального генеза.

Результаты исследования фармацевтического взаимодействия комбинации – лидера «Ледоксиб» (леводопы/карбидопы + целекоксиб) показали, что биоминеральными леводопы является дофаминовые рецепторы D (1A) и D (2A), карбидопы – ароматическая L –аминокислотная декарбоксилаза, а целекоксиб – простагландин G/H синтаза – 2, и 3 – фосфоинозит зависима протеинкиназа, что позволяет констатировать отсутствие фармакодинамического взаимодействия, так как их действие опосредовано разными рецепторами и доказана возможность совместного использо-

вания. Результаты исследования, в частности, позволили сделать вывод, что леводопосодержащий препарат (леводопы/карбидопы) совместно с целекоксибом также может повышать эффективность терапии болевого синдрома и улучшать фармакотерапию паркинсонического синдрома.

Совершенно невозможно представить решение разрабатываемой нами проблемы без многолетнего творческого сотрудничества с ведущим фармхимиком Украины профессором И. А. Мазуром (Запорожский государственный медицинский университет). Например, найдены, предложены, изучены, запатентованы новые композиции «Теоаспекард» (тиотриазолин+ аспирин (кардио), «Карбатрил» (карбамазепин+ титотриазолин), «Индотрил» (Индометацин + Тиотриазолин), «Бромотрил» (Бромокриптин + Тиотриазолин) и некоторые другие.

Таким образом, уверены, что фармакология будущего – это поиск и разработка комбинированных лекарственных препаратов и всестороннее исследование их взаимодействий с организмом в условиях полиморбидной патологии.

1. Letro G. H. Pain in Parkinson's disease / G. H. Letro, E. M. A. B. Quagliato, M. A. Viana // *Arq. Neuropsiquiatr.* – 2009. – V. 67, № 3 – А. – P. 591–594.
2. Экстрапирамидные расстройства: руководство по диагностике и лечению / под ред. В. Н. Штока, И. А. Ивановой-Смоленской, О. С. Левина. – М.: Медпресс-информ, 2002. – 608 с.
3. Вознесенская Т. Г. Хроническая боль и депрессия / Т. Г. Вознесенская // *Фарматека.* – 2008. – № 6, №10 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.pharmateca.ru/magazines/source/2008/06/
4. Robinson M. J. Depression and pain / M. J. Robinson, S. E. Edwards, S. Iyengar [et al.] // *Front. Biosci.* – 2009. – V. 14. – P. 5031–5051.
5. Древаль О. Патогенетическое обоснование нейропротективной профилактики нейрогенного болевого синдрома / О. Древаль, М. Рябыкин // *Боль.* – 2005. – № 1 (6). – С. 54–57.
6. Опришко В. И. Антиоксидантна модуляція фармакологічної активності анальгетичних та протисудомних засобів / В. И. Опришко // *Дис. на соиск. уч. степ. д-ра мед. наук.* – Киев, 2010. – 560 с.
7. Биалер М. Взаимодействие лекарственных препаратов при лечении эпилепсии / М. Биалер // *Неврология и психиатрия.* – 2005. – № 9. – С. 59–65.
8. Porsolt R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // *Nature.* – 1977. – V. 266. – P. 730–732.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева. – М.: 2005. – С. 244–253.
10. Greenshaw A. J. Animal models for assessing anxiolytic, neuroleptic and antidepressant drug action / A. J. Greenshaw, T. V. Nguyen, D. J. Sanger [et al.] // *Neuromethods.* – 1988. – V. 10. – P. 379–427.
11. Pelissolo A. Depression and pain: prevalence and clinical implication / A. Pelissolo // *Presse. Med.* – 2009. – V. 38, № 3. – P. 385–391.
12. Хомяк О. В. Вплив анальгетиків, антидепресантів та їх комбінацій на зміни показників активності структур центральної нервової системи у тварин з моделюваною депресією / О. В. Хомяк, В. І. Опришко // *Морфологія.* – 2012. – Т. 6, № 2. – С. 50–54.

-
13. Доклінічне вивчення специфічної активності потенціальних протисудомних препаратів: [Методичні рекомендації]; під ред. акад. Головенко М. А., проф. Громов Л. О. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2003. – 46 с.
 14. *Опришко В. І.* Експериментальне дослідження впливу неопіоїдних анальгетиків і нестероїдних протизапальних засобів на судомну готовність мозку / В. І. Опришко // Одеський медичний журнал. – 2009. – № 5 (115). – С. 32–36.
 15. *Опришко В. І.* Вплив комбінованого введення габапентину та анальгетиків на больовий синдром при підвищеній судомній готовності мозку / В. І. Опришко // Медичні перспективи. – 2009. – Т. 14, № 3. – С. 17–22.
 16. *Опришко В. І.* Фармакологічні аспекти співвідношення ноцицептивної та конвульсантної активності / В. І. Опришко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 5–6 (6–7).
 17. Пат. 2361591 Российская Федерация, МПК7 А 61 К 31/55, А 61 К 31/4196, А 61 Р 25/08, А 61 Р 25/24. Противосудорожное лекарственное средство / Опришко В. И., Мамчур В. И., Мазур И. А., Беленичев И. Ф., Марценюк В. П., Грошевой Т. А., Зленко Е. Т., Куник А. В., Хомяк Е. В., Кравченко К. А.; заявитель и патентообладатель ООО "НПО "Фарматрон" (Украина). – № 2007136727/15 ; заявл. 03.10.2007 ; опубл. 20.07.2009, Бюл. № 20.
 18. Алгоритм доклінічної оцінки (загальна фармакологія, специфічна активність) антипаркінсонічних засобів. Методичні рекомендації / В. Й. Мамчур, О. В. Макаренко, С. М. Дронов. – Київ, 2009. – 21 с.
 19. *Макаренко О. В.* Леводоба: можливі знеболюючі властивості у комбінації з ненаркотичними анальгетиками / В. Й. Мамчур, О. В. Макаренко // Вісник Вінницького національного університету. – 2008. – Т. 12, № 2 – С. 348–351.
 20. *Макаренко О. В.* Знеболююча терапія ненаркотичними анальгетиками на фоні леводопотерапії за умов змін нейросинаптичної передачі при експериментальному паркінсонізмі / О. В. Макаренко, В. Й. Мамчур, С. М. Дронов // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 34–38.
 21. *Макаренко О. В.* Вибір знеболюючого засобу при паркінсонізмі за умов леводопотерапії / О. В. Макаренко // Медичні перспективи. – 2009. – № 2, Т. 14. – С. 22–28.
 22. *Макаренко О. В.* Оцінка болезаспокійливої терапії НПЗП при експериментальному паркінсонізмі на фоні терапії бромкриптином (досвід власних досліджень) / О. В. Макаренко // Запорозький медичний журнал. – 2009. – № 2, Т. 11. – С. 25–28.
 23. *Макаренко О. В.* Вплив гідрогенсульфіду та тіолактону гомоцистеїну на феноменологію експериментального паркінсонізму та комбінованої терапії / О. В. Макаренко // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2010. – № 1 (17). – С. 83–86.
 24. *Макаренко О. В.* Активність ферментів метаболізму сірковмісних сполук в організмі щурів за умов експериментального еквівалента паркінсонізму на фоні терапії леводопою з целекоксибом / О. В. Макаренко // Журнал АМН України. – 2010. – Т.16, № 2. – С. 334–342.

Методология тестирования противоопухолевой активности фармакологических препаратов на нефросубкапсулярных ксенографтах у мышей

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ
имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины», г. Киев

В истории фармакологии, как и других отраслях науки, известны эпизоды, когда выбор неадекватных методов и недостаточно критическое отношение к полученным результатам приводили к ошибочным выводам. Поэтому валидация методов оценки специфической активности и безопасности потенциальных лекарственных средств имеет первостепенное значение. Этот постулат относится и к поиску средств лечения злокачественных новообразований.

Подобно другим лекарственным средствам, создание противоопухолевых препаратов проходит длительный путь. Как правило, первичный скрининг потенциальной действующей субстанции, предложенной на основании компьютерного моделирования (*in silico*) при помощи программы SAR (structure-activity relationships) или других программ, проводится на культурах клеточных опухолевых линий. Ввиду того, что для роста раковой опухоли значение имеют ее микроокружение, развитие кровеносных сосудов, эпителиально-стромальные взаимоотношения, а стромальные элементы и сосуды в клеточных линиях рака отсутствуют, полученные результаты не могут быть непосредственно приложимы к опухоли, растущей в организме. Поэтому в случае выявления противоопухолевой активности *in vitro* тестирование продолжается в экспериментах *in vivo*.

В экспериментальной онкологии существует множество «животных» моделей спонтанных, индуцированных и перевивных злокачественных опухолей (рак, саркома и др.), на которых можно наблюдать особенности их развития, прогрессирования, метастазирования, динамику неоваскулогенеза, воспаления, гипоксии



Академик НАМН Украины
А. Г. Резников

и прочих факторов микроокружения. Известно, например, что гормонозависимые аденокарциномы – рак простаты, грудной железы, матки – эволюционируют от стадии чувствительности к гормональной терапии до гормон-резистентного состояния, когда возникает необходимость в назначении цитотоксической химиотерапии и других негормональных методов лечения. Однако с целью сокращения сроков фармакологического тестирования и приближения к реальному объекту проводятся исследования на модели ксенографтов первой генерации раковой ткани человека у лабораторных животных, например, мышей [1]. Следует сразу оговориться, что данная модель может рассматриваться лишь как промежуточный этап между тестированием препаратов *in vitro* и исследованиями на долгоживущих опухолях.

С целью предотвращения цитотоксического иммунного ответа на гетеротрансплантацию и увеличения продолжительности жизни опухолевого трансплантата предпочтение отдают бести-

мусным (nude), облученным и другим иммунодефицитным мышам, например, получавшим циклоспорин или циклофосфамид [2, 3]. Сложность содержания таких животных, их дороговизна побудили обратиться к экспериментам на иммунокомпетентных мышах. К тому же утверждалось [4], что первичные хирургические экспланты в нефросубкапсулярном тесте чаще демонстрируют позитивный рост у иммунокомпетентных мышей (через 6 дней – в 82 % подсадов), чем у иммунодефицитных бестимусных мышей (через 11 дней – в 30 % подсадов). Оценка пригодности иммунокомпетентных мышей для изучения противоопухолевой активности препаратов оказалась неоднозначной [3–5], что и побудило нас провести ретроспективный анализ результатов собственных исследований [6–8].

Тестирование противоопухолевой активности препаратов проводили на ксенографтах рака предстательной железы человека, идентифицированного патоморфологом как аденокарцинома. В 80–85 % случаев она проявляет чувствительность к стимулирующему действию андрогенов. В качестве реципиентов ксенографтов использовали самцов иммунокомпетентных мышей линии СВА, которых содержали в виварии института на стандартном пище-

вом рационе. Все манипуляции с ними выполняли с соблюдением норм «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986), и национальных рекомендаций по биоэтике. Источником раковой ткани служили фрагменты опухоли, полученной после радикальной простатэктомии (д. м. н. В. Н. Григоренко), с обязательным получением информированного согласия пациентов. Для трансплантации нарезали кусочки со средней массой $0,99 \pm 0,01$ мг, под капсулу левой почки подсаживали по два кусочка. Тестируемые препараты начинали вводить ежедневно после трех дней роста ксенографтов, через 24 ч после последнего введения животных декапитировали, ксенографты извлекали, взвешивали и результаты сравнивали со средним приростом массы в контрольной группе, принятым за 100 %. Часть мышей-реципиентов кастрировали до подсадки раковой ткани. Торможение роста ксенографтов у них свидетельствовало о принадлежности опухоли к андрогензависимому варианту.

Гистологические и гистохимические исследования включали световую микроскопию препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, оценку апоптоза по наличию апоптотных

Таблица 1

Влияние разных доз флутамида на рост нефросубкапсулярных ксенографтов рака простаты человека у самцов мышей СВА

Условия опыта	Кол-во ксенографтов	Прирост массы, ($M \pm m$) мг	Процент от прироста в контроле	Гистологические признаки атрофии и деструкции опухоли (баллы)	Эпителиально-стромальное соотношение, ($M \pm m$), (n)
Контроль	49	$0,82 \pm 0,08$	100	1	$0,44 \pm 0,04$ (n = 39)
Флутамид 2,5 мг/кг	12	$0,11 \pm 0,12^*$	13,4	2	$0,39 \pm 0,07$ (n = 8)
Флутамид 5 мг/кг	12	$0,15 \pm 0,07^*$	18,3	3	$0,35 \pm 0,03^*$ (n = 13)
Флутамид 10 мг/кг	20	$0,35 \pm 0,08^*$	42,7	4	$0,32 \pm 0,04^*$ (n = 15)
Флутамид 25 мг/кг	6	$0,72 \pm 0,22$	87,8	5	$0,22 \pm 0,04^*$ (n = 6)

Примечание. Здесь и в табл. 2: $*P \leq 0,05$ в сравнении с контрольной группой; n – количество ксенографтов.

телец, разрывам концевых отделов нитей ДНК (метод TUNEL), вычисление соотношения площадей, занятых эпителием и стромой, при помощи компьютерной программы Adobe Photoshop CS3 после окрашивания на выявление соединительной ткани (коллагеновых волокон) по методу Маллори. Степень дегенеративно-атрофических изменений оценивали по пятибалльной шкале.

Весьма показательны результаты тестирования способности флутамида задерживать рост и вызывать деструктивно-атрофические изменения в ксенографтах рака предстательной железы человека (табл. 1). (Флутамид является нестероидным антагонистом андрогенных рецепторов, он широко применяется с целью андрогенной депривации в качестве средства лечения рака простаты и его метастазов [9].)

Мышам-реципиентам ежедневно, в течение трех дней (4–6 дни роста), вводили *per os* при помощи желудочного зонда таблеточную массу препарата Флутафарм (ВАТ «Фармак»), содержащего флутамид, в геле Дорфмана. Доза флутамида в разных группах варьировала от 2,5 до 25,0 мг/кг.

Исследование антиандрогенной активности флутамида на вентральной доле предстательной железы крыс в стандартном тесте Хершбергера и на половозрелых животных демонстрирует отчетливую прямую зависимость степени атрофии органа-мишени от дозы [10]. Поэтому неожиданностью оказалось не только отсутствие прямой зависимости прироста массы ксенографтов от дозы флутамида, но, напротив, обратно пропорциональная зависимость. Однако результаты гистологического и гистохимического исследования ксенографтов привели к противоположным выводам относительно влияния флутамида на рост опухоли.

Прежде всего, следует обратить внимание на то, что в большинстве препаратов в краевой зоне ксенографтов контрольной и опытных групп виден грануляционный вал (лимфоидная инфильтрация). В центральной зоне малигнизированные эпителиоциты выстилают ациноподобные структуры в виде многослойного эпителия. Клетки

имеют преимущественно веретенообразный вид и большие овальные ядра с ядрышком. Визуально иногда определяется увеличение площади соединительной ткани, особенно при максимальной дозе антиандрогена. Обычно при этом имеет место слабая или умеренная лейкоцитарная инфильтрация стромы и эпителия.

По мере увеличения дозы флутамида возрастали выраженность дегенеративно-атрофических изменений эпителиоцитов и количество апоптозных телец, разрыхление многослойного эпителия и его отслойка от базальной мембраны ацинусов, увеличение периацинарных и перичеселлюлярных пространств. Соответственно, эпителиально-стромальное соотношение уменьшалось с увеличением дозы флутамида. Чем большей была доза флутамида, тем сильнее были выражены признаки отека стромы. Вероятной причиной этого является увеличение онкотического давления в тканях вследствие присутствия белковых продуктов клеточного дегрита.

Таким образом, результаты гистологического исследования ксенографтов однозначно свидетельствуют, во-первых, о чувствительности ксенографтов рака простаты человека к фармакологической блокаде стимулирующего влияния тестостерона, секретируемого семенниками мыши-реципиента, и, во-вторых, о прямой зависимости противоопухолевого эффекта флутамида от дозы антиандрогена. Что касается неадекватности полученных результатов измерения массы ксенографтов, то они объясняются тем, что противоопухолевый эффект маскируется отеком и лейкоцитарной инфильтрацией как проявлением иммунной воспалительной реакции.

Отсутствие прямой зависимости уменьшения конечной массы ксенографтов от дозы тестируемого препарата наблюдалось и при введении рекомбинантного белка ЕМАР-II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) – провоспалительного цитокина с антиангиогенной активностью.

ЕМАР-II – это мультифункциональный белок, который возникает в злокачественных опухолях млекопитающих

в результате альтернативного сплайсинга и посттрансляционного процессинга из его предшественника – белка р43, являющегося фрагментом тирозил-тРНК-мультисинтезного комплекса [11]. При повреждении тканей он выходит из клеток в межклеточное пространство и выступает в роли одного из медиаторов воспаления, привлекая нейтрофилы и моноциты в зону повреждения и повышая чувствительность тканей к фактору некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа). Кроме того, цитокин усиливает апоптоз и тормозит неоваскулогенез, что является одним из механизмов его противоопухолевого действия. Имеется синергизм в действии ЕМАР-II и ФНО-альфа на апоптоз, что связано с реализацией эффекта через один и тот же фермент – протеинкиназу JNK, а также с ингибированием в определенных концентрациях экспрессии VEGF в опухолевой ткани. Ранее нами была продемонстрирована способность ЕМАР-II вызывать дегенеративно-воспалительные и проапоптотические эффекты в ксенографтах рака простаты человека, то есть, в отсутствие функционирующих кровеносных сосудов [7].

В опытах использовали рекомбинантный ЕМАР-II, полученный чл.-корр. НАН Украины А. И. Корнелюком (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины). Схема тестирования была такой же, как и при изучении эффектов флутамида. Раствор ЕМАР-II вводили мышам-реципиентам подкожно, один раз в сутки.

Влияние минимальной дозы белка (1,0 мкг/кг м.т.) в отношении конечной массы ксенографтов намного превосходило эффект кастрации. Фактически при всех изученных дозах, за исключением 200,0 мкг/кг м.т., получено полное или почти полное торможение роста ксенографтов, если судить по конечной массе (табл. 2). Парадоксальным образом максимальная доза не только не снизила прирост массы ксенографтов, но даже превысила его в контрольной группе в процентном выражении. Вероятнее всего, это связано с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией тканей.

При гистологическом и гистохимическом исследовании наблюдалась зависимость выраженности дегенеративных изменений малигнизированного ацинарного эпителия от дозы в диапазоне 10,0–200 мкг/кг м.т. Образовавшиеся

Таблица 2

Влияние кастрации и разных доз рекомбинантного цитокина ЕМАР-II на рост нефросубкапсулярных ксенографтов рака простаты человека у самцов мышей СВА

Условия опыта	Кол-во ксенографтов	Прирост массы, (M ± m) мг	Процент от прироста в контроле	Гистологические признаки атрофии и деструкции опухоли, баллы	Эпителиально-стромальное соотношение, (M ± m), (n)
Контроль	81	0,94±0,09	100	1	0,43 ± 0,04 (n = 47)
Кастрация	50	0,32±0,07*	34,0	3	-
ЕМАР-II 1,0 мкг/кг	14	0,06±0,04*	6,4	3	0,31 ± 0,06 (n = 7)
ЕМАР-II 5,0 мкг/кг	36	0,18±0,05*	18,1	3-4	-
ЕМАР-II 10,0 мкг/кг	46	0,22±0,04*	23,4	3-4	0,32 ± 0,06 (n = 17)
ЕМАР-II 100,0 мкг/кг	52	0,37±0,05*	38,3	4	0,30 ± 0,08 (n = 9)
ЕМАР-II 200,0 мкг/кг	8	1,55±0,31	164,9	5	-

некротические массы скапливались в просвете ацинусов и протоков. Методом TUNEL обнаружено множество эпителиальных клеток в состоянии апоптоза. Уменьшение эпителиально-стромальных соотношений близко к уровню статистической достоверности, хотя и не демонстрировало зависимости от дозы ЕМАР-II в исследованном диапазоне 1,0–100 мкг/кг м.т.

Таким образом, при использовании иммунокомпетентных мышей-реципиентов для тестирования противоопухолевой активности фармпрепаратов суще-

ствует вероятность ошибочного заключения из-за возможного несоответствия изменений массы ксенографтов и их гистологического строения. Это предопределяет необходимость проведения гистологических исследований, что увеличивает продолжительность исследования и снижает ценность метода для экспресс-оценки противоопухолевой активности. Однако доступность и дешевизна иммунокомпетентных мышей, в сравнении с бестимусными животными, делают оправданным их использование.

1. Voskoglou-Nomikos T. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models / Voskoglou-Nomikos T., Pater J. L., Seymour L. // Clin. Cancer Res. – 2003. – V. 9. – P. 4227–4239.
2. Van Weerden W. M. Animal models in the study of progression of prostate and breast cancer to endocrine independency / Van Weerden W. M. // Mechanisms of progression to hormone-independent growth of breast and prostatic cancer. Ed. by Berns P. M. J. J., Romijn J. C., Schroder F. H. – New Jersey: Parthenon, 1991. – P. 55–70.
3. Bennett J. A. Evaluation of growth and histology of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of immunocompetent and immunodeficient mice / Bennett J. A., Pilon V. A., MacDowell R. T. // Cancer Res. – 1985. – V. 45. – P. 4963–4969.
4. Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice / Bogden A. E., Haskell P. M., LePage D. J. [et al.] // Exp. Cell Biol. – 1979. – V. 47, № 4. – P. 281–293.
5. Characteristics of human tumour xenografts transplanted under the renal capsule of immunocompetent mice / Aamdall S., Fodstad Q., Nesland J. M., Pihl A. // Br. J. Cancer. – 1985. – V. 51. – P. 347–356.
6. Динамика роста и патогистологическая характеристика опухолевых ксенографтов как объекта тестирования противоопухолевой активности препаратов / Полякова Л. И., Пристопок В. С., Чайковская Л. В., Резников А. Г. // Патология. – 2011. – Т. 8, № 3. – С. 51–54.
7. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model / Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I. // Exper. Oncol. – 2007. – V. 29, № 4. – P. 267–271.
8. Cooperative antitumor effect of endothelial-monocyte activating polypeptide II and flutamide on human prostate cancer xenografts / Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I. [et al.] // Exp. Oncol. – 2011. – V. 33, № 4. – P. 231–234.
9. Vozianov O. Androgen deprivation strategy in prostate cancer / O. Vozianov, A. Reznikov, I. Klimenko. – K.: Naukova Dumka, Ternopil: Ukrmedknyga, 2001. – 240 p.
10. Резников А. Г. Антиандрогены / А. Г. Резников, С. В. Варга – М.: Медицина, 1988. – 208 с.
11. Резников А. Г. Аминоацил-тРНК-синтетазы: новая перспектива иммуномодуляции, регенерации и противоопухолевой терапии / Резников А. Г., Корнелюк А. И. // Вісник фармакол. фармації. – 2008. – № 9. – С. 2–8.

А. И. Соловьев

Ионные каналы как фармакологические мишени. Время смены парадигм классической фармакотерапии

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

*То, что мы называем началом,
часто оказывается концом, и когда
что-то заканчивается, что-то
одновременно начинается.
Конец там, где начало.*
Т. Эллиот

Давно известно, что любой живой организм представляет собой сообщество различных клеток. Тело человека, например, состоит из приблизительно 100 трлн собственных клеток плюс неисчислимое множество (квадриллионы?!) бактерий, населяющих пищеварительный тракт. Клетки, являясь структурной и функциональной составляющей тканей и органов, контактируют с тканевой жидкостью, лимфой и плазмой крови и, очевидно, поэтому каждая клетка окружена (защищена) плазматической мембраной – оболочкой толщиной 7–10 нм, которая образована двойным молекулярным слоем, состоящим в основном из фосфолипидов.

В плазматическую мембрану встроено множество белковых структур. В клеточной мембране находятся рецепторы, воспринимающие внешние химические сигналы и обеспечивающие «общение» клетки с клетками-соседями, как близкими, так и далекими. Мембрану пронизывают также активные и пассивные транспортные комплексы, с помощью которых клетка обменивается веществом со своим окружением. В частности, среди них имеются так называемые ионные каналы, поры, образуемые трансмембранными белками, через которые ионы пассивно диффундируют в направлении меньшей концентрации. Обычно эти поры пропускают лишь определенные ионы, такие как калий, натрий или кальций.



Профессор А. И. Соловьев

Некоторые из ионных каналов сопряжены с собственными рецепторами.

Таким образом, в живых системах постоянно происходит сопряженный перенос вещества и информации через клеточные мембраны:

- например, растворимая в липидах (липофильная) сигнальная молекула (монооксид азота, NO) проходит через клеточную мембрану и активирует внутриклеточный «рецептор» (растворимую гуанилатциклазу), что приводит, в частности, к расслаблению сосудов и увеличению кровотока;

- сигнальная молекула (инсулин) связывается с трансмембранным рецептором и запускает цепь хорошо известных метаболических превращений;

- или, другая сигнальная молекула (ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) или глутамат) взаимодействует с соответствующим рецептором, связанным с ионным каналом. Ацетилхолин, связываясь с М- или Н-холинорецепторами, приводит к освобождению NO из эндотелиальных клеток (ЭК) и расслаблению подлежа-

щих гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов или же к сокращению гладких мышц, в том случае, когда медиатор действует прямо на ГМК (в случае повреждения эндотелиальной выстилки), снижению частоты сердечных сокращений, повышению секреции ряда желез и т. п.; ГАМК – является основным тормозным медиатором в нервной системе позвоночных; глутамат – обеспечивает процессы регуляции синаптической пластичности, то есть играет важную роль в обучении и запоминании/хранении информации;

- передача сигнала может также происходить через рецепторы, активирующие тот или иной внутриклеточный посредник (ангиотензин, cAMP, cGMP, IP₃, DAG:

1 этап – распознавание сигнальной молекулы рецептором;

2 этап – активизация вторичного посредника;

3 этап – модуляция активности ионного канала и/или;

4 этап – модуляция активности соответствующего фермента.

Основная проблема современной фармакотерапии заключается, прежде всего, в ее низкой эффективности, в лучшем случае (то есть, при соблюдении принципов доказательной медицины) < 60 %. Несмотря на наличие огромного арсенала лекарственных препаратов, заболеваемость и смертность от основных заболеваний сердечно-сосудистой системы, например, артериальной гипертонии, постоянно растут. Пациент вынужден принимать лекарственные препараты при гипертонии или диабете пожизненно, так как при их отмене болезнь, со всей ее симптоматикой, неизбежно возвращается. По сути дела, большинство лекарственных препаратов в настоящее время играют роль своеобразных «фармакологических костылей». Забрали «костыли» и человек падает.

Главными, но не единственными причинами этого печального явления являются – генетический полиморфизм пациентов и отсутствие достоверной информации о надлежащем образом идентифицированных фармакологических мишенях, то есть клеточных и

субклеточных структурах, являющихся триггерами патологического процесса. Иными словами, вопреки телевизионной рекламе, лекарство далеко не всегда точно попадает в цель,

Итак, в практике здравоохранения практически отсутствуют препараты направленного/таргетного действия. Что делать? Проблему генетического полиморфизма в настоящее время можно было бы решить довольно просто (современная наука позволяет сделать это), но это потребует от государства огромных дополнительных капиталовложений в медицину. Пока это не реально.

Поэтому сосредоточим свое внимание на фармакологических мишенях. Появление таргетных препаратов станет возможным только после детального изучения механизмов взаимодействия потенциального лекарственного препарата с его потенциальной фармакологической мишенью. Но для этого мишень еще необходимо идентифицировать в процессе детального изучения патогенеза заболевания на клеточном и молекулярном уровне. Только таким образом нам удастся в будущем реализовать мечту Пауля Эрлиха о «магической пуле» и перейти к низкодозовой таргетной фармакотерапии. А пока еще мы «стреляем» в мишень, а уже потом рисуем круг, принимая место попадания за центр.

Потенциальные (далеко не все!) фармакологические мишени клетки:

- рецепторы (и связанные с ними ионные каналы);

- ионные каналы и помпы/насосы клеточных мембран;

- митохондрии (в том числе митохондриальные поры и ионные каналы митохондрий);

- сократительный аппарат мышечных клеток;

- саркоплазматический ретикулум, например, лиганд (ip₃) – управляемые кальциевые каналы ретикулума;

- ферментативные системы клетки;

- гены (например, генная терапия при артериальной гипертонии – внедрение копий генов, ответственных за вазодилатацию, или использование так называемых антисмысловых РНК для

подавления трансляции или транскрипции генов, ответственных за продукцию вазоконстрикторов).

Большая проблема заключается еще и в том, что «фармакологическая мишень» так же неисчерпаема, как «атом». Как только исследователь установит, что мишенью является, например АТФ-зависимый калиевый канал, как встанет вопрос о том, какая именно его субъединица является мишенью и т. д., и т. п.

Почему это важно и для чего необходимо точно идентифицировать молекулу-мишень? Это нужно, прежде всего, для создания «ИДЕАЛЬНОГО» лекарственного препарата («магическая пуля» Paul Ehrlich). Только в таком случае обеспечивается гарантия доставки «письма адресату» и снижение числа и выраженности побочных эффектов. Повторюсь еще раз, только таким образом, изучив взаимодействие лекарственного препарата с идентифицированной надлежащим образом молекулой-мишенью, мы сможем перейти к низкодозовой таргетной терапии.

Теперь вернемся собственно к ионным каналам. Оказывается, каналы тоже болеют.

Каналопатии – болезни, вызванные нарушением функции субъединиц ионного канала или белков, регулирующих их деятельность. Они могут быть врожденными (вследствие мутации генов, кодирующих канал) или приобретенными, как, например, в результате аутоиммунной атаки на канал или воздействия токсиканта.

Для Украины по-прежнему остается актуальной проблема воздействия на организм ионизирующей радиации. И не только, и даже не столько из-за Чернобыля, как по причине широкого распространения онкологических заболеваний. Тысячи людей в ходе лечения подвергаются воздействию радиоизотопной и лучевой терапии и погибают еще до того, как эта терапия подействует, от развивающихся осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, которые сильно осложняют течение основного заболевания.

Сейчас мы уже твердо знаем, что одной из основных мишеней для дей-

ствия ионизирующего излучения являются сосуды и, прежде всего, их внутренняя выстилка, эндотелий. В результате воздействия ионизирующего излучения среди ликвидаторов Чернобыльской катастрофы широкое распространение получили заболевания сердечно-сосудистой системы, в частности, нарушения коронарного кровообращения и артериальная гипертензия. Ко всем бедам добавилось снижение чувствительности их сосудов к стандартным вазодилатирующим препаратам, например, нитроглицерину. Все это, вместо взятого, заставило нас взяться за изучение клеточных механизмов действия радиации на эффекторные элементы сосудистой стенки, исследовать пусковые факторы артериальной гипертензии и сосудистых дисфункций, индуцированных под воздействием ионизирующей радиации.

Было установлено, что калиевые каналы плазматической мембраны (ГМК) и эндотелиальных клеток (ЭК) сосудов, одним из основных подтипов которых являются так называемые Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}), играют определяющую роль в регуляции мембранного потенциала и, следовательно, уровня изометрического напряжения ГМК в условиях действия ионизирующей радиации, то есть именно они и являются основной мишенью ее действия в сосудистой стенке. Как впрочем, и в ЭК, где BK_{Ca} опосредовано через изменение уровня поляризации мембраны способствуют входу кальция, активации NO-синтазы и выделению NO.

Облучение крыс в нефатальных дозах до 6 Gy приводит к подавлению токов через BK_{Ca} в ГМК и ЭК (методика *patch-clamp*), снижению амплитуды эндотелий-зависимого расслабления (ацетилхолиновый тест) и увеличению реакции сосудов в ответ на действие агонистов α -адренорецепторов. Подавление функции BK_{Ca} коррелирует со снижением уровня экспрессии α - и β_1 -субъединиц канала (RT-PCR анализ). Результаты синхронной регистрации силы сокращения ГМК и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (флуоресцентный метод) свидетельствуют об увеличении коэффициента кальциевой чувстви-

тельности миофибрилл. Все эти факторы вместе взятые приводят к значительному приросту артериального давления (АД). Отмеченное нами компенсаторное увеличение активности и экспрессии других типов калиевых каналов, K_v , K_{ATP} , является, очевидно, резервным механизмом поддержания вазодилататорного потенциала в условиях оксидативного генотоксического стресса, вызванного облучением.

siRNA-индуцированный сайленсинг генов

Открытие явления РНК-интерференции ознаменовало появление новых перспектив для таргетной терапии и дало надежду на создание принципиально новых подходов к лечению ангиопатий различного генеза и артериальной гипертензии. Появился эффективный механизм для избирательного торможения экспрессии заданного гена на стадиях его трансляции или транскрипции.

Данная технология представляет собой один из высокоспецифичных современных методов целевой генотерапии, суть которого состоит в угнетении экспрессии определенного гена на стадии трансляции или в нарушении его транскрипции (пост-транскрипционный сайленсинг). Реализация этого процесса осуществляется с помощью коротких (21–23 нуклеотида) 2-х цепочечных интерферирующих РНК (siRNA), которые имея комплементарную последовательность к молекуле-мишени мРНК, активируют соответствующие внутриклеточные системы (DICER, RISC), с помощью которых и обеспечивается селективная деградация мишени.

Введение siRNAs, таргетных к *KCNMA1 (slo1)*, то есть гену кодирующему экспрессию BK_{Ca} , приводит к снижению экспрессии и функции канала и развитию сосудистой дисфункции, сходной по своим проявлениям с радиационным поражением сосудов, что подтверждает возможность использования феномена РНК-интерференции для коррекции сосудистых нарушений, вызванных воздействием радиации.

Как уже упоминалось выше, наши исследования показали, что γ -облучение

подавляет функцию BK_{Ca} каналов, которые контролируют вход Ca^{2+} в эндотелиальные клетки и, тем самым, снижают синтез выделения NO и амплитуду эндотелий-зависимого расслабления. Подавление BK_{Ca} каналов в гладкомышечных клетках приводит к развитию деполяризации мембраны и способствует увеличению входа через L-тип кальциевых каналов. В итоге вазодилататорный потенциал сосудистой стенки снижается, а ее способность к гиперконстрикции, напротив, возрастает.

Важно отметить факт увеличения экспрессии дельта-изоформы протеинкиназы C (С-киназы) в ГМК при облучении и при развитии синдрома артериальной гипертензии у крыс с генетически детерминированной гипертензией. Использование блокаторов С-киназы *in vitro* в значительной степени нормализуют функцию облученных сосудов. Учитывая связь изменений активности С-киназ с образованием реактивных форм кислорода, мы использовали также антиоксидант кверцетин, заключенный в липосомы. Показано, что липосомальный кверцетин (кверцетин, кстати, наряду с антиоксидантными свойствами обладает также и способностью тормозить активность С-киназы!), применяемый в условиях *in vitro* и *in vivo*, эффективно восстанавливает активность BK_{Ca} каналов в облученных ГМК.

В настоящее время стала известна структура генов и мРНК, которые ответственны за развитие той или иной патологии. Так, нами была установлена определяющая роль активации С-киназ при развитии артериальной гипертензии. Следовательно, заблокировав мРНК этих известных молекул-мишеней с помощью siRNA, можно повлиять на развитие заболевания.

Нами была предпринята первая попытка использовать феномен РНК-интерференции для снижения артериального давления у крыс с генетически детерминированной и индуцированной воздействием радиации гипертензией. Введение siRNA для специфического сайленсинга генов, кодирующих экспрессию С-киназ, в хвостовую вену

крыс с генетически детерминированной гипертензией способствовало восстановлению эндотелий-зависимого расслабления сосудов, увеличению амплитуды тока через Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы большой проводимости и длительному (до 10 дней) снижению артериального давления.

Другое направление исследований в области разработки таргетных препаратов связано с так называемыми Ca^{2+} -десенситайзерами, то есть соединениями, обладающими способностью прямо воздействовать на сократительный аппарат ГМК и расслаблять сосуды в отсутствии соответствующего снижения $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Установлено, что таким свойством обладают блокаторы Rho и C – киназ. Такого рода соединения оказались эффективными в эксперименте при лечении диабетических сосудистых ангиопатий, при сосудистых расстройствах, связанных с воздействием радиации и при гипертензиях различного генеза.

Взрослые мезенхимальные стволовые клетки (ВМСК) человека

Использование стволовых клеток человека для лечения сосудистой патологии у крыс является, по сути, первой в Украине, попыткой проведения их доклинических испытаний. Эти исследования важны и с фундаментальной точки зрения, так они помогают понять механизмы действия ВМСК при лечении других заболеваний. ВМСК человека были тестированы на крысах с артериальной гипертензией, индуцированной воздействием ионизирующего облу-

чения, и на крысах с генетически детерминированной гипертензией и экспериментальным диабетом. Однократное введение крысам ВМСК после облучения в количестве $16\text{--}20 \cdot 10^6$ клеток приводило к нормализации нарушенного эндотелий-зависимого расслабления сосудов, восстановлению функции Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов большой проводимости в ГМК и нормализации повышенного артериального давления. К сожалению, введение ВМСК крысам с экспериментальным стретозотоциновым диабетом практически не повлияло на функциональное состояние их сосудистого русла.

Дистанционный контроль функции потенциалзависимых ионных каналов

Использование явления плазмонного резонанса на поверхности наночастиц золота для управления ионными каналами пока еще является довольно-таки экзотическим способом контроля их функционирования и находится в стадии экспериментальной разработки. Тем не менее, нам удалось получить убедительные данные, что плазмонные наночастицы золота обладают способностью открывать калиевые каналы в плазматической мембране клеток, не вступая с ними в какого-либо рода химическое взаимодействие. Это происходит за счет взаимодействия электронного облака на поверхности наночастиц с сенсором напряжения канала, и этот эффект усиливается при облучении клетки лазером определенной длины волны за счет явления плазмонного резонанса.

1. Soloviev A. The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C. / Soloviev A., Bershtein S. // J. of Hypertens. – 1992, – V. 10, – p. 131–136.
2. Soloviev A. Evidence for decrease in myofilament responsiveness to Ca^{2+} during hypoxia in spontaneously active vascular smooth muscle in rats / Soloviev A., Bazilyuk O. // Experim. Physiol. – 1993, – V. 18, – P. 395–402.
3. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats / Soloviev A., Parshikov A., Stefanov A. [et al.] // J. Vasc. Res. – 1998. – V. 35. – P. 325–331.
4. Depression of endothelium-dependent relaxation despite normal release of nitric oxide in the aorta of spontaneously hypertensive rats: possible role of protein kinase C. / Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. [et al.] // Endothelium-Derived Hyperpolarizations. Ed. P. Vanhoutte. – Harwood Academic Publishers, 1999. – P. 289–296.
5. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role for protein kinase C / Soloviev A., Tishkin S., Zelensky S. [et al.] // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. – 2005. – V. 289. – R755–R762, 205.

6. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca^{2+} – activated K^{+} channels in rat aortic smooth muscle cells / Soloviev A, Tishkin S., Ivanova I. [et. al.] // *Life Sciences*. – 2009. V. 84. – P. 164–171.
7. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta BK_{Ca} channel function following ionizing irradiation / Soloviev A.[et al.] // *Acta Physiol. Sinica*. – 2009. – V. 61 (3). – P. 201–210.
8. Electrophysiological and contractile evidence the ability of human mesenchymal stromal stem cells to correct vascular malfunction in rats after ionizing irradiation / Soloviev A., Prudnikov I., Tsyvkin V. [et al.] // *The J. of Physiol. Sci. (Japan)*. – V. 60, № 2. – P. 161–172.
9. Protein kinase C-dependent inhibition of BKCa current in rat aorta smooth muscle cells following γ -irradiation / Kizub I., Pavlova A., Ivanova I., Soloviev A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – V. 86. – P. 291–299.
10. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats / Kizub I., Pavlova A., Johnson, Soloviev A, Zholos A. // *Br. J. Pharmacol.* – 2010. – V. 159. – P. 1724–1731.
11. Electrophysiological and contractile evidence the ability of human mesenchymal stromal stem cells to correct vascular malfunction in rats after ionizing irradiation / Soloviev A. [et al.] // *The J. of Physiol. Sci. (Japan)*. – 2010. – 60, № 2. – P. 161–172.
12. Protein kinase C-dependent inhibition of BKCa current in rat aorta smooth muscle cells following γ -irradiation / Kizub I., Pavlova O., Ivanova I., Soloviev A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – V. 86. – P. 291–299.
13. The BKCa channels deficiency as a possible reason for radiation-induced vascular hypercontractility / Kyrychenko S., Tishkin S., Dosenko V.[et al.] // *Vasc. Pharmacol.* – 2012. – V. 56. – P. 142–149.
14. Soloviev A. Selective glycolysis blockade in guinea pig pulmonary artery and aorta reverses contractile and electrical responses to acute hypoxia / Soloviev A., Bondarenko A., Kizub I. // *Vasc. Pharmacol.* – 2012. – V. 57. – P. 119–123.
15. *Ianova I.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor as a reserve defense mechanism of the vascular control under ionizing radiation impact. *Intern* / I. Ianova, O. Kislova, A. Soloviev // *J. of Physiol. Pathophysiol.* – 2012. – V. 3(2). – P. 161–173.
16. Evidence for the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction / I. Strielkov, I. Kizub, A. Khromov, A. Soloviev // *Vasc. Pharmacol.* – 2013. – V. 58. – P. 292–298.
17. Gap junctions supports the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction by facilitating calcium sensitization / Kizub, I. Strielkov, Y. Shaifta [et al.] // *J. Ward. Cardiovasc. Res.* – 2013. – V. 99. – P. 401–411.
18. Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing / T. Novokhatska, S. Tishkin, V. Dosenko [et al.] // *Eur J. Pharmacol.* – 2013. – V. 718, issues 1–3. – P. 401–407.

СОДЕРЖАНИЕ

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

Беленичев И. Ф., Егоров А. А. Соединения L-лизина в фармакокоррекции нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта.....	3
Семененко А. И. Динамика активности нейрон-специфической энolahзы и содержания белка S 100 у крыс в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и курсового внутривенного введения 0,9 % раствора NaCl	9

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Бухтиярова И. П. Изучение гиполлипидемических свойств ралейкина на модели стрептозоцинового диабета у крыс	14
Зеленский Д. С., Бондарь В. М., Жуковский А. И., Поляков В. И., Соловьев А. И. Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сокращение изолированных фрагментов аорты крыс и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}	19
Мончак И. Л., Жуковский О. И., Поляков В. И., Бондарь В. Н., Соловьев А. И. Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сократительную активность воротной вены крыс в условиях гипоксии <i>in vitro</i>	25
Нагорная А. А., Стежка В. А. Влияние ирбесартана на активность свободнорадикального перекисного окисления липидов у крыс с врожденной стресс-индуцированной артериальной гипертензией	32
Степанова К. О. Изучение лечебных свойств новых пессариев «Климедекс» в условиях экспериментального вагинита	39
Шаяхметова А. М. Влияние этамбутола на структурно-функциональные показатели гонад и фертильность крыс-самцов	45
Шебалдова Е. А., Кравец Д. С., Лукьянчук В. Д., Сейфуллина И. И., Марцинко Е. Э. Сравнительная фармакокинетика ВИТАГЕРМ-3 в норме и в условиях острой гиперкапнической гипоксии	51
Яковлева Л. В., Егорова Е. А., Кошечая Е. Ю. Экспериментальное обоснование коррекции Элгацином гипофункции семенников крыс	56
Кизуб И. В., Клименко К. И., Соловьев А. И. Эндотелий-зависимая длительная гипоксическая легочная вазоконстрикция может быть опосредована сигнализацией через миоэндотелиальные плотные контакты	64

СОБЫТИЯ

Х Национальная школа молодых ученых-фармакологов имени академика НАМН Украины А. В. Стефанова	70
Беленичев И. Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции.....	72
Головенко Н. Я. Контуры будущего фармакологии.....	81
Губский Ю. И. Проблема боли в паллиативной медицине: социальный вызов и молекулярная фармакология	85
Мамчур В. И. Два препарата, один организм – механизмы взаимодействий при коморбидной патологии	91
Резников А. Г. Методология тестирования противоопухолевой активности фармакологических препаратов на нефросубкапсулярных ксенографтах у мышей	96
Соловьев А. И. Ионные каналы как фармакологические мишени. Время смены парадигм классической фармакотерапии	101

CONTENT

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

<i>Belenichev I. F., Egorov A. A.</i> Compounds of L-lysine in pharmacocorrection of disorders of energy metabolism of the brain in the modeling of hemorrhagic stroke	3
<i>Semenenko A. I.</i> The dynamics of neuron specific enolase activity and protein S 100 level in the rats under of acute disorder of the cerebral circulation and course intravenous injection of 0,9 % solution NaCl	9

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

<i>Buhtiyarova I. P.</i> Pharmacological study of hypolipidemic effects of raleukin on the model of streptozocine diabetes mellitus in rats	14
<i>Zelenskiy D. S., Bondar V. M., Zhukovsky O. I., Polyakov V. I., Soloviev A. I.</i> Effects of taurocholic acid diisopropyl phosphate oligoethyleneglycol on contractive force and calcium transients in rat thoracic aorta smooth muscle	19
<i>Monchak I. L., Polyakov V. I., Zhukovsky O. I., Bondar V. N., Soloviev A. I.</i> The effect of taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol on rat portal vein contractile activity at hypoxia <i>in vitro</i>	25
<i>Nahornaya A. A., Stezhka V. A.</i> Irbesartan influence on free radical lipid peroxidation in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension	32
<i>Stepanova K. O.</i> Study of the medicinal properties pessaries «Klmedeks» on the model of experimental vaginitis	39
<i>Shayakhmetova G. M.</i> Ethambutol action on structure and functional indices of gonads and male rats fertility	45
<i>Shebaldova K. O., Kravets D. S., Lukyanchuk V. D., Seifullina I. I., Martsinko E. E.</i> Comparative pharmacokinetics VITAGERM-3 in the normas and in the conditions of acute hypercapnic hypoxia	51
<i>Yakovleva L., Egorova E., Koshevaya E.</i> Experimental verification of testicular hypofunction correction by Elgacin in rats	56
<i>Kizub I. V., Klymenko K. I., Soloviev A. I.</i> Endothelium-dependent sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction can be mediated by signaling via myoendothelial gap junctions	64

LAST DEVELOPMENTS

<i>Acad. A. V. Stefanov</i> X National School for Young Scientists – Pharmacologists	70
<i>Belenichev I. F.</i> The role of heat shock proteins in the implementation of molecular and biochemical mechanisms of neuroprotection	72
<i>Golovenko N. Ya.</i> Contours of the future of pharmacology	81
<i>Gubskiy Yu. I.</i> The problem of pain in palliative medicine: social challenge and molecular pharmacology	85
<i>Mamchur V. I.</i> Two drugs, one body – the mechanisms of interactions at comorbid pathology	91
<i>Reznikov A.</i> Testing methodology for antitumor activity of pharmacological agents using nephro subcapsular xenografts in mice	96
<i>Soloviev A. I.</i> Ion channels as pharmacological targets. Time to change the paradigm of classical pharmacology	101