

---

---

## 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

№ 1 (37)/2014

---

## ЗМІСТ

---

### ОГЛЯДИ

*Бобирьов В. М., Дев'яткіна Н. М.* Нові механізми дії ромашки й календули як основа їхнього застосування в сучасних лікарських засобах для стоматологічної практики..... 3

*Кізуб І. В., Клименко К. І., Соловійов А. І.* Участь протеїнкінази С у механізмах порушення судинного тонузу за умов цукрового діабету. Частина 1 ..... 10

*Марівський В. Ф., Воронін Є. П., Чекман І. С., Гребельник А. І.* Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид: перспективний біоцидний засіб ..... 17

### СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

*Бондарєв Є. В.* Експериментальне обґрунтування застосування глюкозаміну гідрохлориду як засобу ноотропної дії ..... 22

### У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

*Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А.* Моделювання аналгетичної активності похідних піридину шляхом визначення дескрипторів, комплементарних до нейромедіаторів..... 26

*Бутко Я. О., Дроговоз С. М., Ляпунова А. М., Булига Л. О.* Дослідження впливу глюкокортикостероїдів і керамідів на імунобіохімічні маркери запалення за алергічного дерматиту ..... 35

*Валика В. В., Парий С. Б., Руснак Л. Г., Унгуряну А. И., Николай Е. С., Тодираш М. П.* Доклиническое исследование гепатопротекторной эффективности нового комбинированного препарата Неатоп-гера ..... 40

*Дорошенко А. М.* Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення ..... 48

---

<i>Клименко К. И., Новохацкая Т. В., Поляков В. И., Жуковский О. И., Бондарь В. Н., Соловьев А. И.</i> Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на выходящие калиевые токи в миоцитах аорты крыс с экспериментальным диабетом .....	58
<i>Мохорт М. А., Геращенко І. В., Шкрабак О. А., Мазур Ю. Ю., Векліч Т. О.</i> Похідні імідазо [1,2-а]азепінію як модифікатори скоротливої активності міометрія ....	65
<i>Нагорна О. О., Горчакова Н. О., Чекман І. С., Беленічев І. Ф., Брюзгіна Т. С.</i> Вплив сумісного застосування квінаприлу з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів із артеріальною гіпертензією .....	73
<i>Novokhatska T., Klymenko K., Dosenko V., Soloviev A.</i> Fact or fancy: Does the high level of PKC-delta gene expression contribute to potassium channels malfunction at arterial hypertension and diabetes? .....	78
<i>Прискока А. О.</i> Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення .....	85
<i>Пясковська О. М., Горбик Г. В., Якшибаєва Ю. Р., Родіонова Н. К., Момот В. Я., Соляник Г. І.</i> Корекція пухлино-асоційованої анемії поліфенолами винограду .....	91
<i>Пакришень С. В., Килимник О. М.</i> Морфо-функціональний стан скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів при доксорубіциновій кардіоміопатії та можливі шляхи її фармакологічної корекції .....	99

## **ІНФОРМАЦІЯ З БЕЗПЕКИ ЗАСТОСУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

За сторінками журналу «WHO Pharmaceuticals Newsletter» .....	106
--	-----

## **ОСОБИСТОСТІ**

До ювілею Світлани Мефодіївни Дроговоз .....	108
До 90-річчя від дня народження Федора Петровича Трінуса .....	110

<b>ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ</b> .....	112
----------------------------------	-----

<b>ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ</b> .....	116
----------------------------------	-----

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b> .....	119
-------------------------	-----

<b>CONTENT</b> .....	120
----------------------	-----

В. М. Бобирьов, Н. М. Дев'яткіна

## Нові механізми дії ромашки й календули як основа їхнього застосування в сучасних лікарських засобах для стоматологічної практики

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Ключові слова: ромашка, календула, механізм дії

Використання рослин для поліпшення здоров'я людини відоме протягом тисяч років [1, 2]. Трави завжди були невід'ємною частиною традиційної та нетрадиційної медицини [3, 4]. Популярність фітопрепаратів може пояснюватися здатністю лікарських рослин діяти повільно, але з мінімальними побічними ефектами.

Речовини рослинного походження, що використовуються для місцевого лікування стоматологічних захворювань, зокрема, запально-інфекційних захворювань слизової оболонки порожнини рота, мають виявляти антисептичну, протизапальну, анальгезуючу, кератопластичну активність, усувати набряк [5]. Саме цим вимогам повною мірою відповідають екстракти ромашки та календули, які широко представлені на ринку фітопрепаратів та засобів гігієни з догляду за порожниною рота. Застосування сучасних методів дослідження дозволяє по-новому оцінити механізми дії біологічно активних речовин зазначених лікарських рослин. *Мета дослідження* – аналіз даних світової наукової літератури останніх років щодо дії біологічно активних речовин зазначених лікарських рослин.

Ромашка – одна з найпопулярніших лікарських рослин у клінічній практиці [6]. Її екстракти одержують з висушених квітів видів *Matricaria* родини складноцвітих, найчастіше *Matricaria chamomilla* і *Chamaemelum nobile* [7]. Рослина містить 0,24–1,9 % ефірних олій [8]. Близько 120 вторинних метаболітів було виявлено в ромашці, у тому числі 28 терпеноїдів і 36 флавоноїдів. Основними компонентами ефірної олії з

квітів ромашки є терпеноїд  $\alpha$ -бісаболол і його оксид азулен, а також хамазулен. Інші важливі складові квітів ромашки включають фенольні сполуки, у першу чергу апігенін, який є найперспективнішою речовиною [9]. Він присутній у невеликих кількостях у вільному стані й переважно існує у вигляді глікозидів.

Лікарські речовини екстрагують із сухих квітів ромашки водою, етанолом або метанолом. Зазвичай стандартизовані екстракти містять 1,2 % апігеніну. Водні екстракти містять досить низькі концентрації вільного апігеніну, але мають високий вміст апігенін-7-О-глікозиду [10].

Традиційно ромашку використовують як протизапальний, в'яжучий і регенераторний засіб антиоксидант. У народній медицині вона застосовується для лікування ран, виразок, екземи, подагри, опіків, невралгії, радикуліту, ревматичного болю, маститу, інфекцій вуха та очей. Ромашка широко використовується для лікування запалення шкіри та слизових оболонок, бактеріальних інфекцій шкіри, порожнини рота та ясен. Вона має не тільки місцеву, а й резорбтивну дію, зокрема, м'який седативний ефект при істерії та безсонні [11]. Ромашку можна призначати при захворюваннях вен, венозній недостатності [12]. Вона є спазмолітиком і показана за шлунково-кишкових розладів – метеоризмі, діареї, анорексії, нудоті та блюванні [13–15].

$\alpha$ -Бісаболол, його оксиди та матрицин, який перетворюється на хамазулен та інші флавоноїди, мають протизапальні властивості [16, 17]. Дослідження на добровольцях показали, що флавоноїди й ефірні олії ромашки проникають у глибокі шари шкіри, що важливо для використання їх як місцевого протизапального агента.

Одним з механізмів протизапальної дії ромашки є інгібування вивільнення простагландину  $E_2$  внаслідок пригнічення активності циклооксигенази (ЦОГ)-2 без впливу на конституїтивну форму ЦОГ-1 [18].

Ромашка має протипухлинні властивості, причому більшість оцінок гальмування росту пухлин стосуються апігеніну [19, 20, 21]. Екстракт ромашки мінімально впливав на нормальні клітини, значно знижував життєздатність клітин різних ліній раку та індукував апоптоз у них [22].

Завдяки протизапальним властивостям ромашка часто використовується для лікування легких подразнень шкіри, у тому числі сонячних опіків, висипів, запалення слизової оболонки очей, але її значення в лікуванні цих станів не було доведено науково обґрунтованими дослідженнями [23]. Водночас описано, що місцеве застосування ромашки у вигляді крему Камілосан (*Kamillosan* (R)) було помірно ефективним при лікуванні атопічної екземи [24]. У частково подвійному сліпому рандомізованому дослідженні пацієнтів з середнім ступенем атопічного дерматиту показано, що після 2 тижнів лікування Камілосан демонстрував певну перевагу над місцевим застосуванням гідрокортизону за маргінальної різниці порівняно з плацебо.

Відомо, що ромашка та її препарати використовуються при захворюваннях порожнини рота, наприклад, за афтозного стоматиту [25]. Описано застосування цих засобів при виразках, викликаних хіміотерапією онкологічних захворювань [26].

Запальні захворювання слизових оболонок та шкіри, при яких призначають ромашку, супроводжуються болем, що спричиняє нервові розлади та безсоння, тому інтерес викликають нейротропні ефекти цієї рослини, підтверджені експериментальними даними та клінічними спостереженнями. Традиційно препарати ромашки розглядаються як м'який транквілізатор та снодійне [27]. Вважають, що седативні ефекти можуть бути зумовлені флавоноїдами та апігеніном, який зв'язується з бензодіазепіновими рецепторами в головному мозку [28]. Повідомлялося про застосування

ромашки в лікуванні генералізованого тривожного розладу: недавні результати контрольованих клінічних випробувань екстракту ромашки вказують, що він має анксиолітичну активність у пацієнтів з м'якою та помірною формою цієї патології [29].

Витяги з ромашки здатні впливати на метаболічні процеси. Вони зменшують гіперглікемію та діабетичні ускладнення, збільшують запаси глікогену в печінці, причому така активність зумовлена захисною дією на  $\beta$ -клітини панкреатичних островців та зменшенням пов'язаного з гіперглікемією оксидативного стресу [30–32]. Виходячи з того, що перебіг місцевих запальних процесів при діабеті набуває тривалого та резистентного до терапії характеру, стає очевидною доцільність поєднання місцевих і загальних ефектів рослини за такої ситуації.

Ефективність застосування ромашки для прискорення загоєння ран оцінювали в подвійному сліпому дослідженні на 14 пацієнтах із дермабразією, коли вплив ромашки на епітелізацію був визнаний статистично ефективним [33]. У дослідній групі на 15 день виявили зменшення площі рани в порівнянні з контролем. Крім того, маса грануляційної тканини та вміст оксипроліну були значно вищими. Збільшення швидкості загоєння рани разом зі збільшенням міцності на розрив, підвищенням вмісту оксипроліну та гістологічними змінами вкотре підтвердили можливість використання препаратів цієї лікарської рослини з метою загоєння ран [34].

На фоні високої й різнопланової фармакологічної активності в ромашки мало побічних ефектів. Відносно низький відсоток людей, чутливих до ромашки, мають розвиток алергічних реакцій [35]. Висловлюється припущення, що деякі повідомлення про алергічні реакції на застосування ромашки можуть бути пов'язані зі забрудненням сировини іншими високоалергенними видами.

Іншою рослиною, перспективною для лікування запальних захворювань порожнини рота, є календула. Тритерпенові спирти та сапоніни, флавоноїди, каротиноїди та полісахариди – основні класи біологічно активних сполук роду

*Calendula*, кілька видів якого мають лікарську цінність, у тому числі календула лікарська (*Calendula officinalis*) [36]. Хімічні аналізи показують, що домінуючі фенольні сполуки настоїв і відварів календули – це глікозиди, флавоноїди та похідні гідроксикоричної кислоти. Кверцетин, каротиноїди, лютеїн, лікопін, рутин, убіхінон, ксантофіли зумовлюють антиоксидантні властивості календули. Десять тритерпенових глікозидів типу олеананів, ефіри календулаглікозидів А, В, С та флавонові глікозиди, виділені з квітів календули, демонструють проти-запальну активність. Більшість з них також виявляють противірусну активність, а окремі сполуки з числа тритерпенових глікозидів – сильну цитостатичну дію в культурах клітин раку товстої кишки, лейкемії та меланоми [37].

Календула традиційно використовується при лікуванні пухлин шкіри, дерматологічних захворювань і виразок, нервових розладів, а також входить до складу майже 200 косметичних засобів: кремів, лосьйонів, шампунів [38]. Незважаючи на давню традицію використання, фармакологічні властивості та механізми дії календули дотепер не вивчені в повній мірі.

Найбільше літературних джерел зосереджено навколо протизапальних властивостей календули. Показано, що вона містить комплекс речовин з протизапальними властивостями, який інгібує деградацію колагену та активність матриксної металопротеїнази в фібробластах ясен людини та діє сильніше, ніж кверцетин [39]. Екстракт квітів календули в дозах 250 і 500 мг/кг виявляє значну протизапальну активність на моделі карагенінового запалення та гострого набряку, викликаного декстраном, а також хронічного запалення, зумовленого формаліном. Екстракт календули інгібував продукцію фактора некрозу пухлин- $\alpha$  у культурі макрофагів, оброблених ліпополісахаридом. Більше того, він знижував підвищені рівні прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-1- $\beta$ , інтерлейкіну-6, фактора некрозу пухлин- $\alpha$  та інтерферону- $\gamma$ ), білка гострої фази і С-реактивного білка в мишей після ін'єкції ліпополісахариду. Активність ЦОГ-2, індукована ліпо-

полісахаридом у селезінці мишей, також пригнічувалася екстрактом календули. Це дозволяє вважати, що потужна протизапальна дія біологічно активних речовин календули опосередкована інгібуванням прозапальних цитокінів та синтезу простагландинів [40].

Протизапальна дія календули підтверджується клінічними прикладами, зокрема, позитивним терапевтичним ефектом у двох випадках резистентного до лікування десквамативного гінгівіту, зумовленого червоним плоским лишаєм, коли було застосовано гель з клобетазолом, ністатином, екстрактом календули і пектином [41]. Також описаний випадок успішного місцевого призначення календули для лікування ексфолюативного хейліту [42].

Експериментальні дослідження показали, що календула лікарська має ангіогенну та фібропластичну дію, яка позначається на проліферативних етапах процесу загоєння рани [43]. При цьому спостерігалася скорочення періоду реепітелізації, відбувалося значне зростання вмісту оксипроліну і гексозаміну [44]. За експериментально індукованих термічних опіків у тварин, які отримували лікування екстрактом календули, показники загоєння рани (колаген, оксипролін і гексозамін) були значно збільшені, а вміст білків гострої фази (гаптоглобину і орозомукоїду) – редуковані. Антиоксидантний захист, який був послаблений у печінці при опіковій травмі, посилювався, а перекисне окиснення ліпідів знижувалося. Позитивні зміни виявлялися в гістопатологічних аналізах шкіри [45].

Регенераторна дія календули виявляється й на фоні токсичності цитостатиків. У дослідях на хом'яках було оцінено потенціал місцевого застосування екстракту календули у формі 5–10 % гелю на загоєння орального мукозиту, індукованого 5-фторурацилом, і продемонстровано прискорення редукції патологічних явищ [46].

Потужна протизапальна та ранозагоювальна дія календули поєднується з протимікробною активністю, що важливо як для лікування інфекційного запалення, так і для профілактики вторинної інфекції при травмах та опіках. Показано, що

протимікробна активність календули щодо клінічних патогенів залежить від екстрагування діючих речовин: у метанолового екстракту вона вища, ніж в етанолового. Обидва екстракти показали високу протигрибкову активність порівняно з флуконазолом [47]. Досліджено антибактеріальні та протипаразитарні властивості вільної олеанолової кислоти та її глікозидів і глюкуронідів, виділених з календули. При цьому показано, що карофілін інгібує ріст і виживання бактерій, перешкоджає розвитку личинок нематод на інфекційній стадії циклу цих кишкових паразитів [48].

Покриття хірургічних швів з плетених шовкових ниток йодоформом із екстрактом календули з 1 по 15 день після операції сприяло значному зниженню росту бактерій порівняно з контролем за умов рандомізованого клінічного дослідження [49]. Також доведено, що при операції в порожнині рота (видалення моляра, що не прорізався) полоскання рідиною на основі лікарських речовин календули зменшує адезію мікроорганізмів на шовному матеріалі, хоча й менш активно, ніж 0,12 % розчин хлоргексидину [50].

Екстракти календули мають радіопротекторну дію, основу якої становлять антиоксидантні механізми. Показано, що 2 % екстракт квітів календули у формі рідини для полоскання рота або гелю має протективну дію при радіаційно-індукованому мукозиті в пацієнтів з раком голови та шиї [51]. Повідомляють, що календулу застосовують не тільки при радіаційних ураженнях слизової оболонки порожнини рота, а й при гострих реакціях на опромінення шкіри [52, 53], однак, як показало масштабне сліпе рандомізоване дослідження, застосування витягів з цієї рослини для профілактики шкірних реакцій, викликаних опроміненням у хворих на рак молочної залози, не мало суттєвих переваг порівняно з плацебо [54].

Антиоксидантні властивості календули виявляються як при радіаційних ураженнях, так й за інших експериментальних та клінічних ситуацій. Наприклад, антиоксидантна активність екстракту календули реєструється в досліджах *in vitro*, коли спостерігається

інгібування хемілюмінісценції, зумовленої дихальним вибухом нейтрофілів [55]. В експериментах на білих щурах встановлено, що лікувальне застосування кремів, які містять 4 % і 5 % ефірного масла календули, викликало зниження вмісту малонового діальдегіду та зростання активності каталази, супероксиддисмутази, умісту глутатіону, аскорбінової кислоти та білка в шкірі після 1 міс щоденного ультрафіолетового опромінення та обробки враженої поверхні досліджуваними засобами, що, на думку авторів, зумовлено дією 1,8-цинеола і  $\alpha$ -пінена [56]. З антиоксидантними механізмами та поліпшенням синтезу колагену в субепідермальній сполучній тканині пов'язують фотозахисний ефект у безшерстих мишей, досягнутий шляхом місцевого застосування екстракту календули в гелевій композиції [57].

Водний витяг календули виявляє селективну дозозалежну цитостатичну дію проти ракових клітин *in vitro*, причому цитотоксичність настільки високою, отриманою з календули лікарської, помітно вища в порівнянні з такою у витягу з ромашки аптечної, а ефект більш вибіркового, особливо стосовно клітинних ліній меланоми [58].

Для календули характерна низька токсичність з мінімальними побічними явищами [59]. При вивченні гострої та субхронічної пероральної токсичності екстракту календули в дозах 2000 мг/кг або 50, 250 і 1000 мг/кг/день встановлено, що в гострих дослідах не відмічалось смертності та ознак токсичності. Водночас при субхронічному дослідженні деякі з параметрів крові були суттєво порушені після 90 днів експерименту (гемоглобін, кількість еритроцитів і лейкоцитів, час згортання крові, активність печінкових ферментів). Гістологічне дослідження показало незначні відхилення в структурі печінкової паренхіми, які узгоджувалися з біохімічними змінами. Ці дослідження підтвердили, що гостра та субхронічна токсичність екстракту календули є низькою [60].

Отже, у світі широко вивчаються лікарські рослини, які поєднують властивості, корисні для місцевого застосування в терапевтичній стоматології, і за

масштабністю експериментальних та клінічних досліджень лідирують такі рослини, як ромашка аптечна та календула лікарська. Дані літератури містять нові відомості про фармакодинаміку та застосування цих рослин і ґрунтуються на експериментах, виконаних згідно з принципами GLP, та на клінічних спостереженнях, які відповідають стандартам доказової медицини. Сучасне розу-

міння механізмів загальної та місцевої дії ромашки й календули, особливо впливу на синтез простагландинів, цитокіновий профіль, метаболізм сполучної тканини та антиоксидантно-прооксидантну рівновагу, відкриває перспективи для розширення показань до застосування цих рослин та створення нових лікарських форм з використанням їхніх біологічно активних компонентів.

1. Newman D. J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002 / D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader // *J. Nat. Prod.* – 2003. – V. 66. – P. 1022–1037.
2. Jones W. P. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy / W. P. Jones, Y. W. Chin, A. D. Kinghorn // *Curr. Drug Targets.* – 2006. – V. 7. – P. 247–264.
3. Philip R. B. Herbal remedies: the good, the bad, and the ugly / R. B. Philip // *J. Comp. Integ. Med.* – 2004. – V. 1. – P. 1–11.
4. Fabricant D. S. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery / D. S. Fabricant, N. R. Farnsworth // *Environ. Health Perspect.* – 2001. – V. 109. – P. 69–75.
5. Рациональная фармакотерапия в стоматологии: Рук. для практикующих врачей / Г. И. Баррер, Е. В. Зорян, В. С. Агапов [и др.]; под ред. Г. М. Баррера, Е. В. Зорян. – М.: Литтерра, 2006. – 568 с.
6. Костина Л. Лечение ромашкой / Л. Костина. – М.: ООО «АСС–Центр», ООО «Авеонт», 2005. – 128 с.
7. Hansen H. V. The common chamomile and the scentless may weed revisited / H. V. Hansen, K. I. Christensen // *Taxon. International. Association for Plant Taxonomy.* – 2009. – V. 58. – P. 261–264.
8. McKay D. L. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.) / D. L. McKay, J. B. Blumberg // *Phytother. Res.* – 2000. – V. 20. – P. 519–530.
9. Babenko N. A. Effects of *Chamomilla recutita* flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats / N. A. Babenko, E. G. Shakhova // *Exp. Gerontol.* – 2006. – V. 41. – P. 32–39.
10. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) / V. Svehliková, R. N. Bennett, F. A. Mellon [et al.] // *Phytochemistry.* – 2004. – V. 65. – P. 2323–2332.
11. Srivastava J. K. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future / J. K. Srivastava, E. Shankar, S. Gupta // *Mol. Med. Report.* – 2010. – V. 3, № 6. – P. 895–901.
12. Lyseng-Williamson K. A. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers, and haemorrhoids / K. A. Lyseng-Williamson, C. M. Perry // *Drugs.* – 2003. – V. 63. – P. 71–100.
13. Kroll U. Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy / U. Kroll, C. Cordes // *Phytomedicine.* – 2006. – V. 5. – P. 12–19.
14. Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast) and its components against ulcers and rebound acidity / M. T. Khayyal, M. Seif-EI-Nasr, M. A. El-Ghazaly [et al.] // *Phytomedicine.* – 2006. – V. 13. – P. 56–66.
15. Crotteau C. A. Clinical inquiries; what is the best treatment for infants with colic? / C. A. Crotteau, S. T. Wright, A. Eglash // *J. Fam. Pract.* – 2006. – V. 55. – P. 634–636.
16. Sakai H. Effect of sodium azulene sulfonate on capsaicin-induced pharyngitis in rats / H. Sakai, M. Misawa // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – V. 96. – P. 54–55.
17. Peña D. Anti-inflammatory and anti-diarrheic activity of *Isocarpha cubana* Blake / D. Peña, N. Montes de Oca, S. Rojas // *Pharmacologyonline.* – 2006. – V. 3. – P. 744–749.
18. Srivastava J. K. Chamomile, a novel and selective Cox-2 inhibitor with anti-inflammatory activity / J. K. Srivastava, M. Pandey, S. Gupta // *Life Sci.* – 2009. – V. 85. – P. 663–669.
19. Way T. D. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol-3'-kinase/Akt-dependent pathway / T. D. Way, M. C. Kao, J. K. Lin // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 4479–4489.
20. Patel D. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise / D. Patel, S. Shukla, S. Gupta // *Int. J. Oncol.* – 2007. – V. 30. – P. 233–245.
21. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer / M. A. Gates, S. S. Tworoger, J. L. Hecht [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2007. – V. 121. – P. 2225–2232.
22. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice / S. Shukla, A. Mishra, P. Fu [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – V. 19. – P. 2042–2044.
23. Fugh-Berman A. Herbal Supplements: Indications, Clinical Concerns, and Safety / A. Fugh-Berman // *Nutr. Today.* – 2002. – V. 37. – P. 122–124.
24. Patzelt-Wenzler R. Proof of efficacy of Kamillosan(R) cream in atopic eczema / R. Patzelt-Wenzler, E. Ponce-Pöschl // *Eur. J. Med. Res.* – 2000. – V. 5. – P. 171–175.
25. Clinical evaluation of fluid extract of *Chamomilla recutita* for oral aphthae / M. Ramos-e-Silva, A. F. Ferreira, R. Bibas [et al.] // *J. Drugs Dermatol.* – 2006. – V. 5. – P. 612–617.
26. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis / E. E. Mazokopakis, G. E. Vrentzos, J. A. Papadakis [et al.] // *Phytomedicine.* – 2005. – V. 12. – P. 25–27.
27. Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats / K. Shinomiya, T. Inoue, Y. Utsu [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2005. – V. 28. – P. 808–810.

28. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system / R. Awad, D. Levac, P. Cybulska [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – V. 85. – P. 933–942.
29. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Matricaria recutita* (Chamomile) extract therapy for generalized anxiety disorder / J. D. Amsterdam, Y. Li, I. Soeller [et al.] // *J. Clin. Psychopharmacol.* – 2009. – V. 29. – P. 378–382.
30. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications / A. Kato, Y. Minoshima, J. Yamamoto [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – V. 56. – P. 8206–8211.
31. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats / M. Eddouks, A. Lemhadri, N. A. Zeggwah [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2005. – V. 67. – P. 189–195.
32. Antihyperglycemic and antioxidant potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats / M. Cemek, S. Kaga, N. Simsek [et al.] // *J. Nat. Med.* – 2008. – V. 62. – P. 284–293.
33. *Nayak B. S.* Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract / B. S. Nayak, S. S. Raju, A. V. Rao // *J. Wound Care.* – 2007. – V. 16. – P. 298–302.
34. Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study / M. D. Martins, M. M. Marques, S. K. Bussadori [et al.] // *Phytother. Res.* – 2009. – V. 23. – P. 274–278.
35. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures / J. W. Budzinski, B. C. Foster, S. Vandenhoeck [et al.] // *Phytomedicine.* – 2000. – V. 7. – P. 273–282.
36. *Arora D.* A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula* / D. Arora, A. Rani, A. Sharma // *Pharmacogn. Rev.* – 2013. – V. 7, № 14. – P. 179–187.
37. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers / M. Ukiya, T. Akihisa, K. Yasukawa [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2006. – V. 69, № 12. – P. 1692–1696.
38. Plant food supplements with anti-inflammatory properties: a systematic review (II) / C. Di Lorenzo, M. Dell'Agli, M. Badea [et al.] // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2013. – V. 53, № 5. – P. 507–516.
39. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts / P. Saini, N. Al-Shibani, J. Sun [et al.] // *Homeopathy.* – 2012. – V. 101, № 2. – P. 92–98.
40. *Preethi K. C.* Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action / K. C. Preethi, G. Kuttan, R. Kuttan // *Indian. J. Exp. Biol.* – 2009. – V. 47, № 2. – P. 113–120.
41. Management of two cases of desquamative gingivitis with clobetasol and *Calendula officinalis* gel / M. A. Machado, C. M. Contar, J. A. Brustolim [et al.] // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.* – 2010. – V. 154, № 4. – P. 335–338.
42. *Roveroni-Favaretto L. H.* Topical *Calendula officinalis* L. successfully treated exfoliative cheilitis: a case report / L. H. Roveroni-Favaretto, K. B. Lodi, J. D. Almeida // *Cases J.* – 2009. – V. 2. – P. 9077.
43. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil / L. M. Parente, S. Lino Júnior Rde, L. M. Tresvenzol [et al.] // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* – 2012. – V. 2012. – P. 375671.
44. *Preethi K. C.* Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis* / K. C. Preethi, R. Kuttan // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – V. 20, № 1. – P. 73–79.
45. *Chandran P. K.* Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns / P. K. Chandran, R. Kuttan // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2008. – V. 43, № 2. – P. 58–64.
46. Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis* / N. Tanideh, P. Tavakoli, M. A. Saghir [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* – 2013. – V. 115, № 3. – P. 332–338.
47. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens / E. Efstratiou, A. I. Hussain, P. S. Nigam [et al.] // *Complement Ther. Clin. Pract.* – 2012. – V. 18, № 3. – P. 173–176.
48. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*) / A. Szakiel, D. Ruszkowski, A. Grudniak [et al.] // *Planta Med.* – 2008. – V. 74, № 14. – P. 1709–1715.
49. Sutures coated with antiseptic pomade to prevent bacterial colonization: a randomized clinical trial / F. Cruz, F. Leite, G. Cruz [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* – 2013. – V. 116, № 2. – P. 103–109.
50. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars / R. L. Faria, L. M. Cardoso, G. Akisue [et al.] // *J. Appl. Oral Sci.* – 2011. – V. 19, № 5. – P. 476–482.
51. Antioxidant capacity of *calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study / N. Babae, D. Moslemi, M. Khalilpour [et al.] // *Daru.* – 2013. – V. 21, № 1. – P. 18.
52. Evaluation and management of acute radiation dermatitis / A. Modesto, J. C. Faivre, F. Granel-Brocard [et al.] // *Cancer Radiother.* – 2012. – V. 16, № 5–6. – P. 456–461.
53. *McQuestion M.* Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update / M. McQuestion // *Semin. Oncol. Nurs.* – 2011. – V. 27, № 2. – P. 1–17.
54. No differences between *Calendula* cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions – results from a randomized blinded trial / L. Sharp, K. Finnilä, H. Johansson [et al.] // *Eur. J. Oncol. Nurs.* – 2013. – V. 17, № 4. – P. 429–435.
55. Antioxidant activity of *Calendula officinalis* extract: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy / P. C. Braga, M. Dal Sasso, M. Culici [et al.] // *Pharmacology.* – 2009. – V. 83, № 6. – P. 348–355.



- 
- 
56. Effects of Calendula Essential Oil-Based Cream on Biochemical Parameters of Skin of Albino Rats against Ultraviolet B Radiation / A. K. Mishra, A. Mishra, A. Verma [et al.] // *Sci. Pharm.* – 2012. – V. 80, № 3. – P. 669–683.
  57. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress / Y. M. Fonseca, C. D. Catini, F. T. Vicentini [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – V. 100, № 6. – P. 2182–2193.
  58. Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity / I. Matic, Z. Juranic, K. Savikin [et al.] // *Phytother. Res.* – 2013. – V. 27, № 6. – P. 852–858.
  59. Posadzki P. Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews / P. Posadzki, L. K. Watson, E. Ernst // *Clin. Med.* – 2013. – V. 13, № 1. – P. 7–12.
  60. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats / A. Lagarto, V. Bueno, I. Guerra [et al.] // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2011. – V. 63, № 4. – P. 387–391.

**В. М. Бобирьов, Н. М. Дев'яткіна**

### **Нові механізми дії ромашки й календули як основа їх застосування в сучасних лікарських засобах для стоматологічної практики**

Стаття являє собою огляд літератури, який показує, що серед лікарських рослин, які мають властивості, корисні для місцевого застосування в терапевтичній стоматології, за масштабністю експериментальних та клінічних досліджень лідирують такі рослини, як ромашка та календула. Сучасне розуміння механізмів дії ромашки й календули, особливо впливу на синтез простагландинів, цитокиновий профіль, метаболізм сполучної тканини та оксидантно-прооксидантну рівновагу, відкриває перспективи для розширення показань до застосування та створення нових лікарських форм з використанням біологічно активних компонентів цих рослин.

*Ключові слова: ромашка, календула, механізм дії*

**В. Н. Бобырев, Н. Н. Девяткина**

### **Новые механизмы действия ромашки и календулы как основа их применения в современных лекарственных средствах для стоматологической практики**

Статья представляет обзор литературы, который показывает, что среди лекарственных растений, которые имеют свойства, полезные для местного применения в терапевтической стоматологии, по масштабности экспериментальных и клинических исследований лидируют такие растения, как ромашка и календула. Современное понимание механизмов действия ромашки и календулы, особенно влияния на синтез простагландинов, цитокиновый профиль, метаболізм соединительной ткани и оксидантно-прооксидантное равновесие, открывает перспективы для расширения показаний к применению и созданию новых лекарственных форм с использованием биологически активных компонентов этих растений.

*Ключевые слова: ромашка, календула, механизм действия*

**V. N. Bobyrev, N. N. Devyatkina**

### **New mechanisms of chamomile and calendula as the basis of their use in modern medicinal remedies for dental practice**

The article presents a review of literature that shows that among the medicinal herbs having properties that are useful for topical applying in dental practice, on the scale of experimental and clinical researches, chamomile (*Chamomilla recutita*) and calendula (*Calendula officinalis* L.) are at the leading position. Chemical nature of biologically active substances from these herbs is described in correlation with their pharmacological properties. It is shown that both chamomile and marigold display anti-inflammatory, wound-healing, antimicrobial, and antioxidant effects. Selective inhibition of cyclooxygenase 2 is the main mechanism of their anti-inflammatory action. Topical use of these herbs extracts promotes the improvement of regeneration in the cases of wounds or burns that accompanies with stimulation of re-epithelisation and enhanced concentration of hydroxyproline, hexosamine and collagen. Reduced level of lipid peroxidation in tissues is registered under the treatment. Beside mentioned effects, both chamomile and calendula extracts have in vitro cytotoxicity effect against human cancer cells, and calendula anti-proliferation activity is more selective than that seen at chamomile extract administration. It is indicated that some resorbative effects of the given herbs such as chamomile's anxiolytic action also meets the demands of combined therapy of the inflammatory processes in the oral cavity. The data obtained from the experimental researches are illustrated by the examples of clinical use of chamomile and calendula extracts in different lesions of mucous membranes and skin (oral aphthae, mucositis, cheilitis, radiation dermatitis etc). The efficacy of these remedies (as aqueous and alcohol extracts, ointments, creams, or gels) is analyzed from the point of view of evidence-based medicine. Thus, modern understanding of the mechanisms of action of chamomile and calendula, especially its influence on prostaglandin synthesis, cytokine profile, connective tissue metabolism and oxidant-prooxidant balance, opens new prospects for the creation of new medicinal forms using biologically active components of these herbs.

*Key words: chamomile, calendula, mechanism of action*

*Надійшла: 20.01.2014 р.*

**Контактна особа:** Дев'яткіна Наталя Миколаївна, аспірант, кафедра експериментальної та клінічної фармакології з клінічної імунології та алергологією, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», буд. 23, вул. Шевченка, м. Полтава, 36011. Тел. + 38 0532 56 20 59.

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

## Участь протеїнкінази С у механізмах порушення судинного тонусу за умов цукрового діабету. Частина 1.

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

*Ключові слова: цукровий діабет, ендотелій, гіперглікемія, протеїнкіназа С, реактивні форми кисню, судинний тонус, гладенькі м'язи судин*

Цукровий діабет (ЦД) є тяжким комплексним синдромом, основними компонентами якого є гіперглікемія та метаболічні зміни. Частота захворюваності на ЦД у світі зростає з великою швидкістю і може сягнути 400 млн осіб, хворих на ЦД (близько 4,4 % населення планети), у наступні 20 років [1]. Близько 5–10 % хворих на ЦД страждають на автоімунний інсулін-залежний діабет 1-го типу, тоді як 90–95 % хворих мають інсулін-незалежний ЦД 2-го типу [1]. ЦД 2-го типу зазвичай виникає на тлі серцево-судинних факторів ризику, зокрема, ожиріння, артеріальної гіпертензії, високого рівня тригліцеридів, холестеролу та ліпопротеїдів високої щільності, а також зміненого складу ліпопротеїдів низької щільності, гіперінсулінемії, інсулінорезистивності та хронічного запалення [1]. Довготривалі ефекти ЦД позначаються на багатьох системах органів та пов'язані з комплексом патологічних, клітинних та субклітинних змін.

ЦД призводить до чисельних дисфункцій, у тому числі серцево-судинних, що є одними з головних чинників смертності та інвалідазації населення [2]. Це величезна проблема охорони здоров'я, оскільки обидва типи ЦД пов'язані з розвитком серцево-судинних захворювань, які призводять до майже 80 % смертності серед пацієнтів із ЦД [3]. Макроциркуляторні ускладнення за умов ЦД включають ангіопатію, атеросклероз, кальцифікацію судинної стінки та артеріальну гіпертензію, що спостерігається, зокрема, у

коронарних та сонних артеріях [4], судинах мозку [5] та великих периферичних артеріях нижніх кінцівок [5]. Мікросудинні ускладнення за ЦД включають ретинопатію [6], нефропатію [7] та периферичну нейропатію [8]. Зміни кровотоку та порушення судинної реактивності за умов ЦД широко відомі, і результати багатьох досліджень показують, що ендотеліальна дисфункція та порушення в роботі гладеньких м'язів має місце в різноманітних судинних регіонах як на моделях тварин, так і в пацієнтів із ЦД [9].

Вважається, що гіперглікемія є ключовим фактором, що відповідає за розвиток діабетичних судинних ускладнень [2]. Встановлено, що до розвитку судинних дисфункцій за умов ЦД залучено декілька пов'язаних із гіперглікемією механізмів. Вони включають оксидативний стрес [10], поліольний шлях [11, 12], підвищене утворення кінцевих продуктів глікації (КПГ) [13, 14], підвищене шунтування надлишкової глюкози гексозамінним шляхом [12] та активацію шляхів, що опосередковуються С-мітоген-активованими протеїнкіназами (МАПК) та протеїнкіназою С (ПКС) [15, 16]. Підвищений рівень вільних жирних кислот залучений до розвитку ускладнень ЦД [16]. Оксидативний стрес також вважається ключовим фактором у розвитку судинних діабетичних ускладнень [10]. До розвитку оксидативного стресу за умов ЦД призводить дисбаланс між підвищеним утворенням реактивних форм кисню (РФК) та зниженням активності антиоксидантної захисної системи [10].

ПКС є регуляторним ферментом, що відіграє важливу роль у передачі сигналів, залучених до регуляції багатьох судинних функцій, таких як проникність клітин судинної стінки, синтез

позаклітинного матриксу, клітинний ріст, активація цитокінів, ангиогенез та регуляція судинного тонузу [17, 18]. Показано, що дисфункція всіх цих систем має місце за діабетичних умов та залучає ПКС-опосередковані механізми, як важливу ланку в патогенезі діабетичних мікро- [18] та макроангіопатій [16].

ПКС являє собою родину серин/треонін кіназ, що включає як мінімум 10 членів [19]. Вони каталізують реакцію фосфорилування та опосередковують величезну кількість сигнальних шляхів в еукаріотичних клітинах [19]. На основі гомології та чутливості до різноманітних активаторів, ізоформи ПКС поділяють на три підродини: класичні (classical, сПКС), нові (novel, нПКС) та атипові (atypical, аПКС) [19]. Класичні ізоформи ПКС складають ПКС- $\alpha$ , ПКС- $\beta 1$ , ПКС- $\beta 2$  та ПКС- $\gamma$  [20]. Цей підтип ПКС потребує для своєї активації діацилгліцерол (ДАГ) або форболові ефіри, іони  $\text{Ca}^{2+}$  та фосфатидилсерин (ФС) [20]. Підродина нових ПКС складається із ПКС- $\delta$ , ПКС- $\epsilon$ , ПКС- $\eta/\lambda$  (або ПКС L) та ПКС- $\theta$ , які потребують для активації ДАГ та ФС, але залишаються нечутливими до  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Атипові ізоформи ПКС включають в себе ПКС- $\zeta$  та ПКС- $\iota/\lambda$ , які потребують лише ФС та деякі інші ліпідні медіатори для своєї активації [19, 20]. У неактивному стані ПКС локалізовані, головним чином, у цитозольній фракції, й їхня транслокація до плазматичної мембрани клітини є ознакою активації [19]. Слід також зауважити, що ізоформи ПКС- $\mu$  та ПКС- $\nu$  зараз класифікуються як члени родини ДАГ-рецептор протеїнкіназ D (ПКД), які є серин/треонін кіназами надродини  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежних кіназ [22]. Велика кількість ізоформ ПКС ( $-\alpha$ ,  $-\beta 1$ ,  $-\beta 2$ ,  $-\gamma$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\eta$ ,  $-\zeta$ ,  $-\delta$ , та  $-\iota/\lambda$ ) експресується в судинних тканинах залежно від виду тварин, а також типу та віку судин [16, 20]. Було показано, що за умов ЦД у гладеньком'язових клітинах (ГМК) та ендотеліоцитах різноманітних судинних регіонів активуються або гіперекспресуються ізоформи ПКС- $\alpha$  [11, 23, 25], ПКС- $\beta 1$  [11], ПКС- $\beta 2$  [11, 23, 24], ПКС- $\gamma$ , ПКС- $\epsilon$  [11, 23], ПКС- $\zeta$  та ПКС- $\delta$  [11, 23, 25, 26].

Не дивлячись на існування достатньої кількості оглядів, що присвячені участі ПКС у діабетичних судинних ускладненнях, комплексна роль ПКС у механізмах зростання судинного тонузу за умов ЦД досі не була висвітлена належним чином. Тому представлений огляд ми сфокусували виключно на механізмах залучення ПКС до порушень судинного тонузу за умов ЦД.

### **Механізми активації ПКС у тканинах судинної стінки за умов ЦД**

*РФК-опосередкована активація ПКС за умов ЦД.* У цьому розділі розглядатимуться механізми активації ПКС у тканинах судинної стінки під дією гіперглікемії. Багато досліджень показали, що гіперглікемія за умов ЦД викликає збільшення реактивних форм кисню (РФК) та пов'язаний із цим оксидативний стрес, що є активатором ПКС [12]. З іншого боку, зворотним ефектом активації ПКС є подальше посилення утворення РФК та оксидативного стресу [15, 27]. Члени родини ПКС є високочутливими до оксидативного стресу [19]. Відомо, що РФК викликають внутрішньоклітинну транслокацію та активацію багатьох ізоформ ПКС у судинних тканинах [19]. Відомо, що як ендотеліальні клітини, так і ГМК, здатні продукувати РФК за рахунок багатьох ферментативних джерел [28].

За нормальних умов окисно-відновний стан клітин судинної стінки контролюється антиоксидантними ферментами та глутатіонним буфером [28]. Однак за діабетичних умов, коли цей баланс зміщується в бік окиснення (оксидативний стрес), це призводить до дисрегуляції сигнальних шляхів у ГМК та ендотелії [29–31]. У тканинах судинної стінки РФК виступають у ролі важливого вторинного посередника та здатні опосередковувати багато клітинних відповідей, у тому числі регуляцію скоротливості ГМК, а також проникність та функції ендотелію [28].

Первинною РФК, що продукується більшістю оксидоредуктаз є супероксид-аніон ( $\text{O}_2^-$ ), який утворюється внаслідок неповного відновлення молекулярного кисню [28]. У тканинах судинної

стілки  $O_2^-$  генерується декількома ферментами, зокрема, такими як нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатоксидаза (НАДФН-оксидаза або НОК) [32, 33], циклооксигеназа (ЦОГ) [34], альдегідоксидаза (АО) [9], ксантиоксидаза (КО) [35], глюкозооксидаза (ГО) [9], роз'єднана ендотеліальна NO-синтаза (eNOC) [32] та мітохондріальний електронно-транспортний ланцюг (ЕТЛ) [28, 33]. Після цього  $O_2^-$  перетворюється на більш стабільний перекис водню ( $H_2O_2$ ) за участю Mn-супероксид дисмутази (Mn-SOD або СОД2) та Cu-Zn-SOD (СОД1) [28]. У подальшому  $H_2O_2$  може бути перетворений на гідроксил-радикал (ОН $\cdot$ ) із менш виразними сигнальними властивостями ніж супероксид-аніон або  $H_2O_2$  [5, 28]. В ендотеліальних клітинах  $H_2O_2$  також може взаємодіяти з оксидом азоту II (NO) з утворенням іншої високоактивної РФК – пероксинітриду (ONOO $\cdot$ ) [5].

Встановлено, що РФК, які походять із мітохондрій, відіграють важливу сигнальну роль у судинних тканинах за умов ЦД [12, 33, 36]. Зокрема, залучення ЕТЛ до підвищеного утворення РФК за діабетичних умов було показано в ендотеліоцитах [37]. Відповідно до уніфікованої гіпотези, ініційоване гіперглікемією збільшення вмісту донорів електронів, що надходять із циклу трикарбонових кислот, призводить до зростання високого потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій унаслідок прокачування через неї протонів [28]. Це призводить до пригнічення електронного транспорту, головним чином, у комплексах I ЕТЛ (НАДН-дегідрогеназа) та III (убіхінон-цитохром-с-оксидоредуктаза) [28]. Коензим-Q (убіхінон) стає відновленим, що призводить до витоку електронів на шляху від коензіма-Q до  $O_2$ , із утворенням  $O_2^-$  та, потім,  $H_2O_2$  за участю СОД2, розташованій у матриксі мітохондрій, та СОД1, що локалізована в міжмембранному мітохондріальному просторі [10, 37]. Хоча показано, що комплекси ЕТЛ I та III є найвідповідальнішими за утворення  $O_2^-$  [28], порушення роботи в комплексах II та IV також може призводити до витоку електронів та зростання утворення

РФК [33]. Мітохондріальне утворення  $O_2^-$  також викликає внутрішньоклітинне зростання концентрації КПП [37], підвищує активність інших джерел РФК, таких як НОК, КО, а також викликає роз'єднання eNOC [38].

Багато досліджень свідчать про те, що НОК є одним з головних джерел РФК у тканинах судинної стінки за умов ЦД [32, 39–41]. НОК здатна модулювати активність ПКС, зокрема ПКС- $\beta$ , яка виявляє високу чутливість до оксидантів, що походять із НОК [42]. Уважається, що НОК є ключовим цитозольним джерелом оксидативного стресу в різноманітних типах клітин за діабетичних умов та генерує супероксид-аніон шляхом перенесення електронів від НАДФН до молекулярного кисню [27, 39, 43]. Важливість НОК як джерела РФК було показано як для судинних ГМК за умов ЦД [44], так і для ендотеліоцитів, де НОК2 та НОК4 є найрозповсюдженішими підтипами [15, 39, 40]. Підвищена активність НОК була показана в артеріях та венах пацієнтів з ЦД [32]. Важливо зауважити, що нещодавно НОК4 було ідентифіковано як субодиночку IV мітохондріальної цитохром-с-оксидази [45]. Зростання активності НОК за умов гіперглікемії може бути опосередковане КПП через їхні специфічні рецептори (РКПП), що викликає зростання експресії субодиночки НОК gp91 [41, 46, 47]. З іншого боку, гіперглікемія може спричиняти зростання експресії НОК, як це показано для ендотеліоцитів та судинних ГМК [15, 32, 39, 40, 44]. Утворення супероксид-аніону за участю НОК є важливим не лише як джерело РФК, але й тому, що воно може підсилювати утворення  $O_2^-$  іншими джерелами, такими як КО та eNOC [48].

Роз'єднана eNOC також відіграє роль у формуванні РФК за умов ЦД [32, 49, 50]. eNOC є кальцій-залежним флавопротеїном, який каталізує окиснення L-аргініну з утворенням NO [51]. Цей фермент містить НАДФН, і коли окиснення НАДФН роз'єднується із окисненням L-аргініну, електрони спрямовуються від флавінів до молекулярного кисню з утворенням  $O_2^-$  [51]. Загальною причиною роз'єднання eNOC є

зниження рівню кофактора eNOC тетрагідробіоптерину (BH4) [40, 49, 50, 52]. Гіперглікемія викликає зниження рівня BH4 та роз'єднання редуктазної та оксигеназної зон субодиноць eNOC [49]. У такому стані eNOC починає переносити електрони до молекулярного кисню замість L-аргініну, наслідком чого є зниження утворення NO та зростання утворення O<sub>2</sub><sup>-</sup> із наступним формуванням ONOO<sup>-</sup> [40, 52]. Зростання рівня ONOO<sup>-</sup> призводить до подальшого окиснення BH4 до тригідробіоптерину (BH3<sup>-</sup>) та хіноноїд-6,7-[8H]-H<sub>2</sub>-біоптерину (BH2) [53]. Підвищення експресії eNOC у цьому випадку ще більше погіршує ситуацію [53]. З іншого боку, викликане гіперглікемією руйнування цинк-тіолатного комплексу eNOC, S-глутатіонілювання та нестача L-аргініну також сприяють роз'єднанню eNOC [54–56].

Деякі дослідження свідчать про те, що КО також бере участь у формуванні оксидативного стресу в судинних тканинах за діабетичних умов [35, 57], і рівень її в стінці діабетичних судин є підвищеним [57]. Головним джерелом КО є печінка [58]. Спочатку печінка синтезує ксантиндегідрогеназу, яка потім перетворюється на КО шляхом

протеолізу. Вивільнення КО із печінки підвищується за умов гіперхолестеролемії, і циркулююча в крові КО може з часом адгезуватися на поверхні ендотеліальних клітин [59]. Відомо також, що ендотеліоцити можуть експресувати власну ксантиндегідрогеназу [58]. Альдегідоксидаза утворює РФК із альдегіда і також може відігравати роль у судинних діабетичних ускладненнях [9, 60]. За ЦД перекисне окиснення ліпідів та глікація протеїнів є звичайним явищем, і альдегіди є субстратом як для АО, так і для КО [9]. ГО опосередковує окиснення глюкози, що призводить до утворення вільних радикалів і формування оксидативного стресу за умов ЦД [9].

Таким чином, результати багаточисельних досліджень свідчать про те, що ЦД викликає зростання активності важливого регуляторного ферменту ПКС у тканинах стінки кровоносних судин. Важливим фактором, що призводить до активації ПКС за даних умов, є викликаний гіперглікемією оксидативний стрес. Він виникає внаслідок зростання утворення РФК, джерлом яких виступають мітохондріальний ЕТЛ, різноманітні оксигенази та роз'єднана eNOC.

1. *Zimmet P. Z.* The growing pandemic of type 2 diabetes: a crucial need for prevention and improved detection / P. Z. Zimmet // *Medicographia* – 2011. – V. 33, № 1. – P. 15–21.
2. *Madonna R.* Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes - part I: pathways of vascular disease in diabetes / R. Madonna, R. De Caterina // *Vasc. Pharmacol.* – 2011. – V. 54. – P. 68–74.
3. *Winer N.* Epidemiology of diabetes / N. Winer, J. R. Sowers // *J. Clin. Pharmacol.* – 2004. – V. 44. – P. 397–405.
4. Impaired coronary endothelium-dependent vasodilation is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and angiographically normal coronary arteries / Cosson E., Pham I., Valensi P. [et al.] // *Diabetes Care.* – 2006. – V. 29, № 1. – P. 107–112.
5. *Funk S. D.* Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes / S. D. Funk, A. Y. Jr, A.W. Orr // *International Journal of Vascular Medicine.* – 2012. – V. 2012. – P. 1–19.
6. *Rosberger D. F.* Diabetic retinopathy. Current concepts and emerging therapy / D. F. Rosberger // *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* – 2013. – V. 42. – P. 721–745.
7. *Arora M. K.* Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: An update / M. K. Arora, U. K. Singh // *Vasc. Pharmacol.* – 2013. – V. 58. – P. 259–71.
8. *Behnam-Rassouli M.* Microvascular complications of diabetes / Behnam-Rassouli M., Ghayour M. B., Ghayour N. // *J. Biol. Sci.* – 2010. – V. 10. – P. 411–423.
9. *Kolluru G. K.* Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing / G. K. Kolluru, S.C. Bir, C. G. Kevil // *Int. J. Vasc. Med.* – 2012. – V. 2012. – P. 1–30.
10. *Schaffer S. W.* Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited / S. W. Schaffer, C. J. Jong, M. Mozaffari // *Vasc. Pharmacol.* – 2012. – V. 57, № 5–6. – P. 139–149.
11. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells / Ramana K. V., Friedrich B., Tammali R. [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – V. 54. – P. 818–829.

12. *Giacco F.* Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // *Circ. Res.* – 2010. – V. 107, № 9. – P. 1058–1070.
13. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress / Brouwers O., Niessen P. M., Haenen G. [et al.] // *Diabetologia.* – 2010. – V. 53. – P. 989–1000.
14. *Vlassara H.* Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications / H. Vlassara, G. E. Striker // *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* – 2013. – V. 42. – P. 697–719.
15. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells / Inoguchi T., Li P., Umeda F. [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – V. 49. – P. 1939–1945.
16. *Geraldes P.* Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldes, G. L. King // *Circulation Research.* – 2010. – V. 106. – P. 1319–1331.
17. *Somlyo A. P.* Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase / A. P. Somlyo, A. V. Somlyo // *Physiol. Rev.* – 2003. – V. 83. – P. 1325–1358.
18. *Clarke M.* PKC inhibition and diabetic microvascular complications / M. Clarke, P. M. Dodson // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – V. 21, № 4. – P. 573–586.
19. *Cosentino-Gomes D.* Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation / D. Cosentino-Gomes, N. Rocco-Machado, J.R. Meyer-Fernandes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – V. 13. – P. 10697–10721.
20. *Steinberg S. F.* Structural basis of protein kinase C isoform function / S. F. Steinberg // *Physiol. Rev.* – 2008. – V. 88. – P. 1341–1378.
21. *Duquesnes N.* PKC-delta and PKC-epsilon: Foes of the same family or strangers? / N. Duquesnes, F. Lezoualc'h, B. Crozatier // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – V. 51. – P. 665–673.
22. *Wang Q. J.* PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling / Q. J. Wang // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2006. – V. 27. – P. 317–323.
23. Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin induced diabetic rats / N. Kang, G. Alexander, J. K. Park [et al.] // *Kidney International.* – 1999. – V. 56, № 5. – P. 1737–1750.
24. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation / Inoguchi T., Battan R., Handler E. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1992. – V. 89. – P. 11059–11063.
25. Вплив сайленсингу генів  $\alpha$  та  $\delta$  ізоформ протеїнкінази C на йонну каналопатію та ендотеліальну дисфункцію аорти діабетичних щурів / К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, І. В. Кізуб [та ін.] // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2013. – Т. 35, № 4–5. – С. 53–59.
26. PKC- $\delta$  isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat / Klymenko K. I., Novokhatska T. V., Kizub I. V. [et al.] // *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* – 2014 (in press).
27. *Gao L.* Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling / L. Gao, G. E. Mann. // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – V. 82. – P. 9–20.
28. *Knock G. A.* Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function / G. A. Knock, J. P. T. Ward // *Antiox. Redox Signal.* – 2011. – V. 15, № 6. – P. 1531–1547.
29. *Leo C. H.* 39,49-Dihydroxyflavonol reduces superoxide and improves nitric oxide function in diabetic rat mesenteric arteries / Leo C. H., Hart J. L., Woodman O. L. // *PLoS One.* – 2011. – V. 6, № 6. – P. e20813.
30. Effects of the superoxide dismutase mimetic tempol on impaired endothelium-dependent and endothelium-independent relaxations in type II diabetic rats / Oniki H., Goto K., Fujii K. [et al.] // *Clin. Exp. Hypertens.* – 2012. – V. 35, № 2. – P. 112–119.
31. Exacerbation of endothelial dysfunction during the progression of diabetes: role of oxidative stress / Huang A., Yang Y. M., Feher A. [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* – 2012. – V. 302, № 6. – P. R674–R681.
32. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase / Guzik T. J., Mussa S., Gastaldi D. [et al.] // *Circulation.* – 2002. – V. 105. – P. 1656–1662.
33. *Shen G. X.* Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase / G. X. Shen // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2010. – V. 88. – P. 241–248.
34. Impaired nitric oxidemediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus / S. B. Williams, J. A. Cusco, M. A. Roddy [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1996. – V. 27. – P. 567–574.
35. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol / Desco M.–C., Asensi M., Marquez R. [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – V. 51. – P. 1118–1124.
36. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications / Nishikawa T., Kukidome D., Sonoda K. [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2007. – V. 77. – P. 41–45.
37. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage / Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L. [et al.] // *Nature.* – 2000. – V. 404. – P. 787–790.
38. Mitochondrial redox signaling: interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress / Schulz E., Wenzel P., M nzel T. [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014 – V. 20, № 2. – P. 308–324.

39. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity / Sonta T., Inoguchi T., Tsubouchi H. [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37. – P. 115–123.
40. *Ding H.* Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells / H. Ding, M. Aljofan, C. R. Triggler // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – V. 212. – P. 682–689.
41. *AGER1* regulates endothelial cell NADPH oxidase-dependent oxidant stress via PKC- $\delta$ : implications for vascular disease / W. Cai, M. Torreggiani, Z. Li // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2010. – V. 298. – P. C624–C634.
42. *Shao B.* Hyperglycaemia promotes cerebral barrier dysfunction through activation of protein kinase C- $\beta$ . / B. Shao, U. Bayraktutan // *Diabetes Obes. Metab.* – 2013. – V. 15, № 11. – P. 993–999.
43. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy / Kitada M., Koya D., Sugimoto T. [et al.] // *Diabetes.* – 2003. – V. 52. – P. 2603–2614.
44. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cell involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species / Liu S., Ma X., Gong M. [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – V. 42. – P. 852–863.
45. *Block K.* Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes / K. Block, Y. Gorin, H. E. Abboud. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106. – P. 14385–14390.
46. *Li L.* Activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase by advanced glycation end products links oxidative stress to altered retinal vascular endothelial growth factor expression / L. Li, G. Renier // *Metabolism.* – 2006. – V. 55. – P. 1516–1523.
47. Role of advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice / Su J., Lucchesi P. A., Gonzalez-Villalobos R. A. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. a – V. 28, № 8. – P. 1432–1438.
48. *Ray R.* NADPH oxidase and endothelial function / R. Ray, A. M. Shah // *Clin. Sci.* – 2005. – V. 109, № 3. – P. 217–226.
49. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db-/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability / Pannirselvam M., Verma S., Anderson T. J. [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 136. – P. 255–263.
50. *Cai S.* Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells / S. Cai, J. Khoo, K. M. Channon // *Cardiovasc. Res.* – 2005. B. – V. 65, № 4. – P. 823–831.
51. *Forstermann U.* Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W. C. Sessa. // *Eur. Heart J.* – 2012. – V. 33. – P. 829–837.
52. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes / Thum T., Fraccarollo D., Schultheiss M. [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – V. 56, № 3. – P. 666–674.
53. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes / D. Pitocco, F. Zaccardi, E. Di Stasio [et al.] // *Rev. Diabet. Stud.* – 2010. – V. 7. – P. 15–25.
54. *Zou M. H.* Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite / M. H. Zou, C. Shi, R. A. Cohen // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 109, № 6. – P. 817–826.
55. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation / Cai S., Khoo J., Mussa S. [et al.] // *Diabetologia.* – 2005. A. – V. 48, № 9. – P. 1933–1940.
56. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function / Chen C. A., Wang T. Y., Varadharaj S. [et al.] // *Nature.* – 2010. – V. 468. – P. 1115–1118.
57. *Inkster M. E.* Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats / M. E. Inkster, M. A. Cotter, N. E. Cameron // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – V. 561. – P. 63–71.
58. *Li H.* Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention / Li H., Horke S., Forstermann U. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2013. – V. 34, № 6. – P. 313–319.
59. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits / White C. R., Darley-Usmar V., Berrington W. R. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – P. 8745–8749.
60. Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues / Kundu T. K., Hille R., Velayutham M. [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – V. 460, № 1. – P. 113–121.

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

### **Участие протеинкиназы С в механизмах нарушения сосудистого тонуса при сахарном диабете. Часть 1**

Сахарный диабет (СД) сопровождается развитием нарушений сосудистого тонуса. Гипергликемия является ключевым фактором, ответственным за развитие этих нарушений, и реализует свой эффект на сосудистый тонус через многие внутриклеточные механизмы. Значительная часть таких механизмов включает активацию важного регуляторного фермента протеинкиназы С (ПКС),

---

---

вовлеченного в регуляцию сосудистой функции. Основным фактором активации ПКС в сосудистой стенке при диабете является оксидативный стресс, вызванный гипергликемией. Прежде всего, активацию ПКС в сосудистой стенке при СД вызывают реактивные формы кислорода, образованные различными оксидазами, такими как НАДФН-оксидаза, циклооксигеназа, альдегидоксидаза, ксантинооксидаза, глюкозооксидаза, разобщенная эндотелиальная NO-синтаза (эНОС), а также митохондриальная электронно-транспортная цепь.

*Ключевые слова: сахарный диабет, эндотелий, гипергликемия, протеинкиназа С, реактивные формы кислорода, сосудистый тонус, гладкие мышцы сосудов*

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

### **Protein kinase C participation in mechanisms of vascular tone abnormality in diabetes mellitus. Part 1.**

Diabetes mellitus (DM) is a highly prevalent complex syndrome worldwide. DM leads to multiple dysfunctions including cardiovascular diseases, DM is the one of the major causes of morbidity, mortality, end-stage renal disease, and blindness. Hyperglycemia is considered to be a key factor responsible for the development and progression of vascular complications in diabetes. Several hyperglycemia-associated mechanisms have been identified to contribute to the development of vascular dysfunction associated with DM. These mechanisms include oxidative stress, the polyol pathway flux, accelerated formation of advanced glycation end products (AGEs), increased shunting of excess glucose through the hexosamine pathway, and activation of C-mitogen-activated protein kinase and protein kinase C (PKC) pathways. PKC is an important regulatory enzyme involved in the vascular function regulation. Activation of PKC in vascular wall in diabetes is induced by oxidative stress. Overproduction of reactive oxygen species by NADPH oxidase (Nox), cyclooxygenase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase, glucose oxidase, uncoupled endothelial nitric oxide synthase, and mitochondrial electron transport chain lead to activation of PKC in vascular tissues in DM. Hyperglycemia leads to mitochondrial electron transport inhibition mainly at the complex I and III with generation of superoxide ( $O_2^-$ ) transformed then to hydrogen peroxide by superoxide dismutases. On the other hand, hyperglycaemia increases activity of Nox which generates  $O_2^-$  by electron transferring from NADPH to molecular oxygen. Nox activation is mediated by AGEs through their specific receptors (RAGEs). Uncoupled eNOS also play a role in ROS generation in DM. Hyperglycaemia leads to eNOS uncoupling by diminishing level of tetrahydrobiopterin resulting in generation of  $O_2^-$  and peroxynitrite formation. All these events leads to oxidative stress and PKC activation in vascular wall.

*Key words: diabetes mellitus, endothelium, hyperglycemia, protein kinase C, reactive oxygen species, vascular tone, vascular smooth muscle*

---

*Надійшла: 03.02.2014 р.*

**Контактна особа:** Кізуб Ігор Володимирович, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, відділ експериментальної терапії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: +38 0 44 456 02 88.  
Електронна пошта: buzzmann@ukr.net



В. Ф. Марієвський<sup>1</sup>, Є. П. Воронін<sup>2</sup>, І. С. Чекман<sup>3</sup>, А. І. Гребельник<sup>3</sup>

## Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид: перспективний біоцидний засіб

<sup>1</sup>ДУ«Інститут епідеміології та інфекційних хвороб  
імені Л. В. Громашевського НАМН України», м. Київ

<sup>2</sup>Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України, м. Київ

<sup>3</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

**Ключові слова:** полігексаметиленгуанідину гідрохлорид, антибіотикорезистентність, біоцидний засіб, дезінфектант, нозокоміальні інфекції

Натепер питання раціональної антибіотикотерапії залишається актуальним. За даними ВООЗ лише 25–50 % хворих одержують адекватну антибактеріальну терапію. Внаслідок недоцільного застосування антибіотиків та дезінфікуючих засобів число резистентних штамів постійно зростає, а полірезистентні збудники інфекційних захворювань мають тенденцію до розповсюдження. Тому надзвичайно актуальним є пошук та створення нових антимікробних препаратів [2, 3, 5, 6, 14].

Майже 70 % інфекцій викликають мікроорганізми, резистентні до одного чи декількох антибіотиків [10]. Лікування інфекційних хвороб, викликаних резистентними мікроорганізмами, є важливою проблемою для охорони здоров'я в усьому світі. При лікуванні таких захворювань значно важче вибрати антибіотикотерапію, особливо емпіричну. Навіть після отримання результатів бактеріологічного діагнозу вибір антибіотика може бути важким завданням для лікаря. Важливо розуміти, що резистентність також впливає на лікування хворих, інфікованих нерезистентними мікроорганізмами [12].

У 2008 році The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) визначила високий рівень резистентності грамнегативних штамів у всій Європі:

– 17 % ізолятів *P. aeruginosa* були резистентні до 3 і більше класів антибіотиків;

– 32–78 % штамів *E. coli* були резистентними до амінопеніцилінів, з ко-резистентністю до 4 класів антимікробних засобів;

– 14 % ізолятів *K. pneumoniae* були резистентними до фторхінолонів, цефалоспоринов 3-го покоління та до аміноглікозидів [25].

Незважаючи на актуальність і епідеміологічне значення, стан чутливості збудників нозокоміальних інфекцій до протимікробних препаратів повною мірою не з'ясовано. До збудників внутрішньолікарняних інфекцій (ВЛІ) відносять переважно умовно-патогенні бактерії, що характеризуються множинною стійкістю до антибіотиків [4].

Нозокоміальні інфекції є причиною появи ускладнень серед госпіталізованих пацієнтів та головною причиною смертності [26]. Підвищення рівня нозокоміальних інфекцій пов'язано з появою та розповсюдженням штамів полірезистентних мікроорганізмів, у тому числі й метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) [18].

Значний рівень резистентності мікроорганізмів до антибіотиків потребує пошуку нових сполук з антимікробною дією та розробки на їхній основі нових більш ефективних лікарських засобів.

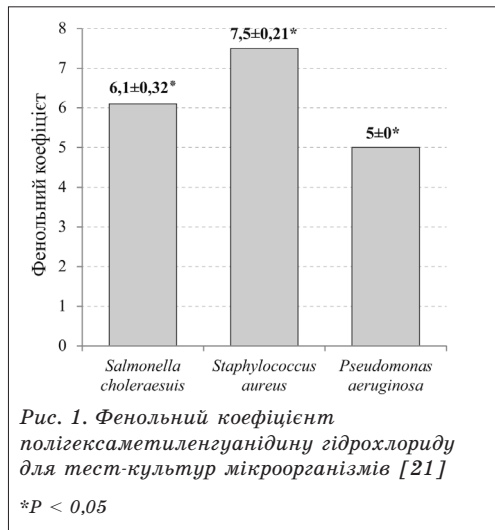
Катіонні біоциди понад півстоліття займають чільне місце серед агентів, які використовують для лікування перехресних інфекцій, що сприяло зниженню рівня внутрішньолікарняних інфекцій [11]. Коректне застосування цих біоцидів відіграє важливу роль у ліквідації інфекцій у лікарнях та стоматологічних клініках [19].

До високомолекулярних катіонних поверхнево-активних речовин групи гуанідинів відноситься полігексаметилен-

гуанідин. Він має широкий спектр дії проти грампозитивних, грамнегативних бактерій, грибів, дріжджів [20] та вірусів, включаючи вірус імунодефіциту людини [15].

Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид (ПГМГ-ГХ) – полімер з високою розчинністю у воді, без запаху, кольору [17], значно менше токсичний та шкідливий, ніж інші дезінфектанти, які застосовують для людей і тварин у концентрації  $\leq 1\%$  [20]. Щоб продемонструвати його потенційне використання як менш шкідливого протимікробного засобу, ніж наявні, антибактеріальна активність ПГМГ-ГХ була протестована на таких штаммах мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, метицилін резистентний золотистий стафілокок (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* та *Escherichia coli* [21].

Для оцінки дезінфікуючої активності ПГМГ-ГХ визначали фенольний коефіцієнт на мікроорганізмах *S. aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 та *P. aeruginosa* ATCC 15442 у жорсткій воді. Фенольний коефіцієнт ПГМГ-ГХ відносно *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* та *S. aureus* склав 5; 6,1 та 7,5 відповідно [7, 21, 24]. Наведені дані свідчать про те, що ПГМГ-ГХ проявляє виражену дезінфікуючу активність. Ці результати також показали відмінності в бактеріальній стійкості до ПГМГ-ГХ. Як показано на рисунку 1, *P. aeruginosa* виявилася більш стійкою до ПГМГ-ГХ, ніж *S. choleraesuis* та *S. aureus*. Резистентність бактерій до дезінфектантів та антисептиків може залежати від особливостей структури шарів зовнішньої клітинної стінки, яка може виступати як бар'єр, а також від утворення біоплівки [19, 23]. Клітинна стінка *S. aureus* складається переважно з пептидоглікану та тейхоевих кислот, які не є бар'єром для антисептиків та дезінфектантів. Чутливість *S. aureus* до ПГМГ-ГХ може виникнути в зв'язку з тим, що стінка бактерій є легкопроникною для речовини із високою молекулярною масою [19]. Тому грамнегативні бактерії є більш резистентними до антисептиків та дезінфектантів, ніж



грампозитивні, тому що їхня мембрана відіграє роль бар'єра, який зменшує потрапляння багатьох антибактеріальних агентів у цитоплазму [22]. Грамнегативні бактерії, у тому числі й *P. aeruginosa* більш резистентні до багатьох антисептиків та дезінфектантів. Це прояв природної стійкості [16], і тому такі мікроорганізми є особливо небезпечними патогенами.

Висока резистентність грамнегативних мікроорганізмів до антисептиків та дезінфектантів може бути пояснена різницею в складі зовнішньої мембрани, умістом ліпополісахаридів, протеїнів та полісахаридів, а також довжиною фосфоліпідів та їхніх розгалужень порівняно з *S. choleraesuis* та *S. aureus*. Крім того, високій стійкості *P. aeruginosa* сприяє її властивість колонізувати поверхні у вигляді біоплівки [19]. Біоплівка є складною агрегацією мікроорганізмів, що ростуть на твердій поверхні. Вона характеризується структурною неоднорідністю, генетичною різноманітністю, складними взаємодіями між сукупністю мікроорганізмів та позаклітинною «матрицею» полімерних речовин [13]. McDonnell & Russell [19] виявили, що біоплівка може утворювати перешкоди між клітинами всередині біоплівки та дезінфікуючими засобами. Крім того, відбувається хімічна взаємодія між дезінфікуючими речовинами та біоплівкою, а клітини в біоплівці можуть виробляти ферменти деградації, які нейтралізують хімічні речовини.

## Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) та мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) ПГМГ-ГХ

При концентраціях ПГМГ-ГХ менших за 0,04 % жодного впливу на ріст *MRSA* не було. Однак, при концентраціях, вищих за 0,04 %, відбувалося інгібування росту *MRSA*. Для *E. coli* найменша концентрація дезінфектанту, яка припиняла ріст, складала 0,005 % [21]. Найнижчими концентраціями, які інгібують ріст *MRSA* і *E. coli* були 0,040 % та 0,005 % відповідно, тому ці концентрації можуть визначитися як МІК ПГМГ-ГХ для *MRSA* та *E. coli*. Аліквоти з пробірок, що містять випробовувані організми та ПГМГ-ГХ у концентрації вище МІК ( $\geq 0,040$  % для *MRSA* і  $\geq 0,005$  % для *E. coli*), засівали в чашки з живильним агаром без ПГМГ-ГХ. При інкубації протягом 48 год при 37 °С ніякого росту не спостерігали, що вказує на бактерицидну дію ПГМГ-ГХ. МБК ПГМГ-ГХ складає 0,005 % для *E. coli* та 0,040 % для *MRSA*, такі самі значення МІК для обох тест-культур [19]. ПГМГ-ГХ призводить до загибелі бактеріальних клітин за тої найнижчої концентрації, за якої проявляє свою дію. Бактерицидного ефекту ПГМГ-ГХ при МБК відносно *MRSA* та *E. coli* було досягнуто через 1,5 хв. Значення МБК для *E. coli* у 8 разів нижче від значення МБК для *MRSA*, це дає можливість припустити, що *E. coli* у 8 разів чутливіша до ПГМГ-ГХ, ніж *MRSA* [21]. Така швидка дія та висока активність ПГМГ-ГХ навіть при застосуванні дезінфектанту в низьких концентраціях свідчить про те, що ПГМГ-ГХ є дуже ефективним дезінфікуючим засобом і може розглядатися як перспективний антимікробний засіб для застосування в клінічній практиці.

## Механізм дії ПГМГ-ГХ на бактеріальну клітину

Дані рисунку 2 демонструють механізм дії ПГМГ-ГХ на бактеріальну клітину. До обробки дезінфектантом клітини були неушкодженими, а клітинна оболонка та цитоплазма не були роз'єднаними (рис. 2 а). Клітинна стінка є основною мішенню дії ПГМГ-ГХ. Як показано на рисунку 2 б, ПГМГ-ГХ проникає крізь клітинну оболонку, водночас пошкоджуючи клітинну стінку та мембрану. Це призводить до розриву клітинної стінки та вивільнення цитоплазматичного вмісту [21].

Похідні гуанідину швидко притягуються до негативно зарядженої поверхні бактеріальної клітини, мають здатність сильно та специфічно адсорбуватися на фосфатовмісних сполуках. Цілісність зовнішньої мембрани порушується, а полімери притягуються до внутрішньої мембрани. Відбувається зв'язування похідних гуанідину з фосфоліпідами, що призводить до повної втрати функцій мембрани [11, 19].

Як показано на рисунку 2 б, матеріал усередині клітини осаджується, що свідчить про пряму взаємодію між ПГМГ-ГХ і цитоплазматичними компонентами мікроорганізмів. Проникнення ПГМГ-ГХ усередину цитоплазми може викликати осадження білків і нуклеїнових кислот, викликаючи згортання цитозолу [19].

Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид є катіонним антимікробним агентом, бактерицидні функції якого зумовлені властивістю позитивно заряджених молекул дезінфектанту швидко зв'язуватися з цитоплазматичною мембраною, ліпополісахаридними і

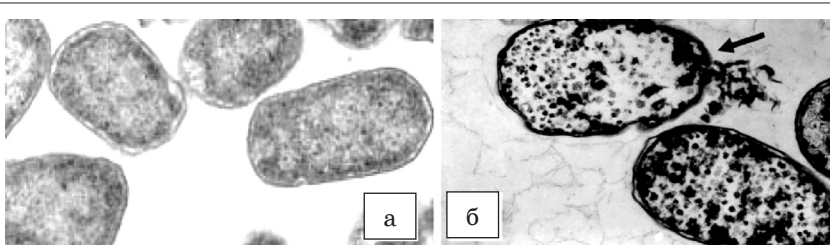


Рис. 2. Ультроструктура клітин *E. coli* за дії полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (трансмійна електронна мікроскопія) [21]:

а) *E. coli* (контроль),

б) *E. coli* після 10-хв інкубації з 0,05 % розчином полігексаметиленгуанідину

муреїновими компонентами клітинної стінки. Загибель бактеріальної клітини викликана критичними змінами в місцях контакту з дезінфектантом з подальшим руйнуванням клітинної стінки та лізисом клітин [8, 11].

ПГМГ є перспективним для створення комбінованого антимікробного засобу, який би проявляв виражену антимікробну дію та сорбційні властивості [1]. Одним з інгредієнтів такого комбінованого препарату може бути високодисперсний кремнезем – новий високо-ефективний сорбент, розроблений співробітниками кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та науковцями Інституту хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України.

Серед очікуваних ефектів такої комбінації необхідно відзначити сорбційну активність відносно токсичних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, тканинних метаболітів (піровиноградна

та молочна кислоти, перекисні сполуки, продукти окиснення амінокислот, поліпептиди, ліпіди тощо) і продуктів деградації фібрину [9].

## Висновки

Вченими світу проводяться дослідження з вивчення протимікробних властивостей полігексаметиленгуанідину гідрохлориду. Встановлено, що дана сполука проявляє виражену протимікробну активність відносно різних мікроорганізмів.

У науковій літературі відсутні дані про фармакологічні та протимікробні властивості композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом. Розробка технології отримання такого оригінального композиту та вивчення його властивостей сприятиме впровадженню в медичну практику нового лікарського засобу з протимікробними та сорбційними властивостями.

1. Березняков И. Г. Антибактериальные средства: стратегия клинического применения / И. Г. Березняков. – Х. : Константа, 1997. – 200 с.
2. Горчакова Н. А. Клиническая фармакология антибиотиков группы цефалоспоринов / Горчакова Н. А. // *Therapia* – 2008. – № 5 (26). – С. 42–48.
3. Кишони Р. Новая стратегия применения антибиотиков (Новости фармации) / Кишони Р. // *Доктор медицины*. – 2007. – № 5. – С. 59.
4. Салманов А. Г. Резистентність бактерій до антисептиків та дезінфікуючих засобів / Салманов А. Г., Марієвський В. Ф., Хобзей М. К. // *Український медичний часопис* – 2010. – № 6 (80). – С. 51–56.
5. Шостакович-Корецькая Л. Р. Проблема антимікробної резистентності в терапії острих респираторних захворювань у дітей / Шостакович-Корецькая Л. Р. // *Здоровье ребенка*. – 2011. – № 3. – С. 75–80.
6. Цефалоспорины III поколения в лечении внебольничной пневмонии у детей / Юлиш Е. Ю., Чернышова О. А., Сорока Ю. А. [et al.] // *Соврем. педиатрия*. – 2010. – № 5 (23). – С. 120–125.
7. Beloian A. Disinfectants. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th edn. Edited by W. Horwitz & G. W. Latimer / Beloian A. // *Jr. Association of Official Analytical Chemists International*. – 2005. – P. 133–146.
8. Broxton P. Binding of some polyhexamethylene biguanides to the cell envelope of *Escherichia coli* ATCC 8739 / Broxton P., Woodcock P. M. & Gilbert P. // *Microbios*. – 1984. – V. 41. – P. 15–22.
9. Chaloupka K. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications / Chaloupka K. // *Trends Biotechnol.* – 2010. – V. 28, № 11. – P. 580–588.
10. Esposito S. Antimicrobial treatment for Intensive Care Unit (ICU) infections including the role of the infectious disease specialist / Esposito S, Leone S. // *Int J Antimicrob Agents*. – 2007. – V. 29. – P. 494–500.
11. Gilbert P. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / Gilbert P., Moore, L. E. // *J. Appl Microbiol.* – 2005. – V. 99 – P. 703–715.
12. The global impact of drug resistance / Howard D. H., [et al.] // *Clin Infect Dis*. – 2003. – V. 15, № 36 (Suppl 1). – P. 4–10.
13. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell / Ishii S., Shimoyama T., Hotta Y., Watanabe K. // *BMC Microbiol.* – 2008. – V. 8. – P. 6–18.
14. Kardas P. Blinded comparison of 13 common pediatric antibiotic suspensions / Kardas P., Muras M. // *Wiad. Lek.* – 2005. – V. 58, № 1–2. – P. 15–20.
15. Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1 / Krebs F. C., Miller S. R., Ferguson // *Biomed Pharmacother.* – 2005. – V. 59. – P. 438–445.
16. Kumar A. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake / Kumar A., Schweizer H. P. // *Adv Drug Deliv Rev* – 2005 – V. 57. – P. 1486–1513.

17. Kuznetsov Y. I. Physicochemical aspects of metal corrosion inhibition in aqueous solutions / Kuznetsov Y. I. // Russ. Chem. Rev. – 2004. – V. 73. – P. 75–87.
18. Nosocomial infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*: relationships with antibiotic use and cost drivers / Mauldin P. D., Salgado C. D., Durkalski V. L. & Bosso J. A. // Ann Pharmacother. – 2004. – V. 42. – P. 317–326.
19. McDonnell G. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance / McDonnell G., Russell A. D. // Clin Microbiol Rev. – 1999. – V. 12. – P. 147–179.
20. Muller G. Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / Muller G., Kramer A. // J Orthop Res. – 2005. V. 23. – P. 127–133.
21. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections / Oulé M. K, Azinwi R, Bernier A. M. [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2008 – V. 57. – P. 1523–1528.
22. A family of Gram-negative outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria / Paulsen I. T., Park J. H., Choi P. S., Saier M. H. // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V. 156. – P. 1–8.
23. Russell A. D. Mechanisms of bacterial resistance to biocides / Russell A. D. // Int Biodeterior Biodegradation. – 1995. – V. 36. – P. 247–265.
24. Springthorpe S. La de'sinfection des surfaces et de l'e'quipement / Springthorpe S. // J. Can. Dent Assoc. – 2000. – V. 66. – P. 558–560.
25. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System annual report 2008. Доступний за посиланням: [http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/#tcm:61-25397](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/#tcm:61-25397)
26. WHO. Prevention of Hospital-Acquired Infections: a Practical Guide, 2nd edn, document WHO/CDS/CSR/EPH/2002/12. P. 1–64. Geneva: World Health Organization.

**В. Ф. Мариевский, Е. Ф. Воронин, И. С. Чекман, А. И. Гребельник**

**Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид: перспективное биоцидное средство**

В этой обзорной статье рассматривается перспектива использования полигексаметиленгуанидина гидрохлорида как биоцидного средства. Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид – антимикробное биоцидное средство группы гуанидинов. Описана бактерицидная активность против *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. choleraesuis*, и механизм действия дезинфектанта на бактериальную клетку, его эффективность против основных возбудителей нозокомиальных инфекций. В наших будущих исследованиях планируется разработка комплексного антимикробного средства, содержащего полигексаметиленгуанидина гидрохлорид и нанодисперсный кремнезем, которое будет обладать как антибактериальными, так и сорбционными свойствами. Приведены перспективы изучения полигексаметиленгуанидина гидрохлорида в составе композита с нанодисперсным кремнеземом.

*Ключевые слова:* полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, антибиотикорезистентность, биоцидное средство, дезинфектант, нозокомиальные инфекции

**V. F. Marievsky, E. F. Voronin, I. S. Chekman, A. I. Grebelnyk**

**Polyhexamethylene guanidine hydrochloride as a perspective biocidal medication**

In the review article the use of polyhexamethylene guanidine hydrochloride as a perspective biocidal and effectiveness medication against major pathogens of nosocomial infections was discussed. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMGH) is an antimicrobial biocide of the guanidine family. Bactericidal activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Salmonella choleraesuis* was described. The phenol coefficient values determined with *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* and *P. aeruginosa* were 7.5, 6.1 and 5, respectively. PHMGH killed MRSA and *E. coli* at concentrations as low as 0.04 and 0.005% (w/v), respectively, within 1.5 min. The mode of action of PHMGH was elucidated by transmission electron microscopy: the cell envelope was broken, resulting in cell content leakage into the medium. PHMGH can be used as an odourless, colourless, non-corrosive and harmless disinfectant for hospital and household facilities. There is a lack of data on the pharmacological and antimicrobial properties of composite nanosilica and polyhexamethylene guanidine hydrochloride. In our further research is planned to develop a comprehensive antimicrobial agent – a composite nanosilica and polyhexamethylene guanidine hydrochloride, which will have both anti-bacterial properties and sorption activity. It has been reviewed the perspective of studying composite nanosilica and polyhexamethylene guanidine hydrochloride.

*Key words:* polyhexamethylene guanidine hydrochloride, antimicrobial resistance, biocidal medication, disinfectant, nosocomial infections

Надійшла: 27.01.2014 р.

**Контактна особа:** Гребельник Анна Ігорівна, аспірант, кафедра фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03057. Тел.: +38 067 276 14 43. Електронна пошта: [angrad2007@mail.ru](mailto:angrad2007@mail.ru)

Є. В. Бондарєв

## Експериментальне обґрунтування застосування глюкозаміну гідрохлориду як засобу ноотропної дії

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

*Ключові слова:* глюкозаміну гідрохлорид, ноотропна активність

Сьогодні профілактика та лікування порушень вищих психічних функцій, у тому числі пам'яті є однією з актуальних та пріоритетних медичних та соціальних проблем. Такі порушення зустрічаються при численних захворюваннях, зокрема, при інсультах, нейроtraвмі, токсичних ураженнях головного мозку, хворобі Альцгеймера та ін. [5, 7, 12–14].

За визначенням ВООЗ, до ноотропів належать препарати, що виявляють прямий стимулюючий вплив на процеси навчання, поліпшують пам'ять, розумову діяльність, підвищують стійкість мозку до несприятливих впливів [1, 3, 14, 17]. Ця група відома понад 40 років з моменту створення пірацетаму. З його відкриттям розпочався принципово новий етап у розвитку психофармакотерапії та сформувалася ноотропна концепція. Сьогодні група ноотропів включає близько 100 найменувань і постійно розширюється за рахунок відкриття речовин з новими механізмами дії [14, 15, 17]. Існує значна потреба в таких препаратах, які здатні покращити пам'ять. Тому створення нових препаратів із подібною фармакологічною активністю є актуальним завданням [3, 10, 11, 14].

Про важливість препаратів з ноотропною дією свідчать дані про їхнє широке застосування. Так, ноотропи приймає біля третини дорослого населення Європи та Японії, у зв'язку з чим деякі автори висловлюють точку зору, що їх можна віднести до групи життєво важливих препаратів [2, 6, 10, 13, 14].

Одним з найживіших засобів цієї групи дотепер є пірацетам [15, 17]. Цей препарат покращує пластичний та енергетичний обмін, оптимізує гемодинаміку в головному мозку. Проте пірацетам може викликати несприятливе збуджен-

ня центральної нервової системи, підвищену дратівливість, порушення сну, диспепсичні явища, він здатний загострювати перебіг коронарної недостатності, спричиняти алергічні реакції та збільшувати масу тіла. Його заборонено застосовувати хворим на гостру ниркову недостатність та дітям до 1 року.

Перспективним є пошук засобів з ноотропною активністю серед похідних глюкозаміну. Глюкозамін є одним з найважливіших структурних компонентів організму, вміст якого в тканинах при багатьох захворюваннях змінюється. Похідні глюкозаміну мають полімодальні фармакологічні властивості, серед яких церебропротекторні, мембраностабілізуючі, антиоксидантні [4, 8, 9]. Глюкозаміну гідрохлорид відомий також як знеболювальний, протизапальний, хондро- та фригопротекторний препарат. Він стимулює біосинтез аміногліканів, сприяє відновленню хрящових поверхонь суглобів, нормалізує продукцію внутрішньосуглобової рідини, зменшує дегенеративні зміни в суглобах та поліпшує їхню рухливість [4, 10, 16].

Препарати глюкозаміну характеризуються високою біодоступністю, а безпечність підтверджується даними численних клінічних досліджень [8, 9, 16].

*Мета дослідження* – з'ясування можливості застосування глюкозаміну гідрохлориду за новим призначенням: для лікування порушень пам'яті.

*Матеріали та методи.* Вивчення ноотропної дії глюкозаміну гідрохлориду проводили в зіставленні з препаратом порівняння пірацетамом за загально-живим тестом умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) на білих мишах-самцях масою 15–20 г на моделі порушення пам'яті, що викликана внутрішньоочеревинним введенням скополаміну в дозі 1,5 мг/кг [11].

Для визначення ноотропної активності використано режим профілактичного введення глюкозаміну гідрохлориду (Sigma, США), розчин якого вводили внутрішньошлунково протягом 3 діб у дозах 25, 50 та 100 мг/кг. Препарат порівняння пірацетам (ФФ «Дарниця») вводили внутрішньошлунково в дозі 200 мг/кг [10] протягом 3 діб. Контрольні миші отримували відповідну кількість фізіологічного розчину.

Лабораторних тварин розподілили на 6 груп відповідно до препарату, який вони одержували та його дози: 1 група – інтактний контроль,  $n = 7$ ; 2 група – контрольна патологія (модель амнезії – скополамін 1,5 мг/кг внутрішньоочеревинно),  $n = 7$ ; 3 група – глюкозаміну гідрохлорид, 25 мг/кг + скополамін,  $n = 6$ ; 4 група – глюкозаміну гідрохлорид, 50 мг/кг + скополамін,  $n = 6$ ; 5 група – глюкозаміну гідрохлорид, 100 мг/кг + скополамін,  $n=6$ ; 6 група – пірацетам (200 мг/кг внутрішньошлунково) + скополамін,  $n = 6$ .

У мишей групи інтактного контролю формували УРПУ без амнезуювального впливу скополаміну. Порушення пам'яті моделювали уведенням скополаміну через 30 хв після останнього введення досліджуваних субстанцій або пірацетаму. Далі тварин розміщували на освітленій платформі приладу для вивчення УРПУ та реєстрували латентний період безумовного рефлексу – входу до темної

камери, де в мишей формували УРПУ шляхом впливу електричного струму 0,5–0,6 мА через електродну підлогу. Через 24 год повторно визначали латентний період входу тварин до темної камери. Мишей, які не відвідували її протягом 3 хв, уважали такими, що досягли критерію навченості, приймаючи латентний період за 180 с.

Як показники ноотропної дії обрано збільшення латентного періоду входу до темної камери та кількість мишей, що досягли критерію навченості через 24 год після амнезії, викликані скополаміном. У разі обліку результатів у вигляді середня  $\pm$  стандартна помилка середньої, статистичну достовірність міжгрупових відмінностей розраховували за критерієм Ст'юдента, у разі обліку в альтернативній формі – за кутовим перетворенням Фішера.

**Результати та їх обговорення.** Результати дослідження наведено в таблиці. Аналіз даних таблиці свідчить, що в групі інтактного контролю за 24 год латентний період входу до темної камери збільшився в 8,6 разу ( $p < 0,05$ ), тобто сформувалась УПРУ. Кількість мишей, які не входили до темної камери протягом 3 хв, становила 71,4 %. У 100 % мишей, яких піддавали впливу скополаміну (група контрольної патології), спостерігали амнезію: вони не пам'ятали про небезпеку темної камери та в середньому за 7 с входили до неї.

Таблиця

*Показники ноотропної дії глюкозаміну гідрохлориду за тестом умовної реакції пасивного уникнення*

№	Група, кількість тварин	Латентний період входу до темної камери, с		Кількість мишей, що досягли критерію навченості	
		вихідний	через 24 год	абсолютна	%
1	Інтактний контроль, $n = 7$	17,20 $\pm$ 5,00	148,00 $\pm$ 21,10 ^	5	71,4
2	Скополамін, 1,5 мг/кг (контрольна патологія), $n = 7$	7,30 $\pm$ 2,70	7,00 $\pm$ 0,70*	0	0*
3	Глюкозаміну гідрохлорид, 25 мг/кг + скополамін, $n = 6$	11,70 $\pm$ 2,03	98,00 $\pm$ 36,90#^	3	50,0#
4	Глюкозаміну гідрохлорид, 50 мг/кг + скополамін, $n = 6$	7,30 $\pm$ 1,60	125,00 $\pm$ 28,00#^	3	50,0#
5	Глюкозаміну гідрохлорид, 100 мг/кг + скополамін, $n = 6$	6,30 $\pm$ 2,90	109,00 $\pm$ 29,80#^	2	33,3#
6	Пірацетам, 200 мг/кг, $n = 6$	15,60 $\pm$ 5,30	88,70 $\pm$ 29,60*	1	16,7

Примітка. Статистично значущі відмінності ( $p < 0,05$ ): \*відносно інтактного контролю; #відносно контрольної патології; ^відносно вихідних даних,  $n$  – кількість тварин у групі.

Пірацетам чинив антиамнестичну дію, яка виражалась у достовірному збільшенні латентного періоду входу до темної камери в середньому в 5,7 разу відносно вихідного стану ( $p < 0,05$ ) та в 12,6 разу відносно відповідного показника групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ), причому 1 тварина досягла критерію навченості (16,7 %).

У дозі 25 мг/кг глюкозаміну гідрохлорид також чинив антиамнестичну дію, яка полягає в достовірному збільшенні латентного періоду входу до темної камери в середньому в 8,4 разу відносно вихідного стану ( $p < 0,05$ ) та в 13,9 разу відносно відповідного показника групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ), причому 50 % тварин досягли критерію навченості. За кількістю мишей, що досягли критерію навченості, ці результати кращі за ефект пірацетаму в 3 рази.

У дозі 50 мг/кг глюкозаміну гідрохлорид виявив ноотропний ефект, достовірно збільшуючи латентний період входу до темної камери в середньому в 17,1 разу відносно вихідного стану ( $p < 0,05$ ) та в 17,9 разу відносно відповідного показника групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ), причому 50 % тварин досягли критерію навченості. За кількістю мишей, що досягли критерію

навченості, ці результати перевищують ефект пірацетаму в 3 рази.

У дозі 100 мг/кг глюкозаміну гідрохлорид достовірно збільшив латентний період входу до темної камери в середньому в 17,3 разу відносно вихідного стану ( $p < 0,05$ ) та в 15,5 разу відносно відповідного показника групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ), причому 33,3 % тварин досягли критерію навченості. За кількістю мишей, що досягли критерію навченості, ці результати вищі за ефект пірацетаму в 2 рази.

Ноотропна дія глюкозаміну гідрохлориду може бути пов'язана також із впливом на нейромедіаторні системи (холінергічна нейротрансмісія), покращанням мозкового кровотоку, впливом на метаболічні та біоенергетичні процеси в головному мозку, мембраностабілізуючою, антиоксидантною, антигіпоксичною властивостями [8, 9].

## Висновок

На моделі скополамінової амнезії уперше виявлено ноотропну дію глюкозаміну в дозах 25–100 мг/кг (особливо 50 мг/кг). Глюкозаміну гідрохлорид виявляє виразну мнемотропну дію – покращує функції пам'яті та навчання, підвищує стійкість мозку до амнезуючих чинників (скополамін).

1. Аведисова А. С. Анализ зарубежных исследований ноотропных препаратов (на примере пиррацетамы) / Аведисова А. С., Ахапкин Р. В., Ахапкина В. И. [и др.] // Российский психиатрический журнал. – 2001. – № 1. – С. 57–63.
2. Ахапкина В. И. Спектр фармакологических эффектов Фенотропила / В. И. Ахапкина, Т. А. Воронина // Фарматека. – 2005. – № 13 (108). – С. 19–25.
3. Беленичев И. Ф. Ноотропная терапия: прошлое, настоящее, будущее / Беленичев И. Ф., Мазур И. А., Стец В. Р. // Новости медицины и фармации. – 2004. – № 15 (155). – С. 10.
4. Бондарев Е. В. Скринингове дослідження глюкозаміну гідрохлориду в якості засобу фізіопротекторної дії / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штриголь // Клінічна фармація. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 47–49.
5. Бурчинский С. Г. Возможности и перспективы ноотропных средств при дисциркуляторной энцефалопатии / С. Г. Бурчинский // Журн. практичного лікаря. – 2005. – № 2. – С. 51–55.
6. Бурчинский С. Г. Ноотропы: классификация, механизмы действия, сравнительная характеристика фармакологических свойств / С. Г. Бурчинский. – Киев, 2004. – 21 с.
7. Захаров В. В. Нарушения памяти / В. В. Захаров, Н. Н. Яхно. – М. : Гэотар-Мед, 2003. – 158 с.
8. Зупанець І. А. Церебропротекторна дія похідних глюкозаміну в умовах експериментальної гіпоксії у щурів / І. А. Зупанець, О. Є. Грінцова // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – № 1 (6). – С. 26–29.
9. Зупанець І. А. Вплив похідних глюкозаміну на перебіг експериментальної гемічної гіпоксії / І. А. Зупанець, О. Є. Грінцова // Сьогоднішня та майбутня фармація: матеріали VII Всеукр. конгресу. – Х., 2008. – С. 379.
10. Ковалев Г. В. Ноотропные средства / Г. В. Ковалев. – Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во, 1990. – 368 с.
11. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Р. У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. : Ремедиум, 2005. – С. 153–158.
12. Мхитарян Э. А. Болезнь Альцгеймера и цереброваскулярные расстройства / Э. А. Мхитарян, И. С. Преображенская // Неврол. журн. (Приложение). – 2006. – № 1. – С. 4–12.
13. Скворцова В. И. Нейропротективная терапия цитокولينом в остром периоде церебрального инсульта / Скворцова В. И., Скворцов В. И., Бойцова А. // Врач. – 2007. – № 12. – С. 25–28.
14. Титова Н. В. Современный взгляд на ноотропную терапию / Н. В. Титова // Рус. мед. журн. – 2007. – Т. 15. – № 24. – 1846 с.



15. Malykh A. G. Piracetam and piracetam-like drugs. From Basic Science to Novel Clinical applications to CNS Disorders / A. G. Malykh, M. R. Sadaie // Drugs. – 2010. – V. 70 (3). – P. 287–312.
16. Towheed T. E. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis / Towheed T. E., Maxwell L., Anastassiades T. P. // Cochrane Database Syst Rev. – 2005. – C0002946-СB002946.
17. Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical use / B. Winblad // CNS Drug Rev. – 2005. – № 11. – P. 169–182.

**Є. В. Бондарєв**

### **Експериментальне обґрунтування застосування глюкозаміну гідрохлориду як засобу ноотропної дії**

Статтю присвячено з'ясуванню можливості застосування глюкозаміну гідрохлориду як засобу ноотропної дії. Експерименти проведено за тестом умовної реакції пасивного уникнення на білих мишах самцях. Досліджувану сполуку вводили внутрішньошлунково в дозах 25, 50 та 100 мг/кг. Препарат порівняння пиріацетам вводили внутрішньошлунково в дозі 200 мг/кг. Досліджувану сполуку та препарат порівняння вводили профілактично 1 раз на добу протягом 3 днів. Порушення пам'яті моделювали внутрішньоочеревинним введенням скополаміну в дозі 1,5 мг/кг. Як показники ноотропної дії обрано збільшення латентного періоду входу до темної камери та кількість мишей, що досягли критерію навченості через 24 год після амнезуючого впливу скополаміну. Статистичну достовірність розрахували за критерієм Ст'юдента та за кутовим перетворенням Фішера. Доведено, що на моделі скополамінової амнезії глюкозаміну гідрохлорид у дозах 25–100 мг/кг (особливо 50 мг/кг) чинить виражений ноотропний ефект, а саме значно покращує пам'ять. У дозі 50 мг/кг глюкозаміну гідрохлорид збільшував латентний період входу тварин до темної камери в 17,9 разу відносно показника тварин з амнезією, причому 50 % тварин досягли критерію навченості через 24 год після амнезуючого впливу скополаміну. За ноотропною дією глюкозаміну гідрохлорид перевищує препарат порівняння пиріацетам.

*Ключові слова: глюкозаміну гідрохлорид, ноотропна активність*

**Е. В. Бондарев**

### **Експериментальное обоснование применения глюкозамина гидрохлорида как средства ноотропного действия**

Статья посвящена выяснению возможности применения глюкозамина гидрохлорида как средства ноотропного действия. Эксперименты проведены по тесту условной реакции пассивного избегания на белых мышах-самцах. Исследуемое соединение вводили внутривентрикулярно в дозах 25, 50 и 100 мг/кг. Препарат сравнения пиррацетам вводили внутривентрикулярно в дозе 200 мг/кг. Исследуемое вещество и препарат сравнения вводили профилактически 1 раз в сутки в течение 3 суток. Нарушение памяти моделировали внутрибрюшинным введением скополамина в дозе 1,5 мг/кг. В качестве показателей ноотропного действия выбрано увеличение латентного периода входа в темную камеру и количество мышей, достигших критерия обученности через 24 ч после амнестического влияния скополамина. Статистическую достоверность рассчитывали по критерию Стьюдента и углового преобразования Фишера. Доказано, что на модели скополаминовой амнезии глюкозамина гидрохлорид в дозах 25–100 мг / кг (особенно 50 мг / кг) оказывает выраженный ноотропный эффект, значительно улучшая память. В дозе 50 мг/кг глюкозамина гидрохлорид увеличивал латентный период входа животных в темную камеру в 17,9 раза по сравнению с показателем животных с амнезией, причем 50 % мышей через 24 часа после амнестического влияния скополамина достигали критерия обученности. По ноотропному действию глюкозамина гидрохлорид превышает препарат сравнения пиррацетам.

*Ключевые слова: глюкозамина гидрохлорид, ноотропная активность*

**Ye. V. Bondarev**

### **Experimental basis of glucosamine hydrochloride use as a nootropic action mean**

This article is devoted to clarify the feasibility of glucosamine hydrochloride as a potential nootropic action drug. Experiments were carried out on the passive avoidance test with white mice, male. The test compound was administered intragastric at doses of 25 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg. The comparator drug, piracetam, was administered also intragastric at dose of 200 mg/kg. The test compound and comparator drug were administered once a day for 3 days prophylactically. Memory disturbances were modeled by intraperitoneally injection of 1,5 mg/kg scopolamine. The selected nootropic action indicators were the latent period of entry into the dark chamber and the mice number which reached the training criteria within 24 hours after amnesic influence of scopolamine. Statistical reliability was calculated under the Student's test and Fisher's angular transformation. It is proved that glucosamine hydrochloride in doses of 25-100 mg/kg (especially 50 mg/kg) has a significant nootropic effect on the scopolamine amnesia model, namely improves memory. Glucosamine hydrochloride (50 mg/kg) increased by 17,9 times the latent period of entry into the dark chamber vs such parameter of animals under scopolamine amnesia, and there were 50 % of mice which reached the training criteria within 24 hours after amnesic influence of scopolamine. Glucosamine hydrochloride exceeds piracetam by its nootropic effect.

*Key words: glucosamine hydrochloride, nootropic activity*

*Надійшла: 11.02.2014 р.*

**Контактна особа:** Бондарєв Євген Вікторович, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра клінічної фармакології, ІПКСФ НФаУ, вул. Челюскінцев, буд. 3, м. Харків, 61003.

Тел.: +38 0 99 957 19 95. Електронна пошта: jck.bond@gmail.com

Л. С. Бобкова, Т. А. Бухтіарова

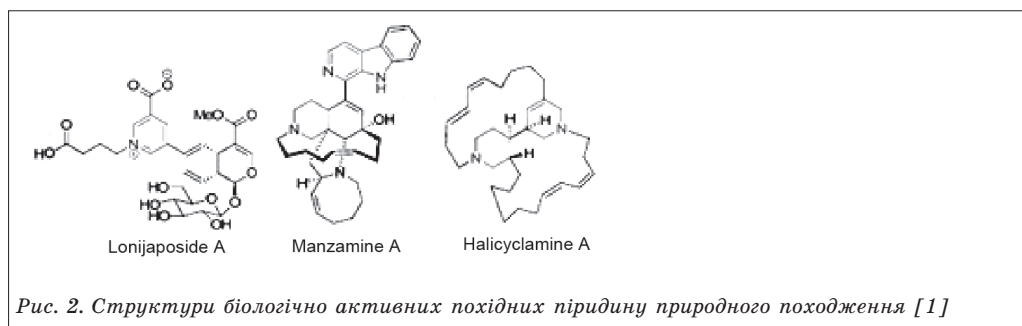
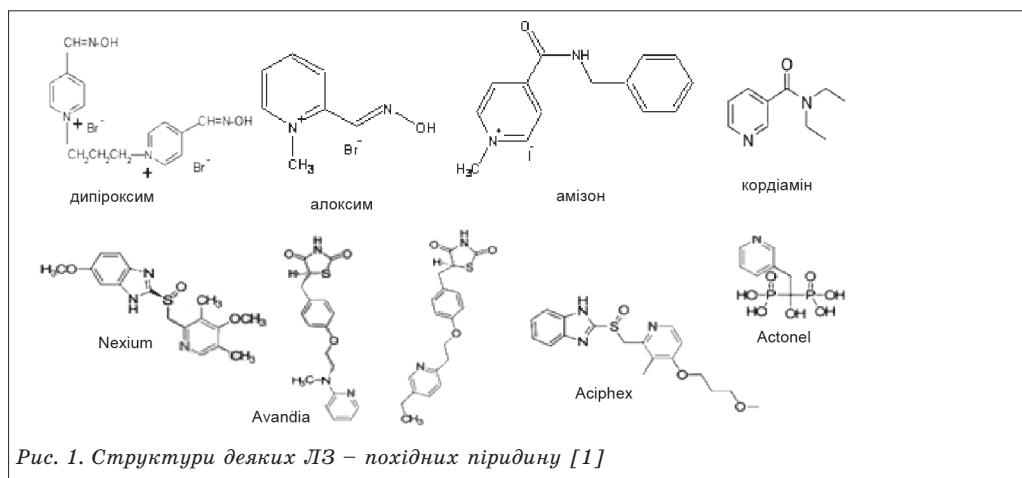
## Моделювання анагетичної активності похідних піридину шляхом визначення дескрипторів, комплементарних до нейромедіаторів

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

Ключові слова: дескриптори, похідні піридину, «структура – активність»

Актуальність дослідження взаємозв'язків «структура – активність» у рядах похідних піридину зумовлена значною кількістю біологічно активних природних сполук та лікарських препаратів, що містять піридинове кільце (рис. 1, 2) [1, 2]. Серед лікарських засобів на основі похідних піридину відомі алоксим, дипіридоксим та токсогонін – реактиватори ацетилхолінестерази, амізон з протизапальною та противірусною активністю, фтивазид, тубазид та метазад з протитуберкульозною дією, аналептик кордіамін та інші.

Відомо, що амізон проявляє здатність до підвищення функціональної активності адренергічної системи (достовірне збільшення рівня норадреналіну в гіпоталамусі та адреналіну в крові на 10,7 та 97,6 % відповідно) та зниження активності дофамінергічної системи (достовірне зменшення рівня дофаміну в гіпоталамусі на 16 %) на моделі больового синдрому запального генезу [3]. Такі дані наводять на думку, що в реалізації знеболювальної дії амізону та його структурних аналогів задіяні адрено- та дофамінергічна системи. Разом з цим, певні риси подоби зазначених структур із структурами н-холіноміметика нікотину та низки



реактиваторів холінестерази дозволяють також припустити й наявність холінергічного компонента в реалізації їх дії.

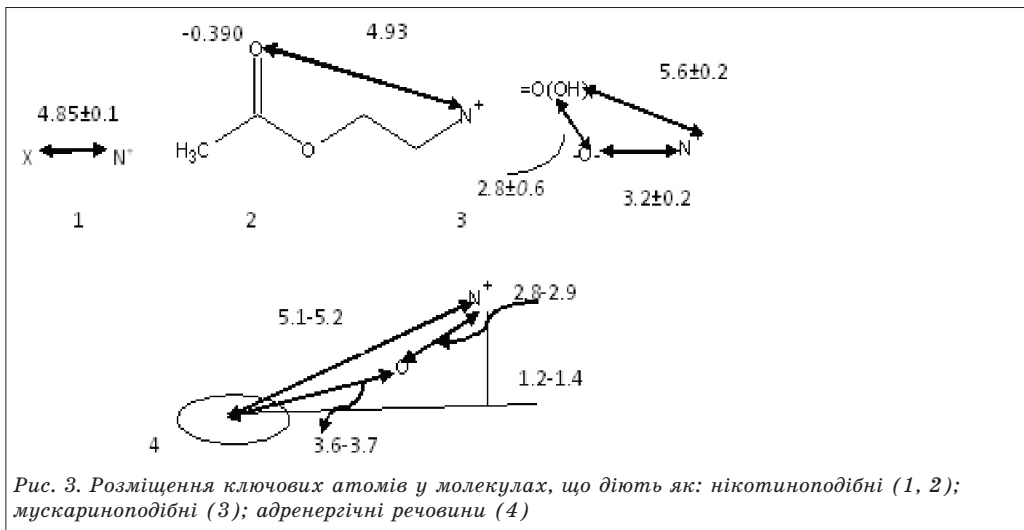
*Мета дослідження* – визначення комплексу дескрипторних властивостей похідних піридину, комплементарних до нейромедіаторів (ацетилхоліну, адреналіну, норадреналіну, дофаміну, нікотину, мускарину) для моделювання та прогнозу аналгетичної активності, як основи подальшої доекспериментальної оптимізації пошуку та цілеспрямованого синтезу нових БАР.

Одним із сучасних варіантів QSAR є метод, який використовує підходи, оснований на знанні структури рецептора та його ліганду. При цьому взаємодія БАР з мішенню визначається міжмолекулярними ефектами, що значною мірою залежать від просторових особливостей та форми молекули БАР. Описано структурні характеристики активних центрів рецепторів, які отримані моделюванням їхніх лігандів [4, 5]. Для характеристики рецепторів та сполук, що безпосередньо з ними взаємодіють, було виділено кілька центрів розпізнавання (два, три та чотири). Так, нікотин, нікотиноподібні речовини та *N*-холінорецептор характеризуються відстанню між двома атомами азоту молекули нікотину (або відстанню між атомами азоту та карбонільного кисню ацетилхоліну). У загальному виді відстань для нікотиноподібних речовин та *N*-холінорецептора становить  $(4,8 \pm 0,1) \text{ \AA}$  [5, 6]. Модель

*M*-холінорецептора представлена трикутником, вершинами якого є атом кисню карбонільної або гідроксильної груп, атом кисню ефірної групи та атом азоту, який легко протонується та несе позитивний заряд: три гетероатоми, відстані між якими становлять 5,6, 3,2, 2,8  $\text{ \AA}$  відповідно [5, 6]. Для моделі  $\alpha$ -адренорецептора та  $\alpha$ -адренергічних речовин виділено найбільше число характеристик, серед яких важливими є кілька площин, на яких розташовані відповідні гетероатоми [5]. Зокрема, це площина ароматичного ядра та пов'язана з нею величина перпендикуляра від протонованого атома азоту до площини, у якій лежить інше ароматичне кільце (вираховують геометричну відстань від атома азоту до площини, заданої координатами атомів вуглецю фенільного замісника) (рис. 3).

Для побудови співвідношень «структура – активність» використовують обчислені дескриптори структур сполук [7, 8]. Алгоритм встановлення залежності «структура – активність» передбачає вибір ряду споріднених за структурою та/або механізмом дії сполук з наступним аналізом даних щодо показників їхньої біологічної активності, процесів біотрансформації, можливих метаболітів тощо [7, 9]. Мінімальний масив цих даних може обмежуватися кількома типовими сполуками з обраного ряду.

Для розрахунку кількісних співвідношень «структура – аналгетична



активність» (QSAR) для похідних піридину використано підхід, оснований на застосуванні методів обчислювальної хімії [10].

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження є похідні піридину, отримані у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», на основі яких сформована вибірка, до якої ввійшли структурні аналоги активної

субстанції препарату амізон – похідні амідів піридинкарбонових кислот із встановленою та/або прогнозованою анальгетичною активністю (табл. 1).

Математичні моделі зв'язку між анальгетичною активністю, як залежною змінною, та лінійною комбінацією дескрипторів, як незалежних змінних, побудовані за допомогою регресійного аналізу (стандартний метод, метод покрокової регресії). Анальгетичну

Таблиця 1

**Структура та активність амідів піридинкарбонових кислот:**  
 $R^1-NHCO-[C_5H_4N^+]-R_2-X- (1-27)$

№	R1	R2	X	Тпл, °С	Анальгезуюча активність
1	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	I	178-179 (і-пропанол)	106,1
2	3-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	I	162-163 (сп.-ацетон)	69,5
3	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -	I	162-163 (сп.-ацетон)	-
4	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH (CH=CH <sub>2</sub> )-	Br	163-164 (сп.-ацетон)	22,2
5	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	O	-	169-170 (ацетон)	71
6	3-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	O	-	161-162 (ацетон)	69,7
7	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	-	-	83-85 (сп.-ацетон)	107,2
8	3-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> -	-	-	73-74 (сп.-ацетон)	103,1
9	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	H	Cl	223-225 (сп.-ацетон)	30,8
10	3-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	H	Cl	119-120 (сп.-ацетон)	39,5
11	4-CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	H	Cl	140-141 (сп.-ацетон)	100,3
12	3-CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	H	Cl	126-127 (сп.-ацетон)	98
13	4-CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	I	64-65 (сп.-ацетон)	107,1
14	4-CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	O	-	36-37 (сп.-ацетон)	-
15	4-CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	CH <sub>2</sub> CH=CH-	Br	158-160 (сп.-бензол)	45,8
16	4-[2-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	210-212 (ацетон)	47
17	3-[2-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	188-190 (спирт)	38,6
18	4-[2-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	184-185 (вода)	45,2
19	3-[2-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	140-142 (сп.-бензол)	80,7
20	4-[3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	232-234 (ацетон)	53,8
21	3-[3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	185-187 (спирт)	93,6
22	4-[3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	237-238 (вода)	60,8
23	3-[3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	155-157(вода)	59,5
24	4-[4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	244-245 (ацетон)	30,2
25	3-[4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	-	-	188-189 (сп.-бензол)	50,7
26	4-[4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	238-240 (вода)	71,5
27	3-[4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	O	-	195-196 (вода)	65,4

Примітка. Анальгезуюча активність – відсоток змін латентного періоду реакції в тесті «гаряча пластинка»

активність сполук 1–27 характеризують показники зміни латентного періоду реакції в тесті «гаряча пластинка» (діапазон від 22,2 до 106,1 %). Показники інгібіції «оцтовокислих корчів», визначених через 60 хв після внутрішньошлункового введення мишам (відсоток інгібіції «оцтовокислих корчів», %; середня ефективна доза,  $ED_{50}$ ), характеризують аналгетичну активність обраних НПЗП. Як параметри, що характеризують структуру досліджуваних молекул, використані енергетичні, електронні та геометричні характеристики, зокрема, заряди на атомах реакційних центрів, віддалі між ними, а також енергії утворення комплексів сполук з нейромедіаторами, отримані квантово-хімічними розрахунками. Міжмолекулярні комплекси, які утворені за донорно-акцепторним зв'язком між гідроксильними групами катехоламінів і відповідними нуклеофільними центрами досліджуваних сполук, охарактеризовані вирашем енергії ( $\Delta E$  – різниця між енергією зв'язування для комплексу та сумою енергій зв'язування для сполук, що його утворюють).

**Результати та їх обговорення.** Вивчення залежності між структурою (геометричні характеристики, розподіл електронної густини на ключових атомах) та аналгезуючим ефектом (відсоток інгібіції «оцтовокислих корчів», визначених через 60 хв після внутрішньошлункового введення мишам), здій-

снено на прикладі відомих НПЗП (амізону, парацетамолу, диклофенаку, піродазолу, а також адреналіну гідротартрату) (табл. 2).

Регресійний аналіз залежності інгібіції «оцтовокислих корчів» (%) від геометричних параметрів відносно адренергічного рецептора ( $L_1$ ,  $H$  та  $L_2$ ,  $L_1$ ,  $H$ ,  $L_2$  відповідно) призводить до рівнянь регресії 1, 2 (табл. 3). Серед дескрипторів відносно адренергічного, нікотинового та мускаринового рецепторів тільки віддалі між гетероатомами ( $L_3$ ), що комплементарна до нікотинового рецептора, увійшла до рівняння регресії (рівняння 3, табл. 3) аналгетичної активності (інгібіція «оцтовокислих корчів») НПЗП. Залежність середніх ефективних доз препаратів ( $ED_{50}$ , мг/кг: 50 (амізон), 92 (парацетамол), 5 (диклофенак) та 3,2 мг/кг (піродазол) описується рівнянням регресії 4, до якого входять два структурних параметри – віддалі між гетероатомами, що комплементарні до нікотинового рецептора ( $L_3$ ), та характеристика міжмолекулярного комплексу з норадреналіном ( $\Delta E_{noradr}$ ) (табл. 3). На рисунку 4 представлена залежність між експериментальними значеннями аналгетичної активності ( $ED_{50}$  та відсоток інгібіції «оцтовокислих корчів») та прогнозованими за рівняннями 4 та 5 відповідно.

Залежність аналгетичної дії НПЗП від параметра  $\Delta E$  комплексу з норадреналіном та віддаллю  $L_3$  характеризується високим коефіцієнтом кореляції

Таблиця 2

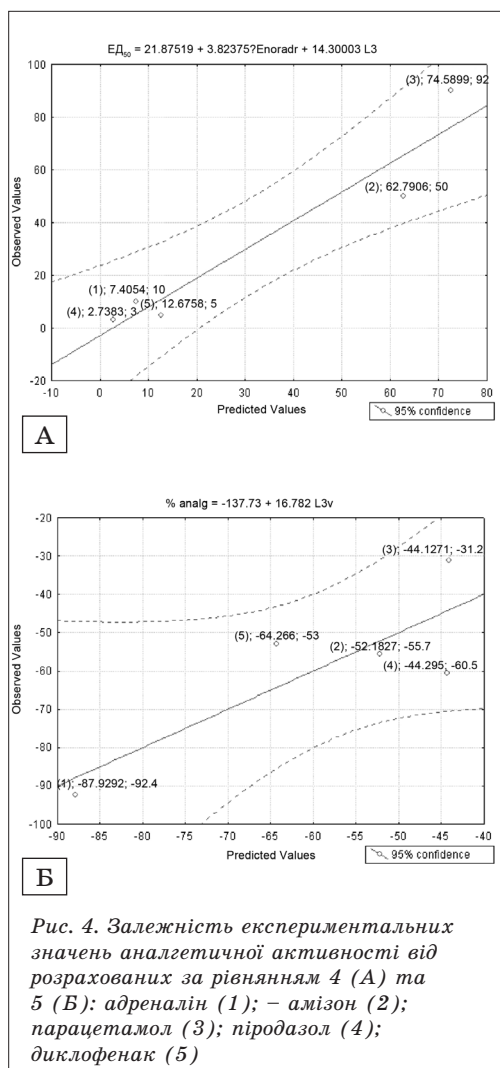
*Аналгетична дія, геометричні характеристики та заряди на атомах НПЗП*

Препарат	Аналгетична дія, %	$L_1$	$H$	$L_2$	$\delta O$	$L_3$	$\delta N$	$M-L_1$	$M-L_2$	$M-L_3$
Адреналін	-92,4	2,97	1,4	5,15	-0,316	2,97	-0,008	-	-	-
Амізон	-55,7	2,3	1,24	3,9	-0,325	5,1	0,55	2,3	5	5,1
Парацетамол	-31,2	2,3	0	3,0	-0,383	5,58	0,055	6,38	2,3	5,58
Піродазол	-60,5	2,21	1,36	5,3	-0,17	5,57	0,588	7,73	2,65	4,37
Диклофенак	-53,0	2,65	0	2,82	-0,469	4,38	0,632	2,19	2,24	5,57

*Примітка.*  $L_1$  – віддалі між гетероатомами НПЗП відповідно до віддалі між гетероатомами «N–O» адренергічних речовин,  $\dot{A}$ ;  $H$  – висота від атома  $N^+$  до площини  $Ph$ ,  $\dot{A}$ ;  $L_2$  – віддалі від гетероатому до центру  $Ph$  (віддалі «O – центр  $Ph$ ») для адренергічних речовин,  $\dot{A}$ ;  $L_3$  – віддалі між гетероатомами НПЗП відповідно до віддалі між гетероатомами «N – X» нікотиноподібних речовин,  $\dot{A}$ ;  $M-L_1$ ,  $M-L_2$ ,  $M-L_3$  – віддалі між гетероатомами НПЗП відповідно до віддалі між гетероатомами мускариноподібних речовин,  $\dot{A}$ ;  $\delta O$ ,  $\delta N$  – заряди на гетероатомах.

**Взаємозв'язок аналгетичної активності НПЗП з геометричними характеристиками, зарядами на гетероатомах та енергією утворення міжмолекулярних комплексів з нейромедіаторами**

Аналгетична активність	QSAR-рівняння	№ рівняння
Інгібіція оцтовокислих «корчів» (Інгібіція, %)	Інгібіція (%) = 74,3184 – 46,9903 L <sub>1</sub> – 20,0907 H; R = 0,990, R <sub>2</sub> = 0,981, F = 51,239, p < 0,01914, N = 5	1
Інгібіція оцтовокислих «корчів» (Інгібіція, %)	Інгібіція (%) = 82,7115 – 46,0259 L <sub>1</sub> – 14,6722H – – 3,7487 L <sub>2</sub> ; R = 0,993, R <sup>2</sup> = 0,987, F = 25,328, p < 0,14480, N = 5	2
Інгібіція оцтовокислих «корчів» (Інгібіція, %)	Інгібіція (%) = -130,686 + 15,325 L <sub>3</sub> ; R = 0,834, R <sup>2</sup> = 0,696, F = 4,5758, p < 0,16582, N = 4	3
ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	ЕД <sub>50</sub> = 21,87519 + 3,82375 E <sub>noradr</sub> + 14,30003 L <sub>3</sub> ; R = 0,972, R <sup>2</sup> = 0,944, F = 8,4695, p < 0,23610, N = 4	4
Інгібіція оцтовокислих «корчів» (Інгібіція, %)	Інгібіція (%) = -137,773 + 16,782 L <sub>3</sub> ; R = 0,834, R <sup>2</sup> = 0,696, F = 4,5758, p < 0,16582, N = 4	5



та детермінації 0,972 та 0,944 відповідно.

Таким чином, одержані для НПЗП результати свідчать про можливість використання таких дескрипторів, як віддалі між ключовими гетероатомами та енергії утворення міжмолекулярних комплексів з нейромедіаторами, при вивченні зв'язку «структура – аналгетична активність» у ряду сполук 1–27 (табл. 4).

Регресійний аналіз «структура – аналгетична активність» для амідів 1–27, виконаний стандартним методом (Standard method), привів до рівняння 6 (R 0,95). За умови виключення з аналізу змінних δO та E<sub>adr</sub>, величина часткових рівнів значимості яких 0,26 та 0,43 відповідно (величини рівнів значимості інших змінних 0,03 – 0,00001), відбувається трансформація в рівняння 7 (R 0,93).

$$\begin{aligned} \text{Аналгетична активність, \%} = & 1476,668 + 86,750 h + 327,845 \delta O + \\ & + 1,042 E_{\text{dor}} + 53,946 L_3 + 929,668 \delta N_H - \\ & - 498,496 L_1 - 80,073 L_2 + 7,619 E_{\text{adr}} - \\ & - 17,646 \delta N_{Py} + 0,806 E_{\text{norad}}; (6) \\ R = 0,95, R^2 = 0,91, F = 10,858, \\ p < 0,00024, n = 22 (27), \end{aligned}$$

де h – висота від атома азоту піридинового кільця (N<sub>Py</sub>) до площини арильного фрагмента, Å;

δO, δN<sub>H</sub>, δN<sub>Py</sub> – заряди на гетероатомах (кисню та азоту);

*Геометричні характеристики, заряди на атомах та енергії утворення комплексів амідів піридинкарбонових кислот (1–27) з нейромедіаторами*

№	Віддаль між гетероатомами, Å			Висота, Å	Заряди на гетероатомах, $\delta$			Енергія утворення комплексу, ккал/моль		
	(N <sub>H</sub> ...O=C)	(N <sub>H</sub> ...N <sub>Py</sub> )	(N <sub>Py</sub> ...O=C)		$\delta$ N <sub>Py</sub>	$\delta$ N <sub>H</sub>	$\delta$ O <sup>δ-</sup>	$\Delta E_{adr}$	$\Delta E_{noradr}$	$\Delta E_{dof}$
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	h						
1	2,310	5,086	5,090	1,357	0,601	-0,04	-0,312	-7,5	-2,9	-2,2
2	2,298	4,871	4,215	1,367	0,577	-0,05	-0,352	-5,8	-9,7	-1,6
3	2,312	5,041	5,041	1,361	0,531	-0,019	-0,372	-4,1	-11,9	-1,7
4	2,247	4,930	4,207	1,35	0,594	-0,034	-0,346	-9,7	-16,1	-13,0
5	2,263	5,195	5,066	1,36	1,083	-0,048	-0,353	-2,6	-14,9	-1,5
6	2,299	4,872	4,281	1,368	1,059	-0,038	-0,346	-3,8	-20,6	-2,1
7	2,302	5,072	5,039	1,37	-0,063	-0,041	-0,350	-4,9	-17,8	-1,4
8	2,296	4,857	4,231	1,367	-0,086	-0,033	-0,360	-4,4	-12,0	-1,5
9	2,307	5,073	5,010	0	0,568	-0,044	-0,320	-2,5	-23,0	-1,7
10	2,306	4,857	4,218	0	-0,073	0,049	-0,340	-6,5	-27,9	-1,7
11	2,266	5,139	5,021	-	-0,054	0,044	-0,343	-5,3	-35,2	1,5
12	2,262	4,530	4,540	-	0,057	-0,035	-0,362	-8,0	-19,7	-3,6
13	2,260	5,160	5,081	-	0,277	-0,015	-0,368	-6,2	-5,5	-11,7
14	2,264	5,193	5,066	-	1,087	-0,051	-0,355	-1,5	-14,9	-2,4
15	2,264	5,102	5,088	-	0,121	-0,045	-0,341	-5,3	-10,7	-1,5
16	2,304	5,083	5,043	0	-0,060	0,051	-0,342	-6,3	-20,6	-3,9
17	2,312	4,614	4,417	0	-0,081	0,053	-0,334	-7,1	-17,8	-2,6
18	2,310	5,107	5,078	0	1,086	0,056	-0,342	-5,4	-13,1	-3,8
19	2,256	4,689	4,505	0	1,072	0,057	-0,346	-3,5	-1,8	-1,0
20	2,305	5,092	5,039	0	-0,058	0,046	-0,346	-2,8	-8,1	-1,4
21	2,244	4,667	4,478	0	-0,077	0,040	-0,353	-3,6	-8,7	-1,9
22	2,315	5,115	5,070	0	1,089	0,040	-0,345	-5,3	-2,5	-2,2
23	2,308	4,291	4,789	0	1,066	0,046	-0,341	-6,4	-19,3	-2,9
24	2,305	5,092	5,039	0	-0,058	0,046	-0,346	-6,4	-15,5	-2,5
25	2,305	4,853	4,225	0	-0,035	0,044	-0,348	-8,0	-7,9	-1,7
26	2,250	5,242	5,044	0	1,088	0,030	-0,362	-1,6	-5,4	-2,8
27	2,308	4,870	4,276	0	1,060	0,049	-0,333	-4,3	-13,6	1,0

$E_{dof}$ ,  $E_{adr}$ ,  $E_{noradr}$  – енергія утворення міжмолекулярного комплексу з дофаміном, адреналіном та норадреналіном відповідно, ккал/моль;

$L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  – віддаль між гетероатомами (N<sub>H</sub>...O=C), (N<sub>H</sub>...N<sub>Py</sub>), (N<sub>Py</sub>...O=C), Å.

$$\text{Аналгетична активність, \%} = 1073,996 + 80,588 h + 7,955 E_{adr} +$$

$$+ 861,311 \delta N_H - 370,003 L_1 + 51,532 L_3 - 78,756 L_2 - 16,713 \delta N_{Py} + 0,666 E_{noradr}; (7)$$

$$R = 0,93, R^2 = 0,88, F=11,911, p < 0,00008, n=22 (27).$$

Загалом, простежується залежність аналгетичного ефекту від комбінації дескрипторів, що пов'язані з особливостями структур сполук 1–27, необ-

хідних для взаємодії з адренергічною системою.

Взаємозв'язок аналгетичної активності з характеристиками структур амідів піридинкарбонових кислот в окремих рядах четвертинних солей, основ або N-оксидів призводить до регресійних рівнянь 8–10 (рис. 5).

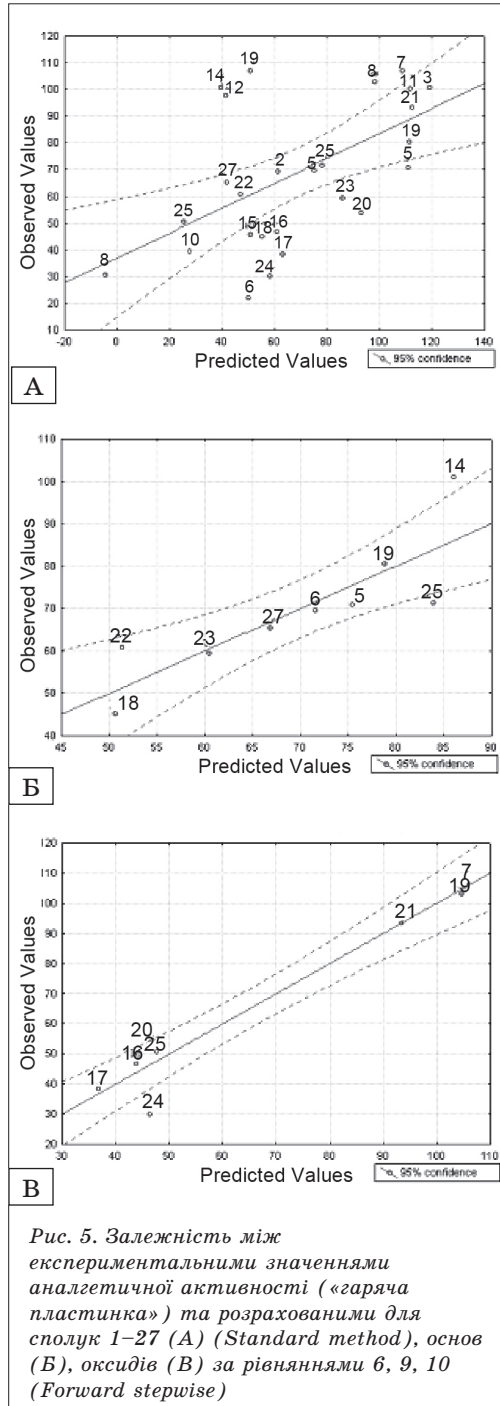


Рис. 5. Залежність між експериментальними значеннями аналгетичної активності («гаряча пластинка») та розрахованими для сполук 1–27 (А) (Standard method), основ (Б), оксидів (В) за рівняннями 6, 9, 10 (Forward stepwise)

*Четвертинні солі:* Аналгетична активність, % =

$$= 53,2015 + 54,7290 h - 96,1140 \delta N_{Py}; \quad (8)$$

$R = 0,83, R^2 = 0,70, F = 3,4422, p < 0,16721, N = 6$  (10);

*Основи:* Аналгетична активність, % =

$$= 223,9083 + 9,6065 E_{adr} - 23,7787 L_2; \quad (9)$$

$R = 0,85, R^2 = 0,72, F = 6,5742, p < 0,03984, n = 8$  (9);

*N-оксиди:* Аналгетична активність, % =

$$= 1703,462 - 657,324 \delta N_H - 705,823 L_1; \quad (10)$$

$R = 0,97, R^2 = 0,95, F = 45,544, p < 0,00062, n = 8$ .

Рівняння 6, 7, отримані для сполук 1–27, та рівняння 8, отримане для четвертинних солей, містять важливу для взаємодії з адренорецептором характеристику – відстань до площини арильного фрагмента. Роль дескриптора  $h$  проілюстрована результатом регресійного аналізу за умови його відсутності в матриці дескрипторів сполук 1–27 (Forward stepwise, рівняння 11). При цьому важливість дескриптора  $h$  простежується при порівнянні коефіцієнтів множинної кореляції  $R$  рівнянь 6 та 11, який зменшується з 0,95 до 0,53 відповідно.

Аналгетична активність, % =

$$= -249,612 - 946,235 \delta O - 211,490 \delta N_H E_{dof}; \quad (11)$$

$R = 0,53, R^2 = 0,35, F = 4,1727, p < 0,01694, n = 27$ .

Виключення з регресійного аналізу сполук, структура яких не містить арильного фрагмента, приводить до восьмипараметрового рівняння 12, яке характеризується високим коефіцієнтом множинної кореляції ( $R$  0,91). При цьому вклад дескриптора  $h$  за частковим коефіцієнтом є значим (0,83) (табл. 5).

Аналгетична активність, % =

$$= 793,032 + 37,155 h + 6,058 E_{dof} + + 1,082 E_{norad} - 34,771 L_2 + 22,509 L_3 - 283,678 L_1 - 6,886 \delta N_{Py} + + 175,666 \delta N_H; \quad (12)$$

$R = 0,91, R^2 = 0,82, F = 7,6341, p < 0,00075, n = 22$ .

Регресійний аналіз зв'язку аналгетичної активності сполук 11–15 (без



**Часткові внески дескрипторів у залежність  
«структура – аналгетична активність»**

Дескриптор	Частковий внесок (Partial Cor.) до рівняння №			
	6	7	11	12
h	0,912	0,912	-	0,707
$\delta O$	0,335	-	-0,475	0,014
$\Delta E_{dof}$	0,239	-	0,364	0,778
$L_3$	0,855	0,816	0,177	0,513
$\delta N_H$	0,857	0,849	-0,382	0,289
$L_1$	-0,759	-0,670	-0,162	-0,460
$L_2$	-0,821	-0,803	-0,043	-0,475
$\Delta E_{adr}$	0,699	0,808	-0,015	0,121
$\delta N_{py}$	-0,644	-0,615	-0,002	-0,292
$\Delta E_{noradr}$	0,576	0,463	0,196	0,502

арильного фрагмента) приводить до трьохпараметрового рівняння 13 з високим коефіцієнтом множинної кореляції R (0,99) та високими значеннями часткових внесків дескрипторів  $\delta O$ ,  $L_1$  та  $\delta N_H$  (-0,99, 0,97 та 0,94 відповідно).

$$\begin{aligned} \text{Аналгетична активність, \%} = & -30630,7 - 3837,9 \delta O + 12976,3 L_1 + \\ & + 233,8 \delta N_H; \quad (13) \\ R = 0,99, R^2 = 0,96, F = 22,148, \\ p < 0,14655, n = 5. \end{aligned}$$

Як показано в таблиці 5, частковий внесок дескриптора h (висота від атома азоту піридинового кільця до площини ароматичного кільця) у моделях 6–8, 12 характеризується високими значеннями (0,912 – 0,707).

Вклад дескрипторів  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  та  $\Delta E_{noradr}$  є також високим, особливо за умови наявності в моделях також дескриптора h. Відсутність арильного фрагмента призводить до зростання внесків характеристик амідної групи:  $\delta O$ ,  $L_1$  та  $\delta N_H$  (модель 13).

### Висновки

1. Для моделювання аналгетичної активності проведено визначення комплексу властивостей похідних піридину, механізм знеболювальної дії яких може бути пов'язаний зі здатністю підвищувати функціональну активність адренергічної системи та знижувати активність дофамінергічної системи, а саме: здатність утворювати міжмолекулярні комплекси з моноамінами, а також параметри відстані між ключовими гетероатомами та зарядами на них.

2. Для моделювання аналгетичної активності амідів піридинкарбонових кислот здійснено аналіз внесків вибраних дескрипторів, виявлено найважливіші з них та охарактеризовано тісноту їхнього зв'язку в моделях.

3. Серед визначеного комплексу дескрипторів в моделях «структура – аналгетична активність» обґрунтовано важливість параметра відстані від атома азоту піридинового кільця до площини арильного фрагмента як характеристики взаємодії з адренорецептором.

1. Cline E. Reactivity and Application of Reactivity and Application of Pyridinium Salts in Organic Synthesis [електронний ресурс] / Elizabeth Cline // 2 nd Year Literature Seminar Alexanian Lab (12 February 2010). – Режим доступу: LizLitSem.pdf.
2. Бухтиарова Т. А. Структура и противовоспалительная активность ариламидов изоникотиновой и никотиновой кислот / Т. А. Бухтиарова, Ф. П. Тринус, В. Ф. Даниленко [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1997. – Т. 31, № 11. – С. 30–32.
3. Шатыркина Т. В. Катехоламинергические механизмы обезболивающего действия неопиоидных анальгетиков: автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата мед. наук: спец. 14.03.05 / Шатыркина Татьяна Владимировна. – К., 2002. – 152 с.

4. Вилков Л. В. Определение геометрического строения свободных молекул / Л. В. Вилков, В. С. Майстрыюков, Н. И. Садова. – Л. : Химия, 1978. – 224 с.
5. Голиков С. Н. Стереоспецифичность действия лекарственных веществ / С. Н. Голиков, С. Г. Кузнецов, О. П. Зацепина. – М. : Мир, 1973. – 149 с.
6. Биохимическая фармакология: учебное пособие для вузов под ред. П. В. Сергеева. – М. : Высш. школа, 1982. – 343 с.
7. Куценко С. А. Основы токсикологии / С. А. Куценко. – СПб., 2002. – 395 с.
8. Structural interpretation of QSAR models – universal approach [электронный ресурс] / V. E. Kuz'min, P. G. Polishchuk, A. G. Artemenko, E. N. Muratov // Book of Abstracts 5th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry» (1–5 July 2013, Kharkiv, Ukraine). – P. 28. – Режим доступа: Poster. – MACCcolored.pdf
9. Харчевникова Н. В. Научные основы прогноза токсичности и опасности химических веществ с учетом механизма токсического действия: Автореф. на соискание ученой степени доктора биол. наук: спец. 14.02.01 «Гигиена» / Харчевникова Н. В. – М., 2011.
10. Єріна А. М. Статистичне моделювання та прогнозування. – К. : КНЕУ, 2001. – 170 с.

**Л. С. Бобкова, Т. А. Бухтиарова**

### **Моделирование анальгетической активности производных пиридина путем определения дескрипторов, комплементарных к нейромедиаторам**

Моделирование анальгетической активности производных пиридина выполнено методом регрессионного анализа. В ходе исследования были предложены дескрипторы с учетом механизма анальгетического действия НПВС и производных пиридинкарбоновых кислот. Линейная комбинация геометрических характеристик (расстояний между ключевыми атомами, высота от атома азота пиридина до плоскости арильного фрагмента), энергетических (энергия взаимодействия с нейромедиаторами – адреналином, норадреналином, дофамином) характеристик описывает их анальгетическую активность.

*Ключевые слова:* дескрипторы, производные пиридина, «структура – активность»

**L. S. Bobkova, T. A. Buhtiarova**

### **Modeling of analgesic activity of the pyridine derivatives by determining descriptors complementary to neuromediators**

To analyze the results of modeling of the analgesic effect of the pyridine derivatives, we performed the regression analysis. In this study, we proposed the use of descriptors that can be associated with the mechanism of the analgesic action of NSAIDs and pyridine carboxylic acid derivatives. On the basis of preliminary experimental results, we have shown that the mechanism of the analgesic action amizone and its structural analogs can be linked to the possibility of increasing the functional activity of the adrenergic system, and reducing the activity of the dopaminergic system. We studied the ability to form intermolecular complexes NSAIDs and structural analogues amizone with monoamines. Distance between the heteroatoms, values of the charges on the heteroatoms we also considered as descriptors. A linear combination of geometric characteristics (distance between key atoms, height from the nitrogen atom of pyridine to the plane of the aryl part), energy (energy of interaction with neurotransmitters – epinephrine, norepinephrine, dopamine) describes the characteristics of the analgesic activity of the compounds studied. We analyzed the contributions of individual descriptors in activity for mathematical models, identified the most important ones. Among a certain set of descriptors we have proved the importance of the distance from the nitrogen atom of the pyridine ring to the plane of the aryl part – an important geometric characteristics to interact with adrenoceptor.

*Key words:* descriptors, pyridine derivatives, the «structure – activity»

Надійшла: 11.02.2014 р.

**Контактна особа:** Бобкова Л. С., відділ синтезу фізіологічно активних речовин, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потьє, буд. 14, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 044 456 94 18. Електронна пошта: ift-bobkova@rambler.ru

Я. О. Бутко<sup>1</sup>, С. М. Дроговоз<sup>1</sup>, А. М. Ляпунова<sup>2</sup>, Л. О. Булига<sup>1</sup>

## Дослідження впливу глюкокортикостероїдів і керамідів на імунобіохімічні маркери запалення за алергічного дерматиту

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, м. Харків<sup>2</sup>Державний науково-дослідний центр лікарських засобів, м. Харків

*Ключові слова: алергічний дерматит, цитокіни, глюкокортикостероїди*

Важливою проблемою сучасної медицини є збільшення частоти алергічно-запальних уражень шкіри. За даними МОЗ України алергічні контактні дерматити (АКД) складають 70 % від усіх дерматологічних захворювань [6]. АКД часто має рецидивуючий перебіг з поширеним ураженням шкіри й розвитком ускладнень, що призводить до тривалої непрацездатності пацієнтів, погіршення якості їхнього життя, соціальної активності та становить не тільки медичну, але й важливу соціальну проблему [1, 6, 11].

Запальна реакція ініціюється внаслідок активації ключових прозапальних цитокінів – інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) і фактора некрозу пухлини (ФНП- $\alpha$ ), що мають широкий спектр біологічних властивостей (викликають хемотаксис і проліферацію нейтрофілів, лімфоцитів і еозинофілів, дендритних клітин і ін., сприяють проникненню лімфоцитів у вогнище ураження) і викликають ланцюг клітинних взаємодій, що призводять до формування запального клітинного інфільтрату [5, 7, 9]. У свою чергу, клітини запального інфільтрату є продуцентами цих цитокінів, що зумовлює підтримку локальної запальної реакції, регуляція і результат якої залежить від рівноваги між продукцією та інгібіцією синтезу цитокінів [7, 9].

ІЛ-1 $\alpha$  і ФНП- $\alpha$  індукують запальний процес завдяки участі структур як уродженого імунітету (їхня продукція здійснюється активованими клітинами шкіри, макрофагами, моноцитами, нейтрофілами), так і набутого імунітету (забезпечують процес презентації анти-

гена в регіональних лімфатичних вузлах, формування клону антигенспецифічних Т-лімфоцитів і міграцію їх у вогнище запалення). Характер дії цитокінів залежить від їхнього вмісту: низькі концентрації регулюють розвиток місцевої запальної реакції, у той час, як високі концентрації викликають розвиток системної запальної реакції, що супроводжується лихоманкою, лейкоцитозом, підвищенням рівня білків гострої фази (С-реактивного білка (СРБ), гаптоглобіну, ферритину та ін.) [4, 5, 7]. Тому важливими маркерами при діагностиці запальних захворювань є зміни імунобіохімічних показників (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та СРБ). Крім того, висока чутливість методик їхнього визначення дозволяє охарактеризувати ефективність лікування запальних захворювань [5].

Розвитку АКД сприяє також порушення бар'єрної функції шкіри. Зокрема, дисбаланс позаклітинних ліпідів рогового шару епідермісу призводить до збільшення втрати води та сухості шкірного покриву, підвищення його проникності для алергенів [9, 11, 12]. Зменшення кількості ліпідів (у тому числі керамідів) у роговому шарі призводить до зниження еластичності корнеоцитів та збільшення міжклітинних проміжків, що призводить до розвитку запалення, як наслідок, кератиноцити розпочинають секретувати цитокіни, що поглиблюють запальні процеси в шкірі [10–12].

Таким чином, враховуючи мультифакторність розвитку запальних захворювань шкіри, лікування має бути спрямованим на ліквідацію запального процесу в шкірі та відновлення шкірного бар'єра (захисної функції, еластичності, вологості).

У цьому відношенні перспективним напрямом є удосконалення існуючих місцевих протизапальних препаратів шляхом створення комбінованих препаратів на основі глюкокортикостероїдів (ГКС) з вологоутримуючими речовинами, зокрема, з керамідами, що беруть участь у клітинній проліферації, відновлюють цілісність шкірного покриву, підвищують стійкість шкіри до алергенів і токсинів [12]. З цієї метою було розроблено препарати «Мометазон з керамідами» у вигляді крему та «Метилпреднізолон з керамідами» у вигляді мазі.

*Мета дослідження* – вивчення рівня цитокінів ІЛ-1 і ФНП- $\alpha$  з одночасним визначенням білка гострої фази запалення (СРБ) у крові щурів за алергічного дерматиту та лікування місцевими препаратами, що містять вищевказані ГКС і кераміди.

**Матеріали та методи.** Об'єктами дослідження були лабораторні зразки крему «Мометазон з керамідами» (містить 0,1 % мометазона фуруат, 0,5 % керамідів) та мазі «Метилпреднізолон з керамідами» (містить 0,1 % метилпреднізолону ацепонат, 0,5 % керамідів), що розроблені професором М. О. Ляпуновим. Препаратами порівняння було обрано крем «Елоком» (містить 0,1 % мометазона фуруат, виробник «Шеринг Плау», Бельгія) та мазь «Адвантан» (містить 0,1 % метилпреднізолону ацепонат, виробник «Шеринг АГ», Німеччина).

В експерименті використано 42 щури-самки масою 220–250 г, яких було розподілено на 7 груп: перша група – інтактні тварини; друга – тварини, яких виводили з досліду через добу після сенсibilізації (на 3 день досліду, який вважали піком патології); третя – тварини, яких не лікували (контрольна патологія); четверта – тварини, яких лікували кремом «Мометазон з керамідами», п'ята – кремом «Елоком», шоста – маззю «Метилпреднізолон з керамідами», сьома – маззю «Адвантан». Для розвитку АКД тварин сенсibilізували 5 % спиртовим розчином 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ) за методом П. М. Залкан [2]. Лікування тварин розпочинали на наступний день

після сенсibilізації. Місцеві препарати наносили протягом 7 днів на уражену ділянку шкіри ( $3 \times 3 \text{ см}^2$ ) 1 раз на добу в дозах 15 мг/см<sup>2</sup> (креми) та 20 мг/см<sup>2</sup> (мазі). Для оцінки виразності системних проявів алергічного процесу та ефективності його лікування проводили імунобіохімічний аналіз у сироватці крові тварин наступних показників: ІЛ-1 $\alpha$ , ФНО- $\alpha$  та СРБ. Ці показники визначали на піку патології (3 день досліду) та на 7 день лікування (10 день досліду).

Для кількісного визначення прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\alpha$  і ФНП- $\alpha$  (тест-система фірми «Bender Medsystems», США), а також СРБ (тест-система фірми «Укрмедсервіс», Україна) використовували метод імуноферментного аналізу та аналізатор «Libline-90» (Австрія).

Усі втручання та евтаназію тварин здійснювали з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та I Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001 р.).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою тесту Т'юкі з використанням середнього значення, стандартного відхилення, похибки середнього, відмінності між групами порівняння вважали достовірними при  $p < 0,05$  [8].

**Результати та їх обговорення.** У ході досліду після повторної сенсibilізації у тварин спостерігали розвиток АКД (гіперемію, дифузний набряк, еритему на шкірі). Результати вивчення імунобіохімічних показників показали, що розвиток АКД (пік патології) супроводжувався достовірним підвищенням у крові щурів ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та СРБ у 11,4; 26,6 та 50,2 разу відповідно до показників інтактних тварин, що свідчить про інтенсивне протікання запального процесу в тварин з дерматитом (таблиця).

На 7 день спостережень (10 день досліду) у групі контрольної патології рівень ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та СРБ був достовірно вищим у 7,7; 22,8 та 33,1 разу відповідно до показників інтактних тварин. Ці результати свідчать про масивну

**Уміст прозапальних цитокінів та С-реактивного білка в крові щурів  
за умов алергічного дерматиту та застосування досліджувальних  
препаратів ( $M \pm m, n = 6$ )**

№	Група досліджу	Дні досліджу	Показник		
			ФНП- $\alpha$ , пг/мл	ІЛ-1 $\alpha$ , нг/мл	СРБ, мг/л
1	Інтактний контроль	3	25,53 $\pm$ 2,58	3,25 $\pm$ 0,47	0,58 $\pm$ 0,24
2	Пік патології	3	291,62 $\pm$ 6,77*	86,39 $\pm$ 2,91*	29,12 $\pm$ 1,96*
3	Контрольна патологія	10	197,43 $\pm$ 14,57*/#	74,06 $\pm$ 4,69*	19,22 $\pm$ 0,78*/#
4	Крем «Мометазон з керамідами»	10	84,30 $\pm$ 3,39*/#/\$	38,71 $\pm$ 2,80*/#/\$	2,09 $\pm$ 0,30*/#/\$
5	Крем «Елоком»	10	90,17 $\pm$ 3,56*/#/\$	43,91 $\pm$ 2,60*/#/\$	3,51 $\pm$ 0,38*/#/\$
6	Мазь «Метилпреднізолон з керамідами»	10	76,97 $\pm$ 3,53*/#/\$	30,98 $\pm$ 3,34*/#/\$	1,15 $\pm$ 0,19*/#/\$
7	Мазь «Адвантан»	10	71,99 $\pm$ 4,80*/#/\$	28,20 $\pm$ 2,66*/#/\$	0,86 $\pm$ 0,10*/#/\$

Примітка. \*Відмінності достовірні відносно показника групи інтактних тварин ( $p < 0,05$ , тест Т'юкі); #відносно піка патології ( $p < 0,05$ ); \$відносно контрольної патології ( $p < 0,05$ ); n – кількість тварин у групі.

деструкцію клітин і виражену запальну реакцію при розвитку АКД [7].

Після лікування тварин кремом «Мометазон з керамідами» спостерігали достовірне зниження рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та СРБ у 2,3; 1,9 і 9,2 разу, кремом «Елоком» – у 2,2; 1,7 та 5,5 разу, маззю «Метилпреднізолон з керамідами» – у 2,6; 2,4 та 16,7 разу, маззю «Адвантан» – у 2,7; 2,6 та 22,3 разу відповідно порівняно з контрольною патологією. Ці зміни свідчать про зниження деструкції клітин, запального процесу та активізацію проліферативних процесів у шкірі. Також слід зазначити, що при використанні досліджуваних препаратів значення ФНП- $\alpha$  та ІЛ-1 $\alpha$  достовірно не відрізнялися від значень препаратів порівняння, але рівня показників інтактних тварин вони не досягли. Під дією місцевих препаратів спостерігали нормалізацію показника білка гострої фази запалення до рівня інтактних показників, але вплив препаратів на рівень СРБ був дещо неоднозначним. Так, дія крему «Мометазон з керамідами» мала тенденцію до перевищення в 1,7 разу дії крему «Елоком», а при застосуванні мазі «Метилпреднізолон з керамідами» лікувальна дія

дещо (недостовірно) поступалася в 1,3 разу мазі «Адвантан».

Таким чином, розвиток алергічного дерматиту в щурів супроводжувався підвищенням рівня прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$ ) та білка гострої фази запалення. У нелікованих тварин рівень досліджуваних показників залишався високим до кінця досліджу порівняно з показниками інтактних тварин, що свідчить про важкий перебіг алергічного дерматиту. У ході лікування тварин препаратами з ГКС та керамідами спостерігали достовірне зниження імунобіохімічних маркерів запалення як у порівнянні з піком патології (3 доба), так і з контрольною патологією (10 доба), що підтверджує виражену протизапальну дію крему «Мометазон з керамідами» і мазі «Метилпреднізолон з керамідами». Уведення керамідів до складу місцевих препаратів з глюкокортикостероїдами не спричинило зменшення протизапальної дії останніх, що свідчить про відсутність антагонізму між ними. Однак кераміди сприяють загоєнню та відновленню нормальної структури пошкодженої шкіри, що було підтверджено гістологічними дослідженнями в наших попередніх досліджах [3].

## Висновки

1. Розвиток алергічного контактного дерматиту характеризується вираженим і тривалим підвищенням вмісту маркерних прозапальних цитокінів та білка гострої фази запалення в крові тварин.

2. На моделі ДНХБ дерматиту в щурів місцеві препарати, що містять глюкокортикостероїди та кераміди, проявили протизапальну дію, про що

свідчить зниження рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\alpha$  та ФНП- $\alpha$ ) та нормалізація вмісту білка гострої фази запалення – С-реактивного білка.

3. Перспективним є подальше фармакологічне вивчення препаратів з глюкокортикостероїдами та керамідами у вигляді крему та мазі з метою підвищення ефективності лікування алергічного дерматиту.

1. Бунин С. А. Анализ структуры потребления лекарственных средств при лечении аллергических дерматитов / С. А. Бунин, С. З. Умаров, В. А. Моргунов // Вест. Росс. воен.-мед. академии. – 2008. – № 3. – С. 86–89.
2. Бунятян Н. Д. Эффективность 5 % альтановой мази при контактном дерматите у крыс / Н. Д. Бунятян, В. В. Березнякова, Т. Ю. Глазкова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 1. – С. 160–162.
3. Бутко Я. О. Вплив крему «Мометазон з керамідами» на морфоструктуру шкіри при алергічному дерматиті / Я. О. Бутко, Ю. Б. Лар'яновська // Укр. біофарм. ж-л. – 2013. – № 1 (24). – С. 23–27.
4. Вельков В. В. С-белок структура, функция, методы определения / В. В. Вельков // Медицинский дайджест. Медэксперт. – 2008. – № 2. – С. 33–36.
5. Воспаление: этиология, патогенез, патогенетическое обоснование принципов терапии / [Н. П. Чеснокова, Т. А. Невважай, О. Л. Морозова и др.]. – Саратов: Изд-во СГМУ. – 2008. – 120 с.
6. Волкославська В. М. Стан захворюваності на дерматози в Україні через 20 років після аварії на ЧАЕС / В. М. Волкославська, О. Л. Гутнев // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.: наук.-практ. видання. – 2010. – № 3. – С. 153.
7. Провоспалительные цитокины ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  в очагах поражения кожи больных псориазом / О. Р. Катунина, А. В. Резайкина, О. Р. Катунина [и др.]. // Vestn. Dermatol. Venerol. – 2011. – № 4. – С. 25–30.
8. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А. Халафян: Учебник. – [3-е изд.]. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
9. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis / M. K. Oyoshi, R. He, L. Kumar, J. Yoon [et al.] // Adv. Immunol. – 2009. – V. 102, № 1. – P. 135–226.
10. Ceramides and barrier function in healthy skin / J. Mutanu Jungersted, L. I. Hellgren, J. K. Høgh [et al.] // Acta Derm Venereol. – 2010. – V. 4, № 90. – P. 350–353.
11. Pacha O. Treating atopic dermatitis: safety, efficacy and patient acceptability of a ceramide hyaluronic acid emollient foam / O. Pacha, A. A. Hebert // Clin Cosmet Invest Dermatol. – 2012. – № 5. – P. 31–37.
12. Sajić D. A look at epidermal barrier function in atopic dermatitis: physiologic lipid replacement and the role of ceramides / D. Sajić, R. Asiniwasis, S. Skotnicki-Grant // SkinTherapyLett. – 2012. – V. 7, № 17. – P. 6–9.

**Я. О. Бутко, С. М. Дроговоз, А. М. Ляпунова, Л. О. Булига**

### **Дослідження впливу глюкокортикостероїдів та керамідів на імунобіохімічні маркери запалення при алергічному дерматиті**

На моделі динітрохлорбензолового дерматиту встановлено, що розвиток алергічного дерматиту в щурів супроводжувався підвищенням рівня прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$ ) та білка гострої фази запалення (СРБ). У ході лікування тварин препаратами, що містять ГКС та кераміди, спостерігали достовірне зниження імунобіохімічних маркерів запалення як порівняно з піком патології (3 доба), так і з контрольною патологією (10 доба), що підтверджує виражену протизапальну дію крему «Мометазон з керамідами» та мазі «Метилпреднізолон з керамідами». Таким чином, перспективним є подальше фармакологічне вивчення препаратів з ГКС та керамідами у вигляді крему та мазі з метою підвищення ефективності лікування алергічного дерматиту.

*Ключові слова:* алергічний дерматит, цитокіни, глюкокортикостероїди

**Я. А. Бутко, С. М. Дроговоз, А. Н. Ляпунова, Л. А. Булыга**

### **Исследование влияния глюкокортикостероидов и керамидов на иммунобиохимические маркеры воспаления при аллергическом дерматите**

На модели динитрохлорбензолового дерматита установлено, что развитие аллергического дерматита у крыс сопровождалось повышением уровня провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$ )

---

---

и белка острой фазы воспаления (СРБ). В ходе лечения животных препаратами, содержащими ГКС и керамиды, наблюдали достоверное снижение иммунобиохимических маркеров воспаления как в сравнении с пиком патологии (3 сутки), так и с контрольной патологией (10 сутки), что подтверждает выраженное противовоспалительное действие крема «Мометазон с керамидами» и мази «Метилпреднизолон с керамидами». Таким образом, перспективным является дальнейшее фармакологическое изучение препаратов с ГКС и керамидами в виде крема и мази с целью повышения эффективности лечения аллергического дерматита.

*Ключевые слова: аллергический дерматит, цитокины, глюкокортикостероиды*

**Y. O. Butko, S. M. Drogovoz, A. N. Lyapunova, L. O. Bulyga**

### **The study of glucocorticosteroids and ceramides influence on immunobiochemical markers of inflammation in allergic dermatitis**

Spreading of inflammatory diseases of the skin makes the problem of creating the most efficient and safe local drugs for treatment of dermatitis more actual. Due to the fact that patients with chronic dermatitis have a disturbed barrier function of the skin, it is necessary add substances in local drugs that would normalize the hydrophilic-lipophilic balance of the skin and also restore the matrix structure of the epidermis, improve metabolism of epithelial cells (emollients, ceramides et al.). Therefore, in order more effective local action in the treatment of dermatitis, led by Professor N.A. Lyapunov, local drugs with glucocorticosteroids, which contains ceramides were developed. The aim of the research was to study the influence of local drugs with glucocorticosteroids and ceramides on the immunobiochemical processes in the development of allergic contact dermatitis. On the model of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis it has been established that allergic dermatitis development in rats is associated with increase of anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) and acute phase protein (CRP) levels. Levels of investigative parameters in untreated animals remained high until the end of experiment, compared to intact levels, indicating severe course of allergic dermatitis. While treating animals with preparations containing glucocorticosteroids and ceramides we observed significant reduction in immunobiochemical markers of inflammation comparing both to the peak of pathology and control pathology, confirming pronounced anti-inflammatory action of cream «Mometasone with ceramides» and ointment «Methylprednisolone with ceramides». It should be mentioned that adding ceramides to the formula of local preparations containing glucocorticoids did not result in anti-inflammatory action reduction of the latter, indicating absence of antagonism between them. Therefore, further pharmacological study of preparations in the form of cream and ointment containing glucocorticosteroids and ceramides is prospective in order to improve effectiveness of allergic dermatitis treatment.

*Key words: allergic dermatitis, cytokines, glucocorticosteroids*

---

*Надійшла: 13.02.2014 р.*

**Контактна особа:** Бутко Ярослава Олександрівна, доцент, кандидат фарм. наук, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельнікова, м. Харків, 61002. Тел.: +38 057 706 30 69. Електронна пошта: yaroslavabutko79@mail.ru

В. В. Валика, С. Б. Парий, Л. Г. Руснак, А. И. Унгуряну,  
Е. С. Николай, М. П. Тодираш

## Доклиническое исследование гепатопротекторной эффективности нового комбинированного препарата Neamon-hera

Научный центр исследования лекарств при Государственном университете медицины  
и фармации имени Н. А. Тестемицану, г. Кишинев, Республика Молдова

*Ключевые слова: комбинированный препарат, Neamon-hera, гепатопротекторные эффекты, антиоксидантные свойства*

Высокий уровень заболеваемости хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени является чрезвычайно важной проблемой для Республики Молдова. В последнее десятилетие наблюдается значительный рост числа этих заболеваний, в частности, среди лиц молодого возраста, поэтому осуществление на практике современных инноваций в лечении и профилактике цирроза печени представляется актуальным [1]. В настоящее время в комплексной терапии и реабилитации пациентов с циррозом печени назначают иммуностимулирующие препараты, которые стимулируют защитные силы организма и в то же время имеют антиоксидантное, противомикробное и «противострессовое» действие. Особенность этих лекарств определяется сложным сочетанием аминокислот и травяных экстрактов, пищевых добавок с содержанием микроэлементов. В то же время, традиционное современное лечение не достаточно для достижения стабильной и долгой ремиссии, что побудило интерес многих исследователей к разработке новых лекарственных средств, которые приостанавливают развитие цирроза печени и улучшают качество жизни пациентов [2, 3].

С целью профилактики и лечения осложнений хронических гепатитов и цирроза печени в Научном центре исследования лекарств при Государственном университете медицины и фармации имени Н. А. Тестемицану

было разработано лекарственное средство Neamon-hera, комбинированный препарат из известных действующих веществ, впервые включенных в один состав – L-аспартат L-аргинина, спиронолактон и препарат BioR. Аспартат аргинина был включен с целью активации клеточного метаболизма, обмена мочевины, исходя из способности данной аминокислоты нейтрализовать и выводить аммиак из организма. Аргинин уменьшает молочнокислый ацидоз, проявляет ноотропное и противоамнезическое действие, предупреждает метаболические изменения медиаторных аминокислот, увеличивает фосфорилирование ряда белков в ЦНС, чем обусловлено его назначение для лечения и профилактики печеночной энцефалопатии [4]. Спинонолактон, мочегонное лекарственное средство, был включен с целью уменьшения образования асцитической жидкости и периферических отеков [5]. Действуя главным образом в дистальных канальцах, увеличивая натрийурез и сохраняя калий, спиронолактон является препаратом выбора для начального лечения цирротического асцита. BioR – отечественный лекарственный препарат, полученный путем экстракции и фракционирования биомассы стволов водорослей *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl. Содержащиеся в препарате аминокислоты, олигопептиды и микроэлементы Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Cr и др. стимулируют процессы регенерации тканей и положительно влияют на клеточный и гуморальный иммунитет. Также, препарат оказывает противовирусное действие, предотвращая проникновение вируса в клетку, что является важным факто-



ром в патогенезе цирроза печени и гепатита вирусной этиологии [6, 7].

*Цель исследования* – доклиническая оценка гепатопротекторного действия препарата Neamon-hera по динамике биохимических печеночных проб, показателям системы ПОЛ и антиоксидантной защиты при экспериментальном гепатите у мышей, индуцированном четыреххлористым углеродом (CCl<sub>4</sub>).

*Материалы и методы. Состав препарата.* Препарат Neamon-hera выпускается в капсулах по 834 мг № 30 (производитель «Eurofarmaco SA», г. Кишинев). В качестве активных ингредиентов одна капсула содержит: аспарат аргинина 450 мг, спиринолактона 24 мг и экстракта *Spirulina platensis* 9 мг. Вспомогательные вещества: безводная лактоза, картофельный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза и магния стеарат.

*Животные.* В эксперименте было использовано 30 мышей-самцов линии C57/B16 весом 27–30 г. Стабильные условия содержания животных (12-часовой цикл освещения, температура, относительная влажность воздуха) поддерживались с помощью установки «Scantainer» (Scanbur LTD., Дания), в которой были помещены клетки с животными на протяжении всего эксперимента. Животным давали гранулированный корм (ssniff M-Z) и воду *ad libitum*.

Содержимое одной капсулы 834 мг растворяли в 4,2 мл этанола (концентрация этанола не превышала 0,16 %) с последующим добавлением к питьевой воде. Дозу препарата рассчитывали исходя из общего объема выпиваемой за сутки воды, который составлял 0,2–0,3 мл/г для мышей.

*Моделирование токсического гепатита и сбор проб.* Токсический гепатит моделировали по методу Takeda [8], Vanheule [9]. Для изучения эффективности препарата Neamon-hera на модели токсического гепатита были созданы 5 групп по 6 животных в каждой. Первая группа была контрольной. Животным из групп II–V вводили подкожно 1 мл/кг раствора CCl<sub>4</sub> (Sigma, США), разведенного в равном объеме кунжутного масла (Sigma, США), дважды в

неделю в течение 3 недель. Группы II–IV получали Neamon-hera в дозе 10, 50 и 100 мг/кг соответственно в течение 26 дней, начиная с первого дня моделирования токсического гепатита. Контрольной группе (I) вводили соответствующее количество масляного раствора, а также животные этой группы получали питьевую воду с добавлением определенного объема растворителя (этанол 0,16 %).

Сбор материала для исследований осуществляли на 5 день после последнего введения CCl<sub>4</sub>. Мышей подвергали декапитации, соблюдая правила работы с экспериментальными животными. Кровь собирали отдельно для извлечения сыворотки и плазмы, в качестве стабилизатора использовали ЭДТА. Печень извлекали, соблюдая холодовый режим, промывали физиологическим раствором для удаления остатков крови, взвешивали для вычисления соотношения массы печени к массе тела, затем отдельными порциями замораживали при температуре –80 °C и хранили согласно требованиям протокола исследуемых параметров.

*Биохимические исследования.* Активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и уровень общего билирубина в сыворотке определяли по системе Beckman Synchron LX (Beckman Coulter, Villepinte, Франция); активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – по методу Bergmeyer & Bernt.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах печени оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) и других продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактанты) по методу Uchiyama & Mihara [10], а в плазме крови – согласно метода Buege & Aust [11]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по классическому методу Beauchamp & Fridovich [12], каталазы (КАТ) – по методу Thomson et al. [13], глутатионпероксидазы (ГП) – по методу Paglia & Valentine [14].

Проведение доклинических исследований было рассмотрено и одобрено Комитетом по биоэтике и проводилось с соблюдением международных биоэти-

ческих требований по работе с лабораторными животными [15].

Статистическую обработку выполняли в программе Microsoft Excel, различия показателей определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Данные представлены в таблицах как  $M \pm m$ . Достоверными считались различия при  $P < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** У животных, подверженных хронической интоксикации гепатотропным ксенобиотиком  $CCl_4$  (группа V), выявлены значительные изменения всех исследованных параметров. Отмечено снижение массы тела, значительное увеличение массы печени, соотношение масса печени/масса тела выросло

более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Отмечено резкое повышение активности ферментов гепатолиза АлАТ и АсАТ соответственно в 25 и 9 раз, активность ЛДГ увеличилась в 2,3 раза, ЩФ – в 3 раза, а уровень сыровоточного холестерина увеличился в 2 раза. В сыровотке крови животных, подверженных хронической интоксикации  $CCl_4$ , выявлено увеличение в 3 раза содержания общего билирубина (табл. 2).

В результате лечения препаратом Neaton-hera (группы II–IV) установлено увеличение веса животных, которое было в прямой зависимости от введенной дозы (табл. 1). Одновременно отме-

Таблица 1

*Влияние препарата Neaton-hera на массу тела и печени мышей, подверженных  $CCl_4$ -интоксикации, n = 6*

Группа	Масса тела исходная, г	Масса тела в конце эксперимента, г	Динамика массы тела, %	Масса печени, г	Масса печени/масса тела
I	29,20 ± 0,40	29,60 ± 0,27	101,3	1,40 ± 0,03	4,58 ± 0,14
II	29,40 ± 0,49	25,10 ± 0,40	85,6	2,09 ± 0,08*	8,32 ± 0,40*
III	29,20 ± 0,34	27,00 ± 0,20*	92,6*	1,69 ± 0,08**	6,28 ± 0,33**
IV	29,10 ± 0,34	28,30 ± 0,28**	97,2**	1,58 ± 0,06**	5,60 ± 0,19**
V	29,10 ± 0,51	24,20 ± 0,45#	83,4#	2,75 ± 0,12#	11,40 ± 0,60#

Примечание. \* $p < 0,001$  в сравнении с контрольной группой (I); \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,001$  в сравнении с  $CCl_4$  группой (V). Группы животных: I контрольная группа – мыши, получившие к питьевой воде сольвент (этанол 0,16 %) для Neaton-hera и кунжутное масло; II – мыши, получившие  $CCl_4$  + Neaton-hera в дозе 10 мг/кг; III – мыши, получившие  $CCl_4$  + Neaton-hera в дозе 50 мг/кг; IV – мыши, получившие  $CCl_4$  + Neaton-hera в дозе 100 мг/кг; V – мыши, получившие  $CCl_4$  + кунжутное масло.

Таблица 2

*Влияние препарата Neaton-hera на функциональное состояние печени мышей, подверженных  $CCl_4$ -интоксикации,  $M \pm m$ , n = 6*

Группа	Общий билирубин, мкмоль/л	АлАТ, ед./л	АсАТ, ед./л	ЩФ, ед./л	ЛДГ, ед./л	Холестерол, ммоль/л
I	6,2 ± 0,8	54,2 ± 3,3	118,5 ± 8,4	289,6 ± 16,5	241,0 ± 11,6	1,95 ± 0,15
II	20,7 ± 0,8	1042,5 ± 28,4**	954,1 ± 69,1	914,4 ± 29,1	422,3 ± 20,8*	5,09 ± 0,33
III	14,8 ± 0,8**	771,5 ± 23,9**	689,4 ± 52,7**	738,7 ± 36,5**	346,5 ± 22,3**	4,58 ± 0,39*
IV	10,5 ± 0,7**	539,7 ± 18,7**	483,3 ± 22,8**	691,2 ± 31,7**	313,8 ± 15,8**	3,72 ± 0,36**
V	22,2 ± 0,9#	1348,3 ± 43,2#	1139,7 ± 67,1#	1072,8 ± 59,3#	554,3 ± 15,6#	5,32 ± 0,45#

Примечание. \* $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой (I); \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,001$  по сравнению с группой, подверженной интоксикации  $CCl_4$  (V).

чено снижение массы печени и также снижение в 2 раза индекса масса печени/масса тела в группе животных, которые получали максимальную дозу препарата Neamon-hera, по сравнению с показателями группы с хроническим гепатитом без лечения. Также, введение Neamon-hera сопровождалось уменьшением синдрома цитолиза, что выразилось в зависимом от дозы снижении уровня соответствующих маркеров. В сыворотке крови мышей группы IV, получившей препарат в суточной дозе 100 мг/кг, концентрация общего билирубина, активности АлАТ и АсАТ уменьшились более чем вдвое (табл. 2). Применение Neamon-hera в дозе 100 мг/кг привело к снижению активности щелочной фосфатазы на 35 %, лактатдегидрогеназы – на 45 % и уровня холестерина в сыворотке – на 30 % по сравнению с показателями группы V.

Хроническая интоксикация  $CCl_4$  приводила к значительному увеличению по сравнению с контролем уровня ТБК-реактантов в печени и в плазме крови более чем в 2 раза у животных из группы V, что указывает на нарушение нормального течения окислительных процессов, и было оценено как усиление процессов перекисного окисления липидов. Выраженное увеличение содержания ТБК-реактантов одновременно сопровождалось снижением активности ферментов антиоксидантной защиты. Активности СОД, КАТ и ГПО у мышей, подверженных хронической интоксикации  $CCl_4$ , составляли 52,1 %, 57,4 % и 66,6 % соответственно в сравнении с аналогичными показателями

животных контрольной группы (табл. 3).

Лечение препаратом Neamon-hera на фоне экспериментального повреждения печени вызвало заметное увеличение активности антиоксидантных ферментов и снижение уровня ПОЛ. Наиболее благоприятный эффект препарата был отмечен при приеме максимальной суточной дозы Neamon-hera (группа IV). Тем не менее, применение препарата во всех используемых дозах привело к значительному увеличению активности антиоксидантных ферментов в печени мышей, подвергнутых интоксикации  $CCl_4$ . Самый высокий уровень активности ферментов антиоксидантной защиты был зарегистрирован в группе мышей, которые получали препарат Neamon-hera в дозе 100 мг/кг, в этом случае активности СОД, КАТ и ГПО увеличились более чем на 65 %, 55 % и 30 % соответственно по сравнению с группой, обработанной  $CCl_4$ .

Под влиянием лечения препаратом Neamon-hera отмечали зависимое от дозы уменьшение уровня ТБК-реактантов в плазме крови и ткани печени. В результате применения Neamon-hera в дозе 100 мг/кг содержание ТБК-реактантов в ткани печени и в плазме крови составило соответственно 90 % и 70 % от уровня этих продуктов ПОЛ в V группе (хроническая интоксикация  $CCl_4$  без лечения). Хотя интенсивность процесса перекисного окисления липидов, индуцированного интоксикацией  $CCl_4$ , была значительно уменьшена при лечении животных препаратом Neamon-hera, показатели были

Таблица 3

**Эффекты препарата Neamon-hera на содержании ТБК-реактантов и активность антиоксидантных ферментов в печени мышей при  $CCl_4$  гепатите,  $M \pm m$ ,  $n = 6$**

Группа	СОД, ед./мг белка	КАТ, ед./мг белка	ГПО, ед./мг белка	ТБК-реактанты	
				Печень, мкмоль/г ткани	Плазма, мкмоль/л
I	25,70 ± 0,96	18,80 ± 0,80	11,10 ± 0,52	0,48 ± 0,05	0,24 ± 0,02
II	16,80 ± 0,90*	14,20 ± 0,87*	7,90 ± 0,25	1,03 ± 0,06*	0,40 ± 0,08*
III	19,40 ± 0,85**	15,80 ± 0,83**	8,90 ± 0,35*	0,84 ± 0,05**	0,36 ± 0,08*
IV	22,30 ± 1,18**	17,00 ± 0,55**	9,70 ± 0,37**	0,67 ± 0,06**	0,32 ± 0,07**
V	13,30 ± 1,55#	10,80 ± 0,72#	7,40 ± 0,52#	1,27 ± 0,08#	0,62 ± 0,09#

Примечание. Среднее значение ± S. D.; # $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой (I);

\* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,001$  по сравнению с группой подверженной интоксикации  $CCl_4$  (V).

по-прежнему выше, чем в контрольной группе.

Комбинированный препарат Neamon-hera, основу которого составляют аргинина аспартат, спиринолактон и препарат BioR, был разработан, в первую очередь, с целью снижения содержания аммиака в крови и других токсических веществ, образующихся в избытке у больных циррозом печени. Известно, что высокий уровень аммиака в крови, проходящего через гематоэнцефалический барьер, оказывает нейротоксический эффект и способствует развитию энцефалопатии (аммиачный эндотоксикоз) в значительной степени за счет нарушения транспорта энергетических субстратов, истощения глутамата и аспартата с увеличением уровня глутамина в астроцитах. Таким образом, включение аргинина аспартата в состав препарата Neamon-hera основывалось, прежде всего, на его способности снижать выраженность гипераммониемии. Также, L-аргинин участвует в накоплении АТФ и, являясь донором, и естественным переносчиком азота, служит субстратом для всех изоформ нитрооксид-синтазы (NOS), участвующих в образовании окиси азота (NO) – мощного медиатора миорелаксации сосудистого русла. Установлено перераспределение изоформ NOS в печени, пораженной циррозом, когда снижается уровень конститутивных изоформ (eNOS-эндотелия) и увеличивается уровень индуцибельного фермента (iNOS), в то время как нейрональная изоформа (nNOS) остается неизменной, и является доказательством их разного участия в патогенезе заболевания [16]. L-аргинин усиливает диурез и натрийурез у больных циррозом печени, сопровождающимся асцитом [17], и благоприятно влияет на снижение портальной гипертензии [18, 19]. Так как портальная гипертензия во многом обусловлена вторичным альдостеронизмом, то спиринолактон как антагонист альдостерона является диуретиком выбора в лечении больных с циррозом и асцитом [3, 20].

Другим важным компонентом препарата Neamon-hera является BioR – экстракт, изготавливаемый по ориги-

нальным технологиям ориентированного синтеза, фракционирования и пурификации биоактивных субстанций из биомассы цианофитных водорослей *Spirulina Platensis* (Nordst) Geitl, обогащенный цинком и глютаминовой кислотой [6].

Ранее было показано, что назначение препарата BioR пациентам с печеночной энцефалопатией при циррозе печени вирусной этиологии способствовало значительному улучшению функции печени и клинической картины, нормализации психоневрологического статуса, аминокислотного баланса, биохимических тестов и результатов ЭЭГ [7]. Также было установлено, что препарат BioR оказывает гепатопротекторное действие, стимулирует синтез белков и фосфолипидов в поврежденных гепатоцитах, связывает свободные радикалы и препятствует процессу ПОЛ, тормозит образование малонового диальдегида и способствует сохранению запасов глутатиона [21].

В ходе настоящего исследования было отмечено, что лечение препаратом Neamon-hera вызывает значительное увеличение активности глутатион-зависимых ферментов – СОД, КАТ и ГПО, которые представляют собой систему, координированно регулирующую клеточную защиту от оксидативного стресса при экспериментальном поражении печени. СОД является одним из наиболее важных ферментов антиоксидантной защиты. Снижение активности СОД является чувствительным энзиматическим индексом разрушения клеток печени. СОД действует как элемент клеточной защиты от потенциально вредного воздействия супероксиданиона, катализируя дисмутацию этих ионов. Супероксидный радикал представляет собой одну из главных причин цитотоксичности кислорода, поскольку является первым радикалом кислорода, образующимся *in vivo*, и существует дольше, чем другие радикалы. Каталаза является гемопротеином и защищает клетки от накопления перекиси водорода [22]. Применение Neamon-hera привело также к значительному дозозависимому увеличению активности КАТ у животных с индуцированным гепатитом.

Уровень ТБК-реактантов в печени считается значимым показателем токсического повреждения печени свободными радикалами [23]. Повышенный уровень этих продуктов, наблюдаемый у  $CCl_4$ -обработанных мышей, указывает на чрезмерное образование свободных радикалов и активацию системы ПОЛ, приводящих к повреждению печени. Значительное снижение концентрации этих веществ в печени и плазме крови мышей, получивших лечение препаратом Neamon-hera, указывает на значительную антиоксидантную эффективность исследуемого препарата. Мы полагаем, что все три основных компонента изучаемого препарата – L-аргинин, спиронолактон и BioR способны увеличить активность ферментов антиоксидантной защиты и снизить уровень продуктов ПОЛ.

## Выводы

В результате доклинических исследований, проведенных на модели хронического гепатита у мышей, индуцированного тетрахлорметаном, установлено выраженное гепатопротекторное и антиоксидантное действие многокомпонентного препарата Neamon-hera. Его применение способствовало значительному уменьшению массового коэффициента печени, активности ферментов цитолиза, содержания общего билирубина и продуктов перекисного окисления липидов, приводило к увеличению активности ферментов антиоксидантной защиты.

Разработка препарата Neamon-hera стала возможной благодаря научным исследованиям безвременно ушедшего профессора Бориса Ивановича Пария.

1. Компенсированный цирроз печени у взрослых. Национальный клинический протокол. Республика Молдова. – Кишинев, 2008. – 79 с.
2. Moore K. P. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis / Moore K. P., Aithal G. P. // Gut. – 2006, Oct. – V. 55, Suppl 6. – P. 1–12.
3. Шипулин В. П. Токсические гепатиты: как повысить эффективность лечения / Шипулин В. П., Чернявский В. В. // Новости медицины и фармации. – 2010. – № 348. – С. 25–29.
4. Pros and cons of L-arginine supplementation in disease / Vissers YL, Debats IB, Luiking YC [et al.] // Nutr Res Rev. – 2004. – V. 17 (2). – P. 193–210.
5. Spironolactone alone or in combination with furosemide in the treatment of moderate ascites in nonazotemic cirrhosis. A randomized comparative study of efficacy and safety / Santos J, Planas R, Pardo A. [et al.] // J. Hepatol. – 2003. – V. 39. – P. 187–92.
6. Rudik V. F. Optimization of the nutrient medium composition for cultivation of *Spirulina platensis* Geitl. (Cyanophyta) by the mathematical method of experimental design / Rudik V. F., Bulmaga V. L., Maksakova S. V. // International Journal on Algae. – 2008. – V. 10 (2). – P. 131–140.
7. Кондрачки Людмила. Клинико-метаболические изменения и их коррекция у больных с циррозом печени / Кондрачки Людмила // Дисс. канд. мед. наук. – Кишинев, 2009. – 109 с.
8. Effects of TJN-101, a lignan compound isolated from *Schisandra* fruits, on liver fibrosis and on liver regeneration after partial hepatectomy in rats with chronic liver injury induced by CCl<sub>4</sub> / Takeda S, Kase Y, Arai I. [et al.] // Nihon Yakurigaku Zasshi. – 1987. – V. 90 (1). – P. 51–65.
9. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis / Vanheule E, Geerts AM, Van Huysse J. [et al.] // Int J Exp Pathol. – 2008. – V. 89 (6). – P. 419–32.
10. Uchiyama M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test / Uchiyama, M., Mihara, M. // Anal. Biochem. – 1978. – V. 86. – P. 271–8.
11. Buege J. A. Microsomal lipid peroxidation / Buege J. A., Aust S. D. // Methods Enzymol. – 1978. – V. 52. – P. 302–10.
12. Beauchamp C. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / Beauchamp C., Fridovich I. // Anal Biochem. – 1971. – V. 44 (1). – P. 276–87.
13. Thomson J. F. Spectrophotometric assay of catalase with perborate as substrate / Thomson J. F., Nance S., Tollaksen S. L. // Proc Soc Exp Biol Med. – 1978. – V. 157 (1). – P. 33–5.
14. Paglia D. E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / Paglia D. E., Valentine W. N. // J. Lab Clin Med. – 1967. – V. 70 (1). – P. 158–69.
15. Каркищенко Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М., 2010. – С. 26–30.
16. Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats / Wei CL, Khoo HE, Lee KH, Hon WM // Nitric Oxide. – 2002. – V. 7 (2). – P. 91–102.
17. Pros and cons of L-arginine supplementation in disease / Vissers YL, Debats IB, Luiking YC [et al.] // Nutr Res Rev. – 2004. – V. 17 (2). – P. 193–210.
18. Systemic hypotension and diuresis by L-arginine in cirrhotic patients with ascites: role of nitric oxide / Tajiri K, Miyakawa H, Izumi N [et al.] // Hepatology. – 1995. – V. 22 (5). – P. 1430–5.

19. Effects of L-arginine on the systemic, mesenteric, and hepatic circulation in patients with cirrhosis / Kakumitsu S, Shijo H, Yokoyama M, [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – V. 27 (2). – P. 377–82.
20. Magni P. Aldosterone receptor antagonists: biology and novel therapeutic applications / Magni P, Motta M. // *Curr Hypertens Rep*. – 2005. – V. 7 (3). – P. 206–11.
21. The utilization of some coordination compounds of V(IV) and CO(III) as regulators of the content of bioactive substances with antioxidant properties at *Spirulina platensis* / Bulimaga V., Rudic V., Efre-mova N. [et al.] // *The Annals of the University of Oradea*. – 2011. – Tom. XVIII, Issue: 1. – P. 59–65.
22. Nishida K. Gamma-glutamylcysteinylethyl ester attenuates progression of carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice / Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. // *Toxicology*. – 1998. – V. 126. – P. 55–63.
23. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis / Cabré M., Camps J., Paternáin JL, [et al.]. – *Clin Exp Pharmacol Physiol*. – 2000. – V. 27 (9). – P. 694–9.

**В. В. Валика, С. Б. Парий, Л. Г. Руснак, А. И. Унгуряну,  
Е. С. Николай, М. П. Тодираш**

### **Доклиническое исследование гепатопротекторной эффективности нового комбинированного препарата Neamon-hera**

Комбинированный лекарственный препарат Neamon-hera, разработанный в Научном центре исследования лекарств (НЦИЛ) при ГУМФ имени Николая Тестемицану, содержит активные ингредиенты: аспарат аргинина, спиринолактон, BioR (экстракт биомассы спирулины). Цель работы – доклиническая оценка гепатопротекторного действия препарата Neamon-hera по динамике биохимических печеночных проб, показателям системы ПОЛ и антиоксидантной защиты при экспериментальном гепатите, индуцированном четыреххлористым углеродом (CCl<sub>4</sub>). В результате проведенных исследований было установлено, что лечение животных препаратом Neamon-hera способствует значительному уменьшению поврежденной печени, вызванных четыреххлористым углеродом. Применение препарата приводило к нормализации массы тела и массового коэффициента печени, значительному уменьшению активностей аланин- и аспаратаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, содержания общего билирубина и холестерина в сыворотке крови. Кроме того, применение препарата у животных с хроническим гепатитом способствовало уменьшению продуктов перекисного окисления липидов и увеличению активности ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза). Таким образом, доклинические исследования, проведенные на модели хронического гепатита у мышей, показали гепатопротекторную и антиоксидантную эффективность препарата Neamon-hera. Наличие таких фармакологических свойств позволяет предположить целесообразность его использования в комплексном лечении хронических вирусных гепатитов и цирроза печени. Благодаря тому, что препарат имеет широкий спектр действия и многофункционален, он предназначен для обеспечения комплексного терапевтического эффекта.

*Ключевые слова:* комбинированный препарат, Neamon-hera, гепатозащитное действие, антиоксидантное действие

**В. В. Валика, С. Б. Парий, Л. Г. Руснак, А. И. Унгуряну,  
Е. С. Николай, М. П. Тодираш**

### **Доклінічні дослідження гепатопротекторної ефективності нового комбінованого препарату Neamon-hera**

Комбінований лікарський препарат Neamon-hera, розроблений у Науковому центрі дослідження ліків при ДУМФ імені М. Тестемицану, містить активні інгредієнти: аспарат аргініну, спіринолактон, BioR (екстракт біомаси спіруліни). Мета роботи – доклінічна оцінка гепатопротекторної дії препарату Neamon-hera за динамікою біохімічних печінкових проб, показниками системи ПОЛ та антиоксидантного захисту за експериментального гепатиту, індукованого тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>). У результаті проведених досліджень встановлено, що лікування експериментальних тварин (мишей) препаратом Neamon-hera сприяє значному зменшенню ушкоджень печінки, викликаних тетрахлорметаном. Застосування препарату призводило до нормалізації маси тіла та масового коефіцієнта печінки, значного зменшення активностей аланін- та аспаратамінотрансферази, лужної фосфатази, лактатдегідрогенази, умісту загального білірубіну та холестерину в сироватці крові. Крім того, застосування препарату в тварин з хронічним гепатитом сприяло зменшенню вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та збільшенню активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатионпероксидази). Таким чином, доклінічні дослідження, проведені на моделі хронічного гепатиту в мишей, показали наявність гепатопротекторної та антиоксидантної ефективності препарату Neamon-hera. Наявність таких фармакологічних властивостей дозволяє припустити доцільність його використання в комплексному лікуванні хронічних вірусних гепатитів та цирозу печінки. Завдяки широкому спектру дії та багатофункціональності препарат може забезпечувати комплексний терапевтичний ефект.

*Ключові слова:* комбінований препарат, Neamon-hera, гепатозахисна дія, антиоксидантна дія

---

---

**V. Valica, S. Parii, L. Rusnac, A. Ungureanu, E. Nicolai, M. Todiras**  
**Preclinical studies of hepatoprotective efficacy of a new combined drug Neamon-hepa**

Neamon-hepa is a combined drug preparation, developed at the Scientific Center of Drug Research at the State University of Medicine and Pharmacy "N. Testemitanu". The preparation contains active ingredients: arginine aspartate, spironolactone and BioR (extract of *Spirulina platensis* biomass). The aim of the work was to demonstrate the hepatoprotective efficacy of combined drug Neamon-hepa in the preclinical experiments on mice with toxic hepatitis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). It has been found that treatment with Neamon-hepa significantly reduced CCl<sub>4</sub>-induced damage. The treatment with Neamon-hepa normalized the body weight and liver/body weight ratio, significantly lowered alanine- and aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase activities, the total bilirubin and serum cholesterol levels. The treatment of mice with carbon tetrachloride during three weeks decreased significantly the activity of hepatic antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Meanwhile the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increased almost twofold. The administration of Neamon-hepa to mice with experimental liver damage contributed to the increase of antioxidant enzyme activities and reduce the level of lipid peroxidation products. These findings suggest that Neamon-hepa exhibits potent hepatoprotective and antioxidant effects in mice treated with CCl<sub>4</sub>. Preclinical studies of Neamon-hepa capsules demonstrated its polyfunctional action. The drug spectrum of activity suggest its useful for the treatment of hepatitis symptoms and to reduce the risk of liver cirrhosis complications.

*Key words: combined drug, Neamon-hepa, hepatoprotective effects, antioxidant properties*

---

Поступила: 25.12.2013 г.

**Контактное лицо:** Парий Сергей Борисович, д.ф.н., профессор, Научный Центр Исследования Лекарств Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета, Кишинев, Республика Молдова. Тел.: +37 322 205 454. Электронная почта: valicavlad@gmail.com

А. М. Дорошенко

## Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення

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

*Ключові слова: нанофармакологія, біобезпечність, наночастинок заліза, гостра токсичність*

Протягом останніх десятиліть наноматеріали привертають значну увагу в науковій, технологічній, комерційній сферах, що пов'язано з їхніми унікальними властивостями та потенціалом для розробки специфічних і селективних процесів [1]. Незважаючи на те, що все більше продуктів, які містять нанорозмірні компоненти, пропонуються споживачам, існує необхідність зосередження фінансових та інтелектуальних ресурсів на вирішення ключових питань безпечності наноматеріалів для уникнення можливих несприятливих наслідків як для здоров'я населення, так і для навколишнього середовища [2]. Потенційні шкідливі ефекти наноматеріалів покликана вивчати **нанотоксикологія** – галузь науки, що спрямована на отримання інформації щодо взаємозв'язку між токсичністю наночастинок та їхньою кількістю (дозою, концентрацією) і фізико-хімічними властивостями, такими як розмір, форма, склад, реакційна здатність тощо [3].

Для вирішення завдань, що поставлені перед галуззю охорони здоров'я на сучасному етапі, неминучим стає застосування наноматеріалів, нанокомпозитів, нанопрепаратів, отриманих за допомогою нанотехнологій. Одним з таких завдань є підвищення ефективності лікування найрозповсюдженіших захворювань, зокрема, анемії, на яку за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я страждає близько чверті населення Землі. У світі найвища захворюваність на анемію в дітей дошкільного віку, яка складає 47,4 %, найнижча – серед чоловіків і становить

12,7 %. Основними причинами анемії є дефіцит заліза, а також полідефіцитні стани [4, 5]. Недостатня ефективність і безпечність препаратів для лікування залізодефіцитної анемії, що пов'язана з зниженою біодоступністю елементарного заліза та, як наслідок, необхідністю призначення препаратів заліза у порівняно високих дозах, обумовлює пошук потенційних субстанцій для створення лікарських засобів із застосуванням нанотехнологій. Ключовою властивістю речовини в нанорозмірному діапазоні є підвищена біологічна і фармакологічна активність, що служить важливим обґрунтуванням розробки протианемічних препаратів на основі наночастинок [6].

Наночастинок заліза (НЧЗ) є потенційною фармацевтичною субстанцією для розробки новітнього ефективного протианемічного лікарського засобу. За даними літератури [7, 8] наночастинок оксидів заліза, зокрема, магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), стимулюють обмін заліза в організмі та посилюють еритропоєз. Це є підґрунтям вивчення та клінічного застосування ферумоксиголу – першого ін'єкційного лікарського засобу, який містить наночастинок оксиду заліза та призначається для лікування залізодефіцитної анемії в дорослих пацієнтів із хронічною хворобою нирок [9, 10]. Але не дивлячись на ефективність ферумоксиголу, продемонстровану в клінічних випробуваннях, питання безпечності цього нанопрепарату остаточно не вирішене [11].

Проблеми безпечності стосуються й інших препаратів, що містять нанозалізо. Деякі діагностичні засоби на основі наночастинок оксидів заліза, подібні до ферумоксиголу, сьогодні затверджені Food and Drug Administration (FDA), мають унікальні суперпарамагнітні



властивості та застосовуються як засоби для посилення контрастності зображень при проведенні магнітно-резонансної томографії. Однак у зв'язку з тим, що досвід клінічного застосування таких нанопрепаратів є незначним, питання безпечності, особливо у віддалені терміни після їхнього введення в організм, ще передчасно вважати вирішеним [12, 13].

Наночастинки нуль-валентного заліза ( $\text{Fe}^0$ ) мають високу активність у окисно-відновних процесах і все більше застосовуються для очищення навколишнього середовища від забруднювачів органічного та неорганічного походження [14]. Однак токсикологічні наслідки, які при цьому можуть виникати в екосистемах, залишаються маловідомими. Так, нещодавно показано, що наночастинки  $\text{Fe}^0$  через здатність знижувати вміст кисню та стимулювати утворення вільних радикалів шляхом окиснення металічного заліза ( $\text{Fe}^0$ ) до  $\text{Fe}^{2+}$  та  $\text{Fe}^{3+}$  можуть викликати порушення життєдіяльності фауни ґрунтів і водойм та потенційно загрожувати екологічному стану місцевостей, де вони застосовуються [15, 16]. У дослідженні ефекту часткового окиснення («старіння») та модифікації поверхні наночастинок  $\text{Fe}^0$  на потенційну нейротоксичність за умов *in vitro* на культурах клітин мікроглії (BV2) і нейронів (N27) гризунів було встановлено, що наночастинки  $\text{Fe}^0$  спричиняють найвищу активність оксидативного стресу в клітинах мікроглії та понижують вміст АТФ у нейронах порівняно із наночастинами магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), наночастинами  $\text{Fe}^0$  з модифікованою поверхнею за допомогою полімерного покриття, а також «старими», частково окисненими наночастинами  $\text{Fe}^0$ , синтезованими більш ніж 11 місяців тому. При цьому в клітинах мікроглії спостерігали набухання мітохондрій, прояви апоптозу, а в нейронах – перинуклеарні включення та гранульованість цитоплазми. Тобто, часткове або повне окиснення наночастинок  $\text{Fe}^0$  призводить до пониження їхньої окисно-відновної активності, що ймовірно знижує токсичність відносно клітинних культур ссавців [17]. Але в зв'язку з

тим, що вивчення біобезпечності наноматеріалів є відносно новим науковим напрямом, відомості стосовно біологічної активності та токсичності наночастинок  $\text{Fe}^0$  за умов *in vitro*, *in vivo* є сьогодні неповними та недостатньо систематизованими.

Отже, не дивлячись на те, що засоби на основі нанозаліза затверджені до медичного застосування в багатьох розвинутих країнах і використовуються як лікарські та діагностичні нанопрепарати, а також в екологічній сфері в рамках новітніх проектів, спрямованих на знешкодження забруднювачів навколишнього середовища, у цілому ще недостатньо даних стосовно їхньої біобезпечності, а також тонких механізмів взаємодії з біологічними об'єктами. Результатом плідної роботи та міждисциплінарної співпраці в галузі вирішення даної проблеми в Україні стала розробка методичних рекомендацій для вивчення безпечності лікарських нанопрепаратів, у тому числі таких, що містять наночастинки металів [18]. Це є важливим кроком у напрямі створення вітчизняних лікарських засобів, отриманих із застосуванням нанотехнологій.

У рамках дослідження фармакологічних властивостей НЧЗ як перспективної протианемічної субстанції встановлення гострої токсичності при тих шляхах введення, що пропонуються для потенційного клінічного застосування, а саме пероральному і внутрішньовенному, є одним із найважливіших етапів доклінічного дослідження [19].

*Мета дослідження* – визначення параметрів гострої токсичності НЧЗ на лабораторних тваринах (мишах) за внутрішньоплункового та внутрішньовенного шляхів уведення.

*Матеріали та методи.* Сферичні наночастинки нуль-валентного заліза розміром 40 нм синтезовані в Інституті біологічної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України за оригінальним методом хімічної конденсації. Дослідження проведені на 74 самках і 56 самцях білих мишей лінії BALB/c масою 18–22 г, віком 2–2,5 міс із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи

про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС від 24.11.1986 р. № 609, наказу МОЗ України від 13.02.2006 р. № 66, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» 2006 р. Тварин, яких використовували в експериментах, утримували в стандартних умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця за температури 22–24 °С та відносної вологості 50–70 % з вільним доступом до корму та води. Групи тварин формували за методом рандомізації. Період карантину та акліматизації тривав протягом 7 діб. План експерименту схвалений Комітетом з біоетики НМУ імені О. О. Богомольця, усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами, були дотримані.

Дослідження гострої токсичності при внутрішньошлунковому введенні НЧЗ проведено згідно з методичними рекомендаціями [20, 21] на 10 самках мишей, з яких сформовано дослідну та контрольну групи по 5 тварин у кожній. Протягом 3–4 год перед введенням НЧЗ тварин утримували без корму з вільним доступом до води. Одноразове внутрішньошлункове введення НЧЗ дослідним мишам у дозі 5000 мг/кг за субстанцією здійснювали за допомогою спеціального металевго зонда. Мишам контрольної групи вводили в такий самий спосіб розчинник – воду для ін'єкцій.

Дослідження гострої токсичності при внутрішньовенному шляху введення НЧЗ проведено за 7 рівнів доз по 8 тварин на кожний для самок (130, 155, 180, 205, 230, 255 і 280 мг/кг за субстанцією НЧЗ) та 6 рівнів доз по 8 тварин на кожний для самців (180, 205, 230, 255, 280, 305 мг/кг за субстанцією

НЧЗ). НЧЗ вводили одноразово в латеральну хвостову вену. Тваринам з контрольних груп (8 самців і 8 самок) вводили в такий самий спосіб розчинник – воду для ін'єкцій. Протягом 14 діб здійснювали реєстрацію і підрахунок загиблих тварин за кожного з рівнів доз. На основі отриманих даних проводили пробіт-аналіз за D. J. Finney [22] із застосуванням комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4). У результаті було отримано значення середньосмертельної дози ( $LD_{50}$ ) та її стандартної помилки. При розрахунку показників гострої токсичності для обох статей враховувалися лише ті рівні доз, які вводили як самкам, так і самцям, а саме: 180, 205, 230, 255 та 280 мг/кг.

Після внутрішньошлункового або внутрішньовенного введення НЧЗ протягом 14 діб проводили щоденне спостереження за станом тварин, особливостями поведінки, положенням тіла і руховою активністю, споживанням корму та води. Реєстрували терміни розвитку симптомів інтоксикації та загибелі. Маса тварин визначали перед введенням НЧЗ та на 3, 7 і 14 (перед евтаназією) добу спостереження.

**Результати та їх обговорення.** Після одноразового внутрішньошлункового введення НЧЗ протягом 14 діб спостереження в контрольній та дослідній групах не загинула жодна тварина (табл. 1). Отже,  $LD_{50}$  при даному шляху введення перевищує 5000 мг/кг, що дозволяє віднести НЧЗ до практично нетоксичних речовин, тобто до V класу токсичності за Hodge H. C. і Sterner L. H. [23]. Протягом першої години після введення НЧЗ тварини дослідної групи споживали більше води. Крім того, протягом перших 3 год у мишей дослідної групи спостерігалось транзиторне прискорення моторно-евакуаторної

Таблиця 1

*Летальність самок мишей після одноразового внутрішньошлункового введення наночастинок заліза протягом 14 діб спостереження*

Група	Рівень дози, мг/кг	Загальна кількість тварин у групі	Кількість тварин, що загинула	
			абс.	%
Контрольна	0	n = 5	0	0
Дослідна	5000	n = 5	0	0

функції кишечника, а також чорне забарвлення фекалій. У подальшому відмінностей загального стану, рухової активності, харчової поведінки та набору маси тіла в тварин дослідної та контрольної групи протягом 14 діб спостереження не було. При розтині на 14 добу після введення НЧЗ візуально макроскопічних відмінностей будови органів у контрольній та дослідній групах не виявлено.

Летальність мишей після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ мала дозозалежний характер (табл. 2, 3).

Одразу після введення токсичних доз НЧЗ і протягом часу від 30 хв до 1 доби, який прямо залежав від рівня дози, у всіх тварин дослідних груп порівняно із контрольною спостерігалось пригнічення рухової активності та харчової поведінки, зниження м'язового тону, збільшення глибини дихальних рухів, рожеве забарвлення видимих ділянок шкірного покриву, розширення поверхнево розташованих судин вушних раковин. При найменших рівнях дози (130 мг/кг для самок і 180 мг/г для самців) вищевказані прояви були виражені слабо. Тварини, яким вводили максимальні дози НЧЗ (305 і 280 мг/кг), гинули протягом 1–60 хв. При цьому спостерігали явища гострої судинної недостатності

(колапсу) та судоми. У тварин, яким були введені найвищі дози НЧЗ, протягом першої доби спостерігали ознаки набряку легень, а саме: вимушене вертикальне положення тіла з опущеним каудальним і піднятим краніальним кінцем; значне посилення дихальних рухів; ознаки ціанозу, про що свідчило темне забарвлення кон'юнктиви; судоми. На піку вказаних проявів інтоксикації деякі тварини гинули. При цьому з дихальних шляхів загиблих мишей виділявся піноподібний уміст. Вищевказані симптоми вказують на переважне ураження серцево-судинної та дихальної систем та, як наслідок, нервової системи. Під час розтину тварин, які загинули протягом перших 8 год після введення НЧЗ, макроскопічно виявлено гіперемію очеревини та легень. У подальшому загибель тварин також спостерігали до 4 доби після введення НЧЗ включно на фоні значного зменшення маси тіла порівняно із контролем.

Після введення НЧЗ як серед самців, так і серед самок, окрім найнижчого рівня дози (130 мг/кг), спостерігали дозозалежне зменшення маси тіла на 3 добу приблизно на 2,8–10,3 % порівняно з показником перед введенням. У контрольних групах на 3 добу навпаки маса тіла самців і самок

Таблиця 2

*Летальність мишей після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок заліза залежно від рівня дози та статі протягом 14 діб спостереження*

Рівень дози, мг/кг	Самки, n = 64			Самці, n = 56		
	Кількість тварин, що загинули		Загальна кількість тварин	Кількість тварин, що загинули		Загальна кількість тварин
	абс.	%		абс.	%	
0	0	0	n = 8	0	0	n = 8
130	0	0	n = 8	–	–	–
155	1	12,5	n = 8	–	–	–
180	3	37,5	n = 8	0	0	n = 8
205	3	37,5	n = 8	2	25	n = 8
230	5	62,5	n = 8	3	37,5	n = 8
255	6	75	n = 8	7	87,5	n = 8
280	8	100	n = 8	7	87,5	n = 8
305	–	–	–	8	100	n = 8

Примітка. «–» Означає, що гостру токсичність при даному рівні дози не встановлювали.

Таблиця 3

*Загальна летальність самців і самок мишей (комбінований розрахунок) після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок заліза залежно від рівня дози протягом 14 діб спостереження*

Рівень дози, мг/кг	Самки та самці мишей, n = 96		
	Кількість тварин, що загинули		Загальна кількість тварин
	абс.	%	
0	0	0	n = 16
180	3	18,75	n = 16
205	5	31,25	n = 16
230	8	50,00	n = 16
255	13	81,25	n = 16
280	15	93,75	n = 16

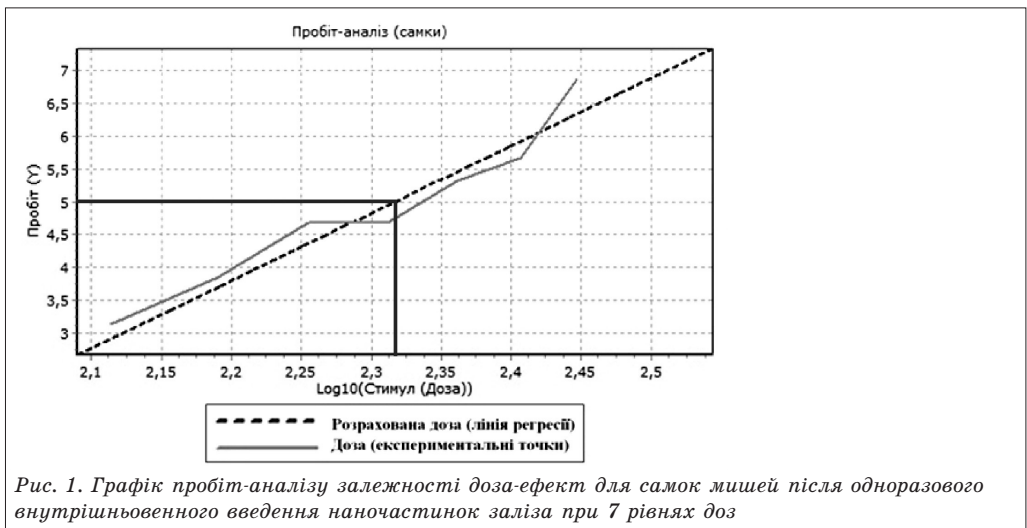
збільшувалася на 6,5 % та 9,1 % відповідно. При зважуванні мишей дослідних груп на 7 добу маса тіла наближалася до вихідних значень, а на 14 добу спостерігали подальше зростання даного показника в усіх групах, але з відставанням тварин дослідних груп порівняно з контролем.

Рухова та харчова поведінка мишей, яким вводили найнижчий рівень дози (130 мг/кг), практично не відрізнялася від контрольної групи, починаючи з 2 доби, а решти дослідних тварин, окрім рівня дози 280 мг/кг, – починаючи приблизно з 4–6 доби. При розтині тварин після евтаназії на 14 добу після введення НЧЗ візуально значних

макроскопічних відмінностей будови органів тварин контрольної та дослідних груп не виявлено.

На основі даних, представлених у таблицях 2 і 3, за допомогою комп'ютерної програми було побудовано графіки пробіт-аналізу гострої токсичності НЧЗ для самок, самців, а також для обох статей (комбінований розрахунок) (рис. 1–3). При цьому доза НЧЗ представлена в логарифмічній шкалі, а ефект (летальність) – у вигляді пробітів (так званих «probability units»). Розраховані значення  $LD_{50}$  та її стандартної помилки (табл. 4) свідчать, що до токсичного пливу НЧЗ більш чутливими виявилися самки, так як  $LD_{50}$  для самців приблизно на 11,5 % перевищує даний показник для самок. Дані значення  $LD_{50}$  дозволяють віднести субстанцію НЧЗ до рівня малотоксичних речовин, тобто IV класу токсичності за Н. С. Hodge і Л. Н. Sterner (якщо брати до уваги, що резорбтивні ефекти після внутрішньоочеревинного введення тотожні таким після внутрішньовенного введення) [23].

Представлені результати в цілому співпадають з даними інших авторів стосовно токсичності нанозаліза. Нещодавно S. P. Singh та співавторами встановлено, що магнітні наночастинок  $Fe_2O_3$  розміром 30 нм після одноразового перорального введення щурам у дозах 500–2000 мг/кг не викликають порушень росту та харчової поведінки тварин [24, 25]. В іншому дослідженні



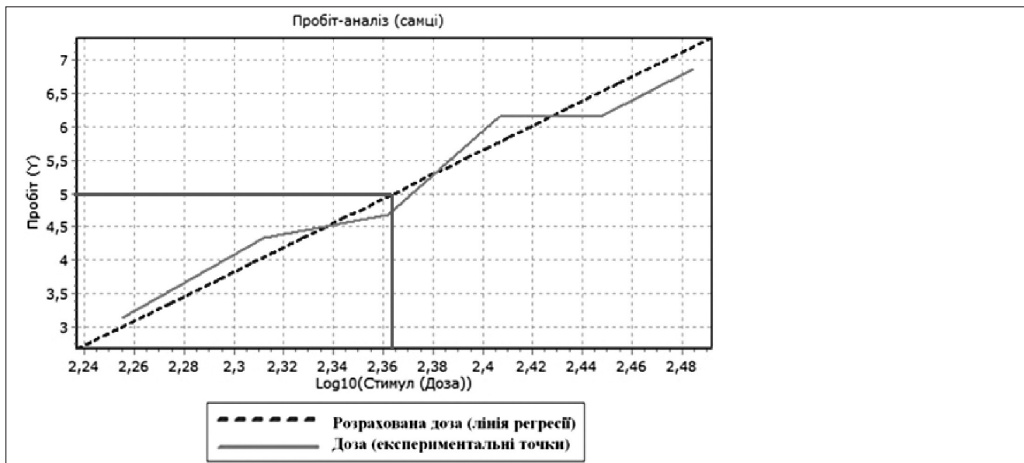


Рис. 2. Графік пробіт-аналізу залежності доза-ефект для самців мишей після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок заліза при 6 рівнях доз

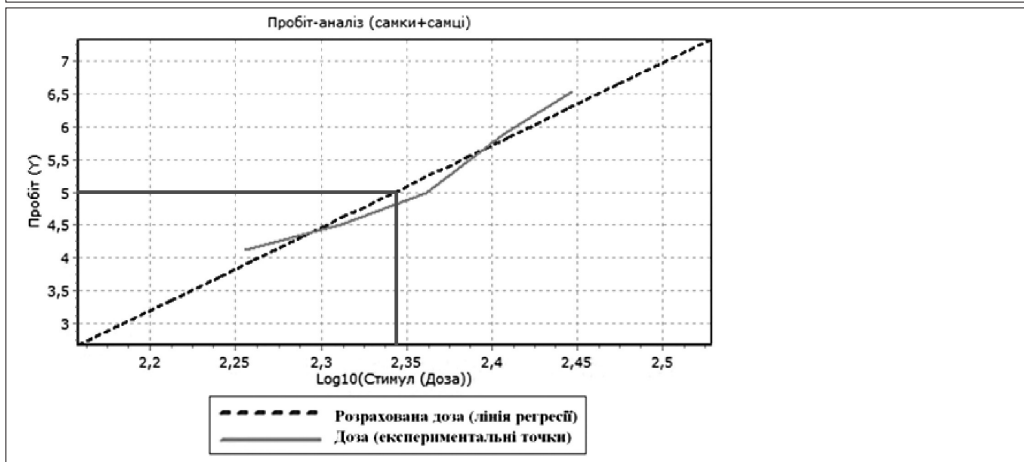


Рис. 3. Графік пробіт-аналізу залежності доза-ефект для самок і самців мишей (комбінований розрахунок) після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок заліза при 5 рівнях доз

показано, що при пероральному введенні мишам наночастинок заліза  $LD_{50}$  становить 8,41 г/кг [26]. А. Gajdosiková та співавторами встановлено, що  $LD_{50}$  при пероральному введенні мишам наночастинок  $Fe_3O_4$  перевищує 2000 мг/кг, а при внутрішньовенному введенні  $LD_{50}$  залежно від різновиду

поверхневого покриття наночастинок  $Fe_3O_4$  становить 231,7–558,9 мг/кг [27]. Близькі значення  $LD_{50}$ , а саме 163,6 мг/кг, визначені іншим авторським колективом при внутрішньовенному введенні мишам непокритих наночастинок оксиду заліза ( $Fe_3O_4$ ) розміром 9 нм [28]. За даними R.

Таблиця 4

Значення середньосмертельної дози наночастинок заліза після одноразового внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення мишам, мг/кг,  $M \pm m$

Шлях введення	Внутрішньовенний			Внутрішньошлунковий
	Самки, n = 64	Самці, n = 56	Обидві статі, n = 96	
Стать				Самки, n = 10
$LD_{50}$	207,5 ± 10,6	231,4 ± 8,1	220,3 ± 7,1	> 5000
Клас токсичності	IV	IV	IV	V

Weissleder та співавторів одноразове внутрішньовенне введення щурам наночастинок оксиду заліза з модифікацією поверхні за допомогою декстрану в максимальній дозі 168 мг/кг не призводило до загибелі тварин, а також не порушувало споживання корму та динаміку маси тіла [7]. У дослідженні на щурах О. В. Мінаєвою та співавторами показано, що LD<sub>50</sub> магнітної рідини на основі стабілізованих олеїною кислотою наночастинок магнетиту (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) розміром 5–15 нм при внутрішньовенному введенні становить 378 мг/кг [29]. Вищевказані значення LD<sub>50</sub> у цілому не протирічать представленим у даній статті фактичним результатам і розрахункам. Крім того, слід брати до уваги, що біологічна активність і токсичність наночастинок залежить від їхнього хімічного складу, форми, розмірів, функціоналізації поверхні та методу синтезу [1, 6].

Стосовно встановлення механізму токсичної дії нанозаліза, а також безпосередньої причини загибелі дослідних тварин за даними світової літератури беруться до уваги декілька аспектів. Як НЧЗ, так і наночастинок оксидів заліза можуть призводити до розвитку оксидативного стресу. Зокрема, у дослідженні на мишах Р. Ма та співавторами встановлено, що наночастинок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> розміром близько 35 нм при щоденному внутрішньоочеревинному введенні протягом тижня в дозі до 40 мг/кг викликають порушення антиоксидантно-прооксидантної рівноваги в тканинах печінки й нирок, на користь чого свідчить зростання рівня маркерів оксидативного стресу [30]. У роботі С. Р. Кеєпан та співавторів за умов *in vitro* показано утворення реактивних сполук кисню й окисне пошкодження епітеліальних клітин бронхів людини під впливом наночастинок Fe<sup>0</sup> (НЧЗ) та продуктів їхнього окиснення (Fe<sup>2+</sup> та Fe<sup>3+</sup>) [31].

У механізмі токсичної дії нанозаліза можуть бути залучені й інші механізми, зокрема, порушення з боку серцево-судинної системи. Нещодавно Н. К. Іверсен та співавторами було встановлено, що після внутрішньовенної ін'єкції мишам наночастинок

γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> у дозі 10 мг/кг знижується середній артеріальний тиск, а також пригнічується скоротливість мезентеріальних артерій [32]. Не виключено, що описані зміни можуть пояснювати явища колапсу одразу після внутрішньовенного введення нанозаліза. Крім того, до розвитку гострих порушень кардіогемодинаміки можуть бути залучені й інші процеси. Так, експериментально було показано, що внутрішньовенне введення наночастинок оксиду заліза щурам в абсолютно смертельній дозі (450 мг/кг) призводило до загибелі тварини протягом 1–30 хв [29]. Причину такого швидкого ефекту автори вбачають у мікроеMBOLІ легеневого судинного русла, що під час розтину підтверджувалося повнокров'ям венозних судин, збільшенням правих відділів серця, а також даними, отриманими світловою мікроскопією.

У представленому в цій статті дослідженні після внутрішньовенного введення летальних доз НЧЗ спостерігали три періоди смертності піддослідних мишей: перший (найгостріший) – протягом перших 1–60 хв після введення, другий (гострий) – протягом 1 доби, третій (підгострий) – протягом 2–4 доби на фоні значного зменшення маси тіла. З огляду на представлені дані літератури стосовно механізму токсичної дії можна зробити припущення про переважне ураження серцево-судинної та дихальної систем, що проявлялося у вигляді симптомів вазодилатації, колапсу, а також набряку легень у перші два періоди інтоксикації, та провідне значення оксидативного пошкодження та загальнотоксичного впливу на органи й системи в підгострому періоді інтоксикації, що призводило до значного зменшення маси тіла або навіть загибелі піддослідних тварин.

## Висновки

1. Сферичні наночастинок нульвалентного заліза (НЧЗ) розміром 40 нм, отримані за допомогою методу хімічної конденсації, належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) за внутрішньовенного та до

V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за внутрішньошлункового введення мишам лінії BALB/c за класифікацією Н. С. Hodge і Л. Н. Sterner.

2. Встановлено статево залежність гострої токсичності НЧЗ при внутрішньовенному введенні мишам: LD<sub>50</sub> для самок, самців і обох статей становить 207,5 ± 10,6 мг/кг, 231,4 ± 8,1 мг/кг і 220,3 ± 7,1 мг/кг відповідно.

3. Після внутрішньовенного введення НЧЗ у токсичних дозах мишам протягом першої доби спостерігали дозозалежні порушення з боку серцево-судинної, дихальної і нервової систем. Однак введення найменших рівнів доз (130 мг/кг для самок і 180 мг/кг для самців), що застосовані в даному дослідженні, призводило до незначного й короткотривалого порушення загального стану тварин.

1. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація: Монографія / [І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук та ін.]. – К. : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
2. Pumera M. Nanotoxicology: the molecular science point of view / M. Pumera // Chem. Asian. J. – 2011. – V. 6, № 2. – P. 340–348.
3. Santamaria A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology / A. Santamaria // Methods Mol. Biol. – 2012. – V. 926. – P. 1–12.
4. Anaemia in low-income and middle-income countries / Y. Balarajan, U. Ramakrishnan, E. Ozaltin [et al.] // Lancet. – 2011. – V. 378, № 9809. – P. 2123–2135.
5. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Ed. by B. de Benoist, E. McLean, I. Egli and M. Cogswell. – 2008. – 48 p.
6. Чекман І. С. Нанофармакологія: Монографія / І. С. Чекман. – К. : Задруга, 2011. – 424 с.
7. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity / R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad [et al.] // AJR. – 1989. – V. 152, № 1. – P. 167–173.
8. Patent Salah application WO/2010/034319, International classes A61K9/51; A61K38/26; A61P7/06; A61K9/51; A61K38/26; A61P7/00. Magnetite nanoparticles as a single dose treatment for iron deficiency anemia / El-Din T. A., Bakr Mohamed M., Kamel H. M., Abdel Kader M.; assignee Innovative Research and Development Co. (Inrad) (14 El Saudia Building, Gulf Area Heliopolis, Cairo, EG). – № EG2008/000036; filing date 29.09.2008, published 01.04.2010.
9. McCormack P. L. Ferumoxytol: in iron deficiency anaemia in adults with chronic kidney disease / P. L. McCormack // Drugs. – 2012. – V. 72, № 15. – P. 2013–2022.
10. Efficacy and safety of IV ferumoxytol for adults with iron deficiency anemia previously unresponsive to or unable to tolerate oral iron / S. Vadhan-Raj, W. Strauss, D. Ford [et al.] // Am. J. Hematol. – 2013. – Epub ahead of print.
11. Pai A. B. Ferumoxytol: a silver lining in the treatment of anemia of chronic kidney disease or another dark cloud? / A. B. Pai, A. O. Garba // J. Blood Med. – 2012. – V. 3. – P. 77–85.
12. Winer J. L. The use of nanoparticles as contrast media in neuroimaging: a statement on toxicity / J. L. Winer, C. Y. Liu, M. L. Apuzzo // World Neurosurg. – 2012. – V. 78, № 6. – P. 709–711.
13. Investigating the toxic effects of iron oxide nanoparticles / S. J. Soenen, M. De Cuyper, S. C. De Smedt [et al.] // Methods Enzymol. – 2012. – V. 509. – P. 195–224.
14. Crane R. A. Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology / R. A. Crane, T. B. Scott // J. Hazard. Mater. – 2012. – V. 211–212. – P. 112–125.
15. El-Temsah Y. S. Ecotoxicological effects on earthworms of fresh and aged nano-sized zero-valent iron (nZVI) in soil / Y. S. El-Temsah, E. J. Joner // Chemosphere. – 2012. – V. 89, № 1. – P. 76–82.
16. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish / P. J. Chen, C. H. Su, C. Y. Tseng [et al.] // Pollut. Bull. – 2011. – V. 63, № 5–12. – P. 339–346.
17. Partial oxidation ("aging") and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron / T. Phenrat, T. C. Long, G. V. Lowry [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2009. – V. 43, № 1. – P. 195–200.
18. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів / І. М. Трахтенберг, З. Р. Ульберг, І. С. Чекман [та ін.] // Методичні рекомендації. – К. : 2013. – 108 с.
19. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 – Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>
20. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2002. – 527 с.
21. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Organization for Economic Cooperation and Development. – Paris, France: 2008. – 27 p.
22. Finney D. J. Probit Analysis. – 3rd edition, chapt. 3 and 4. / D. J. Finney. – Cambridge: Cambridge University Press, 1971. – 333 p.
23. Hodge H. C. Tabulation of toxicity classes / H. C. Hodge, L. H. Sterner // Am. industr. Hyg. Ass. Quart. – 1943. – V. 10, № 4. – P. 93.

24. Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats / M. Kumari, S. Rajak, S. P. Singh [et al.] // Drug. Chem. Toxicol. – 2013. – V. 36, № 3. – P. 296–305.
25. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment / S. P. Singh, M. F. Rahman, U. S. Murty [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. – V. 266, № 1. – P. 56–66.
26. Фармакологічні та протипухлинні властивості ферромагнітних наночастиць заліза / В. С. Мосиенко, А. П. Бурлака, Н. Ф. [и др.] // Нанорозмірні системи: строєння, властивості, технології (НАНСИС–2013): Тезиси IV Міжнарод. науч. конф. (Київ, 19–22 нояб. 2013 г.) / редкол. : А. Г. Наумоєв [и др.]. – Київ, 2013. – VIII с. + 578 с.
27. Acute toxicity of magnetic nanoparticles in mice / A. Gajdosíková, A. Gajdosík, M. Koneřacká [et al.] // Neuro Endocrinol. Lett. – 2006. – V. 27, № 2. – P. 96–99.
28. The in vivo investigation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanoparticles acute toxicity in mice / S. Zhao, X. Lin, L. Zhang [et al.] // Biomed. Eng. Appl. Basis Commun. – 2012. – V. 24, № 3. – P. 229–236.
29. Исследование острой токсичности магнитной жидкости на основе магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, стабилизированного олеиновой кислотой / О. В. Минаева, Н. Н. Зырняева, Г. С. Столяров [и др.] // Наноэкология: материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием 6–7 сентября 2011 года, г. Саратов (<http://www.ntsr.info/nor/structure/sections/medical-biologic/6706.htm>).
30. Intraperitoneal injection of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice / P. Ma, Q. Luo, J. Chen [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 4809–4818.
31. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells / C. R. Keenan, Goth- R. Goldstein, D. Lucas [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2009. – V. 43, № 12. – P. 4555–4560.
32. Superparamagnetic iron oxide polyacrylic acid coated  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles do not affect kidney function but cause acute effect on the cardiovascular function in healthy mice / N. K. Iversen, S. Frische, K. Thomsen [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. – V. 266, № 2. – P. 276–288.

**А. М. Дорошенко**

### **Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення**

Унікальні фізичні та хімічні властивості, а також підвищена біологічна та фармакологічна активність нанорозмірних і наноструктурних матеріалів робить їх перспективними засобами для застосування в медицині та фармації. Пошук і розробка нового класу фармацевтичних субстанцій з протианемічними властивостями для ефективного лікування пацієнтів із залізодефіцитною анемією є актуальною задачею, тому що існуючі протианемічні препарати мають недостатню ефективність та побічні ефекти. Наночастинки нуль-валентного заліза (НЧЗ) характеризуються підвищеною біологічною активністю на молекулярному рівні. Як один з етапів вивчення біобезпеки НЧЗ у даній роботі досліджена їхня гостра токсичність за одноразового внутрішньошлункового та внутрішньовенного введення мишам, тому що саме ці шляхи введення передбачаються за клінічного застосування. Встановлено, що згідно з токсикологічною класифікацією речовин НЧЗ належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) за внутрішньовенного та до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за внутрішньошлункового введення. У дослідженні обговорюються прояви та можливі механізми токсичної дії НЧЗ.

*Ключові слова:* нанофармакологія, біобезпечність, наночастинки заліза, гостра токсичність

**А. М. Дорошенко**

### **Исследование острой токсичности наночастиц железа при внутрижелудочном и внутривенном путях введения**

Уникальные физические и химические свойства, а также повышенная биологическая и фармакологическая активность наноразмерных и наноструктурных материалов делает их перспективными для применения в медицине и фармации. Поиск и разработка нового класса фармацевтических субстанций с противоанемическими свойствами для эффективного лечения пациентов с железодефицитной анемией является актуальной задачей, так как существующие противоанемические препараты имеют недостаточную эффективность и вызывают побочные эффекты. Наночастицы нуль-валентного железа (НЧЖ) характеризуются повышенной биологической активностью на молекулярном уровне. В качестве одного из этапов изучения биобезопасности НЧЖ в данной работе была исследована их острая токсичность при однократном внутрижелудочном и внутривенном введении мышам, так как именно эти пути введения предполагаются при клиническом применении. Установлено, что по токсикологической классификации веществ НЧЖ относятся к IV классу токсичности (малотоксичные вещества) при внутривенном и к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества) при внутрижелудочном пути введения. В исследовании обсуждаются проявления и возможные механизмы токсического действия НЧЖ.

*Ключевые слова:* нанофармакология, биобезопасность, наночастицы железа, острая токсичность



---

---

**A. M. Doroshenko**

**Study of iron nanoparticles acute oral and intravenous toxicity**

Unique physical and chemical properties, as well as enhanced biological and pharmacological activity of nanoscale and nanostructured materials make them a promising tool to address contemporary challenges in the field of medicine and pharmacy. Iron deficiency anemia is one of the most wide-spread pathological states in the world according to the World Health Organization data. Searching and development of new pharmacological substances with antianemic properties for effective treatment of patients with iron deficiency anemia are very urgent, because available commercial antianemic preparations demonstrate some disadvantages and side effects according to their low bioavailability, and, as a result, the need to use at comparatively high doses. Zero-valent iron nanoparticles (FeNPs) are possessed by high potential in this area due to the enhanced biological activity of metal nanoparticles on the molecular level. On the other hand, the problem of nanomaterials toxicity is a key parameter in order to assess "risk-benefit" ratio. As a step of biosafety evaluation acute toxicity of single intragastric and intravenous introduction of FeNPs to mice has been studied, because these routes of potential clinical administration are considered. Limit-test procedure and probit analysis were used for LD<sub>50</sub> estimation. It was found that according to the toxicological classification of substances FeNPs belong to IV toxicity class (low toxic substances) for intravenous and V toxicity class (practically non-toxic substances) for intragastric route of administration according to Hodge H. C. and Sterner L. H. classification. Symptoms of intoxication and possible mechanisms involved are also discussed in the study.

*Key words: nanopharmacology, biosafety, iron nanoparticles, acute toxicity*

---

*Надійшла: 23.12.2013 р.*

**Контактна особа:** Дорошенко Андрій Михайлович, аспірант, кафедра фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03057. Тел.: +38 096 933 13 55. Електронна пошта: amdor@mail.ru

К. И. Клименко<sup>1</sup>, Т. В. Новохацкая<sup>1</sup>, В. И. Поляков<sup>2</sup>,  
О. И. Жуковский<sup>2</sup>, В. Н. Бондарь<sup>2</sup>, А. И. Соловьев<sup>1</sup>

## Влияние диизопропилфосфат- олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на выходящие калиевые токи в миоцитах аорты крыс с экспериментальным диабетом

<sup>1</sup>ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев  
<sup>2</sup>Международный благотворительный фонд «Киевская Русь», г. Киев

*Ключевые слова: сосудистые осложнения сахарного диабета, гладкомышечные клетки, K<sup>+</sup>-каналы, желчные кислоты*

За последние десятилетия количество пациентов с метаболическим синдромом (МС) и диабетом II типа достигло масштабов эпидемии. МС может быть определен как комплекс различных, но связанных между собой нарушений в организме, таких как ожирение абдоминально-висцерального типа, инсулинорезистентность, дислипидемия, увеличение артериального давления и нарушения в системе свертываемости крови, способствующие развитию тромбозов. МС предшествует возникновению таких болезней, как атеросклероз, артериальная гипертензия и сахарный диабет [1].

Широко известным фактом является сопряженность осложнений сахарного диабета с ухудшением функционального состояния сосудов, что приводит к развитию ретинопатии, нефро- и нейропатии, кардиомиопатии, атеросклероза [2].

Исходя из этого актуальными являются исследования функциональной активности сосудистой стенки в условиях патологии и под влиянием биологически активных веществ, обладающих способностью восстанавливать ее функциональное состояние.

В данной работе были использованы лабораторные образцы препарата Орион, действующим началом которого является диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоль таурохолевой кислоты (ДОТК). Этот препарат обладает геро-

протекторными свойствами [3], однако отсутствует информация о его влиянии на функционирование сосудистой стенки при хронических заболеваниях сердечно-сосудистой системы и сахарном диабете.

Таурохолевая кислота, также известная как холетаурин (cholaic acid, cholyltaurine, или acidum cholatauricum), является желчной кислотой (ЖК), которая вовлечена в процесс эмульгирования жиров. Она встречается в виде натриевой соли в желчи млекопитающих. Таурохолевая кислота является конъюгатом холевой кислоты с таурином. В медицинских целях ее используют в качестве холеретического и холекинетического средства [4].

ЖК являются стероидными кислотами, которые в основном встречаются в желчи млекопитающих. В результате соединения ЖК с катионом, обычно натрием, образуются желчные соли. В организме человека соли таурохолевой и гликохолевой кислоты (производных холевой кислоты) составляют около 80 % всех солей ЖК. При изучении состава кишечной желчи человека были обнаружены ЖК, их конъюгаты с глицином и таурином, а также 7-альфа-дегидроксилированные производные (деоксихолевая и литохолевая кислота). Увеличение притока желчи сопряжено с увеличением секреции ЖК, основной функцией которых является участие в формировании мицелл, способствующих переработке пищевых жиров.

Казалось бы, какая связь может существовать между ЖК и функционированием сосудов?

Новая эра в исследованиях желчных кислот (ЖК) началась в 1999 году, когда было установлено [5], что ЖК являются естественными лигандами ядерных фарнезоидных рецепторов (NR1H4), или фарнезол X-рецепторов (FXR), или рецепторов желчной кислоты (BAR).

Дальнейшее изучение роли желчных кислот дало более чем неожиданные результаты. Так, ЖК, связываясь с FXR, играют роль «метаболических интеграторов» в контроле уровня жиров, глюкозы, а также энергетического метаболизма через модуляцию генной экспрессии. Кроме того, ЖК участвуют в сигнальных путях, которые могут быть как зависимыми, так и независимыми от FXR сигнального пути, а также вовлекать G-белок связанный рецептор TGR5/Gpbar1 [1].

Эти знания открыли новые возможности для изучения стратегий профилактики и лечения метаболических заболеваний, включая сахарный диабет. Эксперименты *in vitro* указывают на то, что FXR экспрессируются как в сосудистых гладкомышечных клетках (ГМК) [6], так и в эндотелиальных клетках (ЭК).

В ряде исследований было показано, что активация FXR в сосудистых ГМК крыс приводит к апоптозу, так как индуцирует экспрессию генов-мишеней FXR – SHP (небольшой гетеродимерный компонент), а также PLTP (белок-передатчик фосфолипидов) [7].

С другой стороны, в ЭК FXR непосредственно повышает активацию транскрипции промотера гена эндотелиальной NO-синтазы, что приводит к увеличению продукции NO в сосудистых ЭК [8]. Общеизвестно, что эндотелий играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса в условиях нормы и патологии. Дисбаланс между вазодилаторным агентом NO и эндотелином-1, который является вазоконстриктором, способствует развитию эндотелиальной дисфункции, что особенно ярко выражается при инсулинорезистентности и сахарном диабете.

Показано, что пул желчных кислот существенно увеличивается при некоторых моделях сахарного диабета

I типа у крыс, таких как диабетические крысы линии Вистар, а также у крыс после введения стрептозотоцина или аллоксана [9]. Вполне вероятно, что FXR может быть также одной из молекулярных связей между измененным метаболизмом ЖК и диабетическим статусом.

В 2007 году Kobayashi и др. [10] доказали наличие молекулярных связей между желчными кислотами и метаболизмом глюкозы. Более того, они также предположили, что метаболические пути желчных кислот могут являться новыми фармакологическими мишенями для лечения инсулинорезистентности и сахарного диабета.

Цель исследования – изучение влияния ДОТК на суммарный выходящий калиевый ток в гладкомышечных клетках аорты крыс с экспериментальным диабетом.

**Материалы и методы.** *Индукция сахарного диабета.* Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар (180–200 г). Диабет был индуцирован однократным внутривентральным введением стрептозотоцина (STZ) в дозе 60–65 мг/кг. Развитие экспериментального диабета оценивали по наличию гипергликемии.

Концентрацию глюкозы в крови измеряли через 1 мес после введения STZ и в день эксперимента. STZ растворяли в цитратном буферном растворе, который содержал 0,9 % NaCl и 10 мМ цитрата, pH = 4,6. Концентрацию глюкозы определяли с помощью глюкометра Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцария).

*Изоляция одиночных гладкомышечных клеток аорты крысы.* Все опыты на животных проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и других целях, и были одобрены комитетом по этике института.

Изолированные гладкомышечные клетки выделяли из грудного отдела аорты взрослых крыс линии Вистар (180–200 г) с помощью коллагеназы. После предварительной интраперитонеальной анестезии (кетамин 45 мг/кг, ксилазин 10 мг/кг) животным

была проведена этаназия путем декапитации с последующим обескровливанием.

Сегменты грудной аорты длиной 1,0–1,5 см вырезали и очищали от соединительной ткани. Затем аорту разрезали на маленькие кусочки ( $2 \times 2$  мм), которые помещали в холодный безкальциевый раствор, содержащий (в ммол/л): 140 NaCl; 5,9 KCl; 2,5 MgCl<sub>2</sub>; 11,5 глюкозы; 10 HEPES (pH = 7,4), на 10–15 мин. После этого ткани переносили в аналогичный раствор с добавлением 2 мг/мл коллагеназы (тип IA), 0,5 мг/мл проназы E и 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и инкубировали на протяжении 33 мин при 37 °С. Затем их переносили в безкальциевый раствор для отмычки от ферментов. Клетки выделяли путем многократного пипетирования и помещали в нормальный раствор Кребса. Миоциты хранили в холодильнике при + 5 °С. Они оставались в хорошем функциональном состоянии в течение не менее 4 ч.

*Регистрация выходящего тока.* Для регистрации калиевых токов был использован метод фиксации потенциала (patch-clamp) в модификации «целая клетка» («whole-cell perforated patch») с использованием амфотерицина В. Ионные токи регистрировали с применением усилителя Axopatch 200B и конвертора Digidata 1200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA), сопряженных с IBM-совместимым компьютером с соответствующим программным обеспечением (pClamp software, version 8, Axon Instruments Inc., USA). Мембранные токи отфильтровывали с частотой среза 2 кГц и оцифровывали с частотой 10 кГц. Референтный Ag-AgCl электрод был размещен непосредственно в камере для клеток объемом 200 мкл.

В начале каждого эксперимента электродный потенциал нивелировался до нуля. Компенсацию токов утечки при регистрации трансмембранных токов не проводили, клетки с большим током утечки исключали из опыта. Амплитуды токов выражали как пА/пФ. Мембранную емкость клеток оценивали путем интегрирования емкостных токов, возникающих при гиперпо-

лярзирующем смещении потенциала на 10 мВ, после электронного устранения токов через емкость пипетки с помощью Clampfit software (version 8, Axon Instruments Inc., USA). Все эксперименты проводили при температуре 20 °С.

Микропипетки изготовлены из боросиликатного стекла (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England). Их заполняли пипеточным раствором следующего состава (в ммол/л): 140 KCl; 10 NaCl; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, 11,3 D-глюкоза, 2 EGTA и 1 CaCl<sub>2</sub> (pH = 7,3); амфотерицин В (250 мкг/мл). Пипетки имели сопротивление 2,5–5,0 МОм. Внеклеточный раствор содержал (в ммоль/л): 140 NaCl; 5,9 KCl, 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, 11,3 D-глюкозы (pH=7,4).

*Реактивы.* Амфотерицин В, коллагеназа (тип IA), проназа E, бычий сывороточный альбумин, компоненты раствора Кребса, HEPES были произведены Sigma Chemicals Co. (St. Lois, MO, USA).

*Статистическая обработка результатов.* Результаты электрофизиологических измерений и данные регистрации сократительной активности гладких мышц представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего (m) для определенной выборки (n). n – число исследованных клеток, причем все клетки были получены от разных животных.

Множественные сравнения между величинами проводили с помощью теста ANOVA. Если обнаруживали достоверную разницу в параметрах, то использовали пост-тест Тьюки. Отличия считали достоверными, если P было меньше 0,05.

*Результаты и их обсуждение.* Существующие данные указывают на способность ЖК вызывать релаксацию гладких мышц как *in vitro* так и *in vivo* [11]. Тем не менее, молекулярные механизмы, лежащие в основе такой релаксации, практически неизвестны.

В первой серии экспериментов было исследовано влияние различных концентраций ( $10^{-6}$  М и  $10^{-5}$  М) ДОТК на

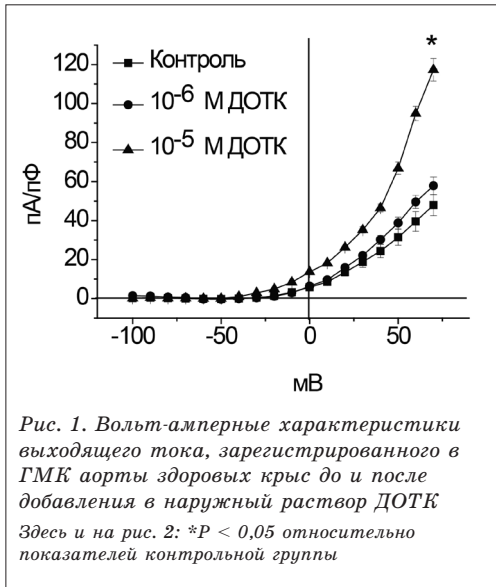


Рис. 1. Вольт-амперные характеристики выходящего тока, зарегистрированного в ГМК аорты здоровых крыс до и после добавления в наружный раствор ДОТК  
Здесь и на рис. 2: \* $P < 0,05$  относительно показателей контрольной группы

суммарный выходящий калиевый ток изолированных ГМК аорты контрольных крыс. Аппликацию препарата проводили непосредственно в камеру рабочей установки, где находились изолированные ГМК аорты крысы.

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении плотности суммарного выходящего тока с  $47,90 \pm 5,38$  пА/пФ ( $n = 6$ ) в интактных ГМК здоровых крыс до  $57,82 \pm 4,51$  пА/пФ ( $n = 5$ ,  $P < 0,05$ ) после аппликации ДОТК в концентрации  $10^{-6}$  М (рис. 1). Большой прирост тока был получен после аппликации ДОТК в концентрации  $10^{-5}$  М – в этом случае величина выходящего тока составляла  $117,33 \pm 5,75$  пА/пФ ( $n = 6$ ,  $P < 0,05$ ) (рис. 1). Зарегистрированный эффект ДОТК, как препарата на основе таурохолевой кислоты, на активность  $VK_{Ca}$  совпадает с данными других исследователей [12]. Так, есть данные о том, что ЖК влияют на функциональную активность гладких мышц сосудов, в основном за счет  $VK_{Ca}$  [12]. В частности, показано возрастание активности  $VK_{Ca}$  при действии различных ЖК (холевой, деоксихолевой, литохолевой, а также таурохолевой) в ГМК брыжеечных артерий здоровых кроликов [12]. Кроме того, идентичный эффект наблюдался и в ГМК легочной артерии и желчного пузыря кролика, желчного пузыря и кишечника морских свинок, матки

крыс [13], что свидетельствует о том, что непосредственная активация  $VK_{Ca}$  желчными кислотами является общим механизмом для различных типов ГМК. Возможным механизмом такой активации может быть непосредственное взаимодействие или собственно с каналным комплексом, или с тесно связанным с ним фосфолипидным окружением [12].

Целью следующей серии экспериментов стало изучение влияния ДОТК на суммарный выходящий калиевый ток в ГМК крыс с экспериментальным диабетом.

Диабетические крысы были взяты в эксперимент на 31 день после внутрибрюшинной инъекции STZ. Концентрация глюкозы в крови диабетических крыс составляла  $30,7 \pm 0,9$  ммМ/л ( $n = 6$ ;  $P < 0,05$ ) и была достоверно выше, чем в крови крыс контрольной группы ( $7,1 \pm 1,4$  ммМ/л,  $n = 6$ ). Величина суммарного выходящего тока в ГМК крыс с экспериментальным диабетом существенно отличалась от контрольной группы и составляла  $22,1 \pm 1,61$  пА/пФ ( $n = 8$ ;  $P < 0,05$ ) (рис. 2).

Хорошо известно, что выраженность сосудистых осложнений при сахарном диабете в значительной степени определяется степенью снижения вазодилаторного потенциала сосудистой стенки, который, в свою очередь, зависит от функции калиевых каналов в ГМК и ЭК [14]. При этом функциональная способность эндотелия сосудов секретировать и освобождать эндотелиальные

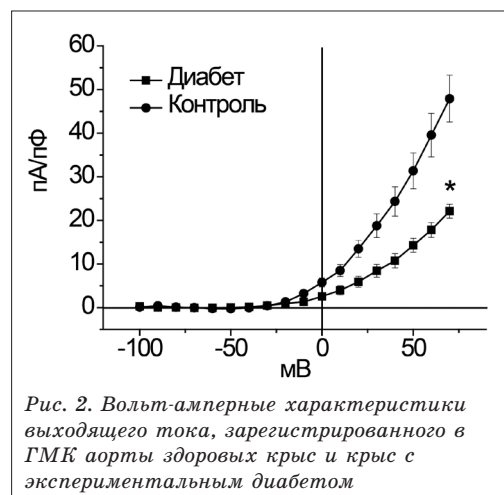


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики выходящего тока, зарегистрированного в ГМК аорты здоровых крыс и крыс с экспериментальным диабетом

факторы релаксации, в частности, оксид азота [2], резко снижается.

Установлено, что основной вклад в процесс гиперполяризации плазматической мембраны ГМК принадлежит  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемому  $\text{K}^+$ -каналам большой проводимости ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) [15], вследствие активации которых происходит выход ионов  $\text{K}^+$ , развитие гиперполяризации, что, в свою очередь, препятствует открытию  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, входу  $\text{Ca}^{2+}$  и последующей констрикции ГМК. Таким образом, нарушение функционирования  $\text{K}^+$ -каналов является одной из основных составляющих развития сосудистой дисфункции.

Апликация ДОТК в концентрации  $10^{-6}$  М приводила к достоверному возрастанию суммарного выходящего калиевого тока в ГМК диабетических крыс до  $27,2 \pm 0,99$  пА/пФ ( $n = 6$ ;  $P < 0,05$ ). Увеличение концентрации ДОТК до  $10^{-5}$  М способствовало увеличению его эффекта до  $29,1 \pm 0,78$  пА/пФ ( $n = 7$ ;  $P < 0,05$ ) (рис. 3).

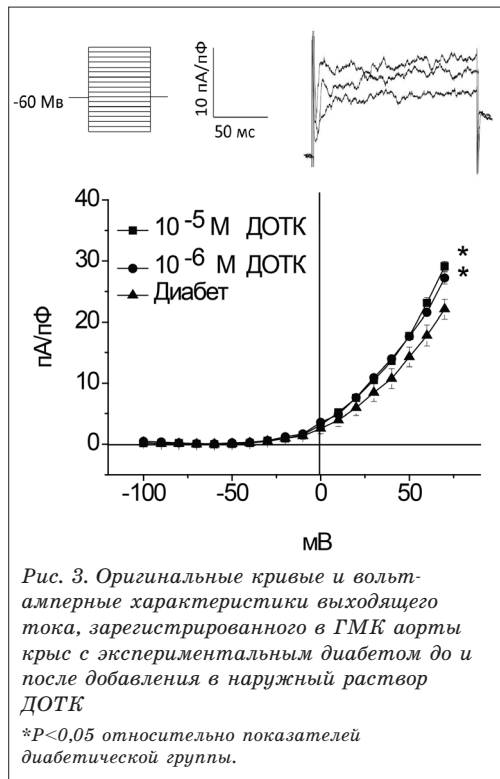
Такой эффект может быть связан с тем, что в результате гидролиза таурохолевой кислоты образуется таурин. Работы некоторых исследователей

показывают, что таурин способен снижать количество оксида азота путем связывания хлорноватистой кислоты, что, в свою очередь, вызывает вазоконстрикцию [16]. С недавнего времени в научных публикациях стали появляться данные, демонстрирующие эффективность таурина при лечении сахарного диабета, инсулинорезистентности, а также их осложнений. В частности, продолжительное введение таурина нормализуют ацетилхолин-индуцированное расслабление колец аорты крыс с сахарным диабетом [17].

Появляются новые результаты в исследованиях биологических эффектов таурина на сосудистую стенку в условиях нормы и патологии [18]. Показано, что таурин оказывает положительное влияние на функционирование сосудистой стенки как у спонтанно-гипертензивных крыс, вызывая снижение артериального давления [19], так и у крыс с экспериментальным диабетом (восстанавливая нарушения реактивности сосудов, вызванные окислительным стрессом и воспалением) [18], действуя как прямо, так и опосредовано. Среди возможных механизмов, которые вовлечены в нормализацию реактивности сосудов под действием таурина, кроме указанных выше, следует назвать активацию различных типов  $\text{K}^+$ -каналов ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  и  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) [20], возрастание продукции оксида азота и антиоксидантное действие [21]. Кроме того, такие эффекты могут быть вызваны снижением активации регуляторного фермента протеинкиназы С [22].

## Выводы

Таким образом, в результате наших исследований показано, что ДОТК вызывает возрастание амплитуды суммарного выходящего  $\text{K}^+$ -тока изолированных сосудистых ГМК как здоровых крыс, так и крыс с экспериментальным диабетом. Это свидетельствует о способности препарата увеличивать вазодилаторный потенциал сосудистой стенки при диабете, что позволяет рекомендовать его после проведения дальнейших исследований для лечения диабетических осложнений.



1. Role of bile acids receptors in metabolic regulation / P. Lefebvre, B. Carou, F. Lien [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89. – P. 147–191.
2. Mark A. Diabetes and Vascular Disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I / A. C. Mark, T. F. L. scher // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – P. 1527–1532.
3. Влияние препарата «Орион» на выживаемость в стрессорных условиях и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / X. K. Мурадян, В. Н. Бондарь, В. В. Безруков [и др.] // *Журн. АМН Украины* – 2009. – Т. 15, № 3. – С. 246–262.
4. Lambert M. *Surhone*, Mariam T. Tennoe, Susan F. Henssonow. Taurocholic Acid. – 2011. – P. 104.
5. Identification of a nuclear receptor for bile acids / M. Makisima, A. V. Okamoto, J. J. Repa [et al.] // *Science.* – 1999. – V. 284. – P. 1362–1365.
6. Bishop-Bailey D. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature / D. Bishop-Bailey, T. D. Walsh, T. D. Warner // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101. – P.3668–3673.
7. Farnesoid X receptor ligand inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration / Y. T. Li, K. E. Swales, G. J. Thomas [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* – 2007. – V. 27. – P. 2606–2611.
8. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells / J. Li, A. Wilson, R. Kuruba [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 77. – P. 169–177.
9. Nervi F. O. Studies on cholesterol metabolism in the diabetic rats / F. O. Nervi, A. Gonzalez, V. D. Valdivieso // *Metabolism.* – 1974. – V. 23. – P. 495–503.
10. Prevention and Treatment of Obesity? Insulin resistance and diabetes by bile acid-binding resin / M. Kobayashi, H. Ikegami, T. Fujisawa [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – V. 56. – P. 239–247.
11. Bomzon A. Bile acids as endogenous vasodilators? / A. Bomzon, P. Ljubuncic // *Biochem. Pharmacol.* – 1995. – V. 49. – P. 581–589.
12. Dopico A. Natural Bile Acids and Synthetic Analogues Modulate Large Conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  ( $BK_{Ca}$ ) Channel Activity in Smooth Muscle Cells / A. Dopico, J. Walsh, J. Singer // *Journal of General Physiology.* – 2002. – V. 119 (3).
13. Actions of bile salts and of papaverine and intracellular cyclic AMP in isolated rat uterus / T. Uruno, I. Takayanagi, K. Kubota, K. Takagi // *Eur. J. Pharmacol.* – 1975. – V. 32. – P. 116–119.
14. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone / J. Ledoux, M. E. Werner, J. E. Brayden [et al.] // *Physiology.* – 2006. – V. 21, № 1. – P. 69–78.
15. Nelson M. T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M. T. Nelson, J. M. Quayle // *Am. J. Physiol.* – 1995. – V. 268. – P. C799–C822.
16. Pennathur S. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease / S. Pennathur, J. W. Heinecke // *Curr. Diab. Rep.* – 2007. – V. 7. – P. 257–264.
17. Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas / K. L. J. Wang, Y. H. Yu, L. G. Zhang [et al.] // *Eur. J. pharmacol.* – 2008. – V. 597. – P. 75–80.
18. Worku A. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies / A. Worku, M. S. Mozaffari. // *Am. J. Cardiovasc. Dis.* – 2011. – V. 1 (3). – P. 293–311.
19. Militante J. D. Treatment of hypertension with oral taurine: experimental and clinical studies / J. D. Militante, J. B. Lombardini // *Amino Acids.* – 2002. – V. 23. – P. 381–393.
20. Effect of taurine on contractions of the porcine coronary artery / Y. Liu, L. Niu, W. Zhang, L. Cui [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – V. 61. – P. 681–689.
21. Taurine diabetes interaction: from involvement to protection / S. J. Kim, C. Ramesh, H. Gupta, W. Lee // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2007. – V. 21. – P. 63–77.
22. Abebe W. Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats / W. Abebe // *Life Sci.* – 2008. – V. 82, № 5–6. – P. 279–89.

**К. И. Клименко, Т. В. Новохацкая, В. И. Поляков, О. И. Жуковский,  
В. Н. Бондарь, А. И. Соловьев**

### **Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на выходящие калиевые токи в миоцитах аорты крыс с экспериментальным диабетом**

Целью данного исследования стало изучение влияния диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты (ДОТК), действующего вещества препарата Орион, на суммарный выходящий калиевый ток в гладкомышечных клетках (ГМК) аорты здоровых крыс и крыс с экспериментальным диабетом. Исследование было проведено с применением методики индукции диабета (стрептозотоциновая модель), методики ферментативного выделения гладкомышечных клеток аорты, а также методики регистрации трансмембранных ионных токов patch-clamp. Суммарный выходящий  $K^{+}$ -ток в ГМК аорты здоровых животных при максимальном уровне деполяризации +70 мВ составлял  $47,90 \pm 5,38$  пА/пФ ( $n = 6$ ). ДОТК в концентрации  $10^{-6}$  М вызывал увеличение тока до  $57,82 \pm 4,51$  пА/пФ ( $n = 5$ ,  $P < 0,05$ ) и до  $117,33 \pm 5,75$  пА/пФ ( $n = 6$ ,  $P < 0,05$ ) после аппликации препарата в концентрации  $10^{-5}$  М. В ГМК диабетических животных зарегистрировано значительное снижение амплитуды выходящего  $K^{+}$ -тока до  $22,1 \pm 1,61$  пА/пФ ( $n = 8$ ;  $P < 0,05$ ). Аппликация препарата в концентрациях  $10^{-6}$  М и  $10^{-5}$  М вызвала увеличение плотности  $K^{+}$ -тока до  $27,20 \pm 0,99$  пА/пФ ( $n = 6$ ;  $P < 0,05$ ) и

---

---

29,10 ± 0,78 пА/пФ (n = 7; P < 0,05) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о способности ДОТК увеличивать выходящий калиевый ток в ГМК аорты контрольных крыс и крыс с сахарным диабетом, нормализуя тем самым их вазодилаторный потенциал.

*Ключевые слова:* сосудистые осложнения сахарного диабета, гладкомышечные клетки, K<sup>+</sup>-каналы, желчные кислоты

**К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, В. І. Поляков, О. І. Жуковський,  
В. В. Бондарь, А. І. Соловійов**

### **Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти на вихідні калієві струми в міоцитах аорти щурів із експериментальним діабетом**

Метою дослідження є вивчення впливу діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти (ДОТК), діючої речовини препарату Оріон, на сумарний вихідний калієвий струм у гладеньком'язових клітинах (ГМК) аорти здорових щурів і тварин із експериментальним діабетом. Дослідження було проведено із застосуванням методики індукції діабету, методики виділення ГМК аорти, а також методики patch-clamp. Сумарний вихідний K<sup>+</sup>-струм у ГМК аорти здорових щурів за максимальної рівня деполаризації 70 мВ складав 47,90 ± 5,38 пА/пФ (n = 6). ДОТК викликав зростання щільності струму до 57,82 ± 4,51 пА/пФ (n = 5, P < 0,05) та до 117,33 ± 5,75 пА/пФ (n = 6, P < 0,05), після аплікації 10<sup>-6</sup> М та 10<sup>-5</sup> М відповідно. ГМК діабетичних тварин демонстрували зниження вихідного K<sup>+</sup>-струму з щільністю 22,10 ± 1,61 пА/пФ (n = 8; P < 0,05) порівняно з контролем. Аплікація препарату в концентраціях 10<sup>-6</sup> М та 10<sup>-5</sup> М викликала зростання щільності сумарного вихідного K<sup>+</sup>-струму до 27,20 ± 0,99 пА/пФ (n = 6; P < 0,05) та до 29,10 ± 0,78 пА/пФ (n = 7; P < 0,05) відповідно. Отримані дані свідчать про здатність ДОТК збільшувати вихідний калієвий струм у ГМК аорти контрольних щурів та щурів із цукровим діабетом, призводячи таким чином до нормалізації вазодилаторного потенціалу.

*Ключові слова:* судинні ускладнення цукрового діабету, гладеньком'язові клітини, K<sup>+</sup>-каналы, жовчні кислоти

**K. I. Klymenko, T. V. Novokhatska, V. I. Polyakov, O. I. Zhukovsky,  
V. V. Bondar, A. I. Soloviev**

### **The effect of taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol on outward potassium currents in aortic myocytes of rats with experimental diabetes**

The aim of this study was to evaluate the effect of pharmacological drug taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol (TADO) on integral outward K<sup>+</sup> currents in rat smooth muscle cells (SMCs) obtained from the controls and rats with experimental diabetes. Experimental design of the study comprised induction of diabetes, isolation of rat thoracic aorta SMCs and patch-clamp technique. Diabetes was induced in male Wistar rats (180–200 g) by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg). Single smooth muscle cells were isolated by collagenase digestion from rat thoracic aorta obtained from all groups of animals. To study whole-cell integral outward potassium currents (voltage clamp mode) the whole-cell patch clamp technique in the amphotericin B perforated-patch configuration was used.

Integral outward K<sup>+</sup> current in control rat SMCs was 47,90 ± 5,38 pA/pF (n = 6). TADO showed significant increase in this current with peak density 57,82 ± 4,51 pA/pF (n = 5, P < 0,05) and 117,33 ± 5,75 pA/pF (n = 6, P < 0,05), after application of 10<sup>-6</sup> M and 10<sup>-5</sup> M respectively. Whole-cell patch-clamp technique showed a reduction of integral K<sup>+</sup> outward current in SMCs of diabetic rats (22,10 ± 1,61 pA/pF (n = 8; P < 0,05)) versus controls. Application of TADO led to increase of current density to 27,20 ± 0,99 pA/pF (n = 6; P < 0,05) and 29,10 ± 0,78 pA/pF (n = 7; P < 0,05) after 10<sup>-6</sup> M and 10<sup>-5</sup> M respectively. In conclusion, taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol possess the ability to increase integral K<sup>+</sup> outward current in rats with STZ-induced diabetes and controls.

*Key words:* diabetic vascular complications, smooth muscle cells, K<sup>+</sup>-channels, bile acids

Поступила: 11.02.2014 г.

---

**Контактное лицо:** Клименко Екатерина Игоревна, младший научный сотрудник, отдел экспериментальной терапии, ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», ул. Э. Потьме, д. 14, г. Киев, 03680. Тел.: +38 0 44 456 02 88.



М. А. Мохорт<sup>1</sup>, І. В. Геращенко<sup>1</sup>, О. А. Шкрабак<sup>2</sup>,  
Ю. Ю. Мазур<sup>2</sup>, Т. О. Векліч<sup>2</sup>

## Похідні імідазо [1,2-а]азепінію як модифікатори скоротливої активності міометрія

<sup>1</sup>ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

<sup>2</sup>Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

**Ключові слова:** похідні імідазо[1,2-а]азепінію,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРаза,  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРаза,  $Mg^{2+}$ -АТРаза,  $Ca^{2+}$ -АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, окситоцин

Важлива роль у забезпеченні скорочення гладеньких м'язів належить АТР-гідролазним ензиматичним системам [2, 3]. У плазматичній мембрані, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься ряд  $Mg^{2+}$ -залежних АТРаз, що забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: транспортна  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРаза, яка забезпечує активний  $Mg^{2+}$ , АТР-залежний транспорт  $Ca^{2+}$  у позаклітинне середовище; убаїнчутлива  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРаза, що здійснює енергозалежне протилежно спрямоване перенесення іонів  $Na^+$  та  $K^+$  із клітини та в клітину відповідно; убаїнрезистентна, так звана «базальна»,  $Mg^{2+}$ -АТРаза, котра ймовірно бере участь у регуляції концентрації протонів у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах;  $Ca^{2+}$ -АТРаза, яка проявляється за наявності в середовищі інкубації  $Ca^{2+}$  і АТР у мілімолярних концентраціях, але за відсутності іонів  $Mg^{2+}$  [4].

Порушення скоротливої функції гладенького м'яза матки (міометрій) у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викиднів, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки [5]. Часто такі патології супроводжуються порушеннями функціонування мембранозв'язаних систем переносу катіонів та відповідно скоротливої активності гладенького м'яза матки. Тому перспективним є пошук фармакологічних сполук, здат-

них модифікувати скоротливу функцію міометрія у випадку зазначених патологічних станів.

У цьому аспекті, зокрема, представляють інтерес похідні імідазо[1,2-а]азепінію. У ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» було проведено скринінг на спазмолітичну, а саме токолітичну активність похідних імідазо[1,2-а]азепінію [1].

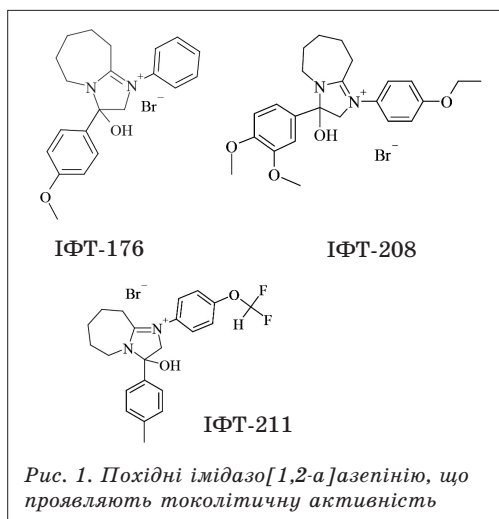
Досліджені сполуки були синтезовані у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» під керівництвом доктора фарм. наук А. М. Демченка.

*Мета дослідження* – порівняти вплив деяких похідних імідазо[1,2-а]азепінію на скоротливу активність матки та на активність чотирьох функціонально різних АТРаз гладенького м'яза матки: транспортну  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРаза, убаїнчутливу  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРаза, «базальну»  $Mg^{2+}$ -АТРаза та  $Mg^{2+}$ -незалежну  $Ca^{2+}$ -АТРаза плазматичних мембран.

**Матеріали та методи.** А. Структура ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211. Структурні формули похідних імідазо[1,2-а]азепінію представлено на рисунку 1.

*Б. Фізіологічні дослідження.* Фізіологічні дослідження були проведені у відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Дослідження токолітичної активності сполук ІФТ-176, ІФТ-208, ІФТ-211 були виконані на 9 лабораторних щурах, розведення ПП «Біомодельсервіс». Поздовжні смужки міометрія вирізали із рогів матки щурів після декапітації під легким ефірним наркозом відповідно до міжнародних рекомендацій (егічного кодексу) з проведення



медико-біологічних досліджень з використанням тварин (1985 р.).

Ізольовані препарати міометрія розміщували в проточній камері (швидкість потоку 0,7 мл/хв), що наповнювали розчином Кребса наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 132; KCl – 4,7;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,4;  $\text{NaHCO}_3$  – 16,3;  $\text{CaCl}_2$  – 2,5;  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,05; глюкоза – 6,5. Аерацію розчину здійснювали карбогеном (газова суміш 5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$ ).

Тонічне напруження викликали окситоцином (0,1 МО/мл), який додавали до розчину Кребса. Досліджувані сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді з подальшим розведенням розчином Кребса до концентрацій 0,1; 1; 10 мкмоль/л. Аплікацію досліджуваних сполук здійснювали протягом 15 хв у порядку наростання концентрацій.

Силу скорочувальних реакцій вимірювали в ізометричному режимі за допомогою емнісних тензометричних датчиків (FTK-0,1). Запис скорочень здійснювали на персональному комп'ютері із застосуванням програми DataTrax2 за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments).

На механограмах скорочення-розслаблення міометрія вимірювали горизонтальні та вертикальні параметри за схемою, описаною раніше [1]. Серед горизонтальних параметрів вимірювали тонус (силовий параметр, який вимірювали в грамах) та часові параме-

три, такі як час фази скорочення та час фази розслаблення, інтервал між скороченнями. Усі часові параметри вимірювали в секундах. Вимірювали також один вертикальний параметр – амплітуду скорочення, яку виражали в грамах.

*В. Біохімічні дослідження.* Біохімічні дослідження були проведені у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України (зав. відділом – чл.-кор. НАН України проф. С. О. Костерін).

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин матки виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [6].

Уміст білка в мембранній фракції визначали методом М. Bredford із використанням реакції з реактивом Кумасі – G250 [7].

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за температури 37 °С у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 3 АТФ, 3  $\text{MgCl}_2$ , 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 HEPES-tris-буфер (pH 7,4), 1  $\text{NaN}_3$  (інгібітор АТФ-ази мітохондрій [8]), 1 убаїн (селективний інгібітор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТрази [9]), 0,1 мкмоль/л тапсигаргін (селективний інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТрази ендосарко)-плазматичного ретикулуму [8]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [18]). Час інкубації – 5 хв.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації 0,95 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ . Розрахунки, що були виконані із використанням комп'ютерної програми «MAXCHEL», свідчать про те, що за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації концентрація вільних йонів Ca (суто  $\text{Ca}^{2+}$ ) становила 1 мкмоль/л.

«Базальну»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за температури 37 °С у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 1 АТФ, 3  $\text{MgCl}_2$ , 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 HEPES-tris-буфер (pH 7,4), 1  $\text{NaN}_3$ , 1 убаїн, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін і 0,1% дигітонін. Час інкубації – 4 хв.

«Базальну»  $Mg^{2+}$ -АТРазну активність розраховували як різницю між кількістю  $P_i$ , що утворився в середовищі інкубації в присутності та відсутності фракції плазматичної мембрани, з урахуванням поправки на вміст ендogenous  $P_i$  в мембранному препараті.

$Na^+$ ,  $K^+$ -АТРазну активність визначали в тому самому середовищі та розраховували за різницею між величинами АТР-азних активностей за відсутності та в присутності 1 ммоль/л убаїну,  $Ca^{2+}$ -АТРазну активність плазматичних мембран клітин міометрія визначали за температури 37 °C у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 3 АТР, 150 КСl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-tris-буфер (рН 7,4), 1  $NaN_3$ , 1 убаїн, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Час інкубації – 5 хв.  $Ca^{2+}$ -АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації 3 ммоль/л  $CaCl_2$ .

У всіх експериментах фіксували кількість білка мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп»-розчину наступного складу: 1,5 моль/л натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, рН 4,3 (за температури 8 °C). Кількість продукту реакції  $P_i$  визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach.

У дослідях з вивчення впливу ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРазну активність використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту розчинів ІФТ-

176, ІФТ-208 та ІФТ-211. У дослідях використовували концентрований (20 ммоль/л) розчин вказаних речовин в ДМСО, який далі розводили водою до необхідної концентрації.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням стандартних методів з використанням t-критерію Стьюдента. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Excel.

У роботі застосовували наступні реактиви: АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін («Sigma», США), трис-гідроксиметил-амінометан («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merck», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва класифікації «чда» та «хч».

**Результати та їх обговорення.** Гладенько-м'язовий орган матка має фазово-циклічний характер скорочень та розслаблень (рис. 2). Для встановлення наявності токолітичної активності нами було обрано 5 параметрів, серед яких горизонтальні параметри – тонус, час фази скорочення, час фази розслаблення, інтервал між циклами скорочення, та один вертикальний – амплітуда скорочення. Зміна досліджуваних параметрів представлена в таблиці.

Для структури з одним оксиметильним радикалом (ІФТ-176) при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л не було відмічено статистично вірогідних змін амплітуди фазних скорочень міометрія. При введенні до відповідної структури ще двох оксиметильних радикалів (ІФТ-208) амплітуда, хоча й мала тенденцію до зменшення, але не зазнавала статистично достовірних змін. При заміні радикалів у двох

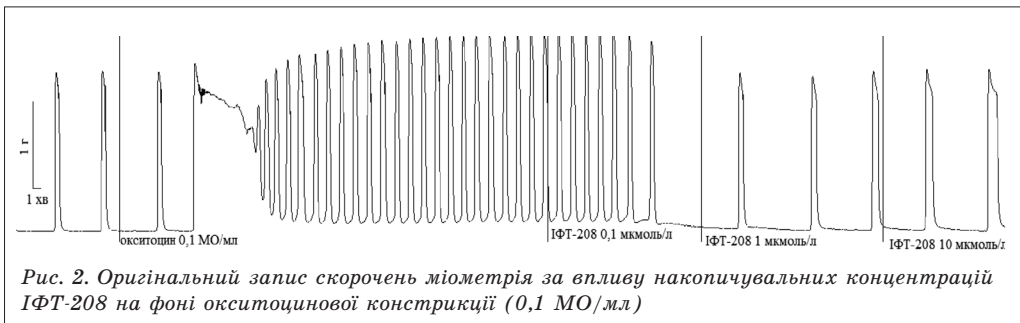


Рис. 2. Оригінальний запис скорочень міометрія за впливу накопичувальних концентрацій ІФТ-208 на фоні окситоцинової констрикції (0,1 МО/мл)

Параметри токолітичної активності досліджуваних сполук,  $n = 6$ 

Шифр сполуки	Накопичувальні концентрації досліджуваних сполук та вихідні дані на окситоцин	Параметри токолітичної активності				
		Амплітуда скорочення, г	Час фази скорочення, с	Час фази розслаблення, с	Інтервал між циклами скорочення, с	Тонус, г
ІФТ-208	Окситоцин 0,1 МО/мл	1,000 ± 0,150	20,20 ± 1,52	23,63 ± 1,57	11,69 ± 0,95	0,236 ± 0,009
	0,1 мкмоль/л	0,800 ± 0,210	17,49 ± 1,41	20,80 ± 0,91	26,22 ± 15,11	0,216 ± 0,006
	1 мкмоль/л	0,700 ± 0,200	14,12 ± 1,00 <sup>§</sup>	29,32 ± 3,60	83,20 ± 20,82 <sup>§</sup>	0,171 ± 0,013 <sup>#</sup>
	10 мкмоль/л	0,800 ± 0,360	15,45 ± 3,40	37,85 ± 2,74 <sup>#</sup>	112,20 ± 27,93 <sup>§</sup>	0,156 ± 0,024 <sup>§</sup>
ІФТ-176	Окситоцин 0,1 МО/мл	0,424 ± 0,036	15,79 ± 0,69	22,44 ± 0,81	5,83 ± 0,66	0,540 ± 0,025
	0,1 мкмоль/л	0,467 ± 0,045	18,17 ± 0,99 <sup>Δ</sup>	22,93 ± 0,95	8,57 ± 0,95 <sup>Δ</sup>	0,366 ± 0,034 <sup>#</sup>
	1 мкмоль/л	0,460 ± 0,046	17,19 ± 0,98	29,10 ± 1,41 <sup>#</sup>	8,54 ± 0,75 <sup>*</sup>	0,332 ± 0,032 <sup>#</sup>
	10 мкмоль/л	0,424 ± 0,051	18,24 ± 1,06 <sup>Δ</sup>	35,72 ± 2,83 <sup>#</sup>	8,18 ± 0,66 <sup>*</sup>	0,254 ± 0,020 <sup>@</sup>
ІФТ-211	Окситоцин 0,1 МО/мл	0,220 ± 0,014	13,60 ± 0,42	18,90 ± 0,42	5,10 ± 0,39	0,400 ± 0,050
	0,1 мкмоль/л	0,190 ± 0,011	16,10 ± 0,68 <sup>*</sup>	18,20 ± 0,43	4,20 ± 1,62	0,300 ± 0,040
	1 мкмоль/л	0,130 ± 0,013 <sup>#</sup>	17,40 ± 0,76 <sup>#</sup>	18,70 ± 0,41	4,50 ± 0,60	0,300 ± 0,050
	10 мкмоль/л	0,110 ± 0,010 <sup>@</sup>	14,70 ± 1,14	13,50 ± 0,43 <sup>@</sup>	5,00 ± 0,42	0,300 ± 0,040

Примітка. <sup>@</sup> $P \leq 0,001$  відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); <sup>#</sup> $P \leq 0,01$  відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); <sup>§</sup> $P \leq 0,02$  відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); <sup>\*</sup> $P \leq 0,05$  відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); <sup>Δ</sup> $P \leq 0,1$  відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл);  $n$  – кількість ізольованих поздовжніх смужок міометрія

бензольних кільцях (пара положення) на оксидиформетильний та метильний (ІФТ-211) максимальне зниження амплітуди сягало  $50,000 \pm 0,024$  % ( $p \leq 0,001$ ;  $n = 6$ ) за концентрації 10 мкмоль/л. Це може свідчити про більшу спорідненість до окситоцинових рецепторів саме структури ІФТ-211 порівняно зі структурами ІФТ-176 та ІФТ-208.

Уведення до структури додаткових оксиметильних радикалів викликало протилежний ефект за показником часу фази скорочення. Так, наприклад,

для структури ІФТ-176 (-O-CH<sub>3</sub>) відмічено тенденцію до подовження часу фази скорочення зі збільшенням накопичувальних концентрацій, у той час як для сполуки ІФТ-208 зафіксовано, навпаки, тенденцію до зменшення цього часового параметра за аналогічних умов.

ІФТ-211 за умов накопичувальних концентрацій не впливав статистично достовірно на час фази скорочення, а час фази розслаблення скорочував на  $28,00 \pm 0,87$  % ( $p \leq 0,001$ ;  $n = 6$ ) при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л.

Аналогічне подовження часу фази розслаблення було характерне для сполук з оксиметильними радикалами ІФТ-176 та ІФТ-208 при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л, на  $59,00 \pm 3,64\%$  ( $p \leq 0,01$ ;  $n = 6$ ) та  $60 \pm 4,31\%$  ( $p \leq 0,01$ ;  $n = 6$ ) відповідно.

ІФТ-211 не змінював не тільки вертикальний параметр – амплітуду, але й не було відмічено статистично достовірної різниці для інтервалів між фазами скорочення, тоді як для структур ІФТ-176 та ІФТ-208 відмічено значний вплив на цей параметр. Наприклад, для структури з одним оксиметильним радикалом (ІФТ-176) характерне збільшення інтервалу при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л між фазами скорочення на  $40,00 \pm 1,32\%$  ( $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$ ), а при включенні до імідазоазепінового ядра ще двох оксиметильних радикалів відбувається збільшення зазначеного часового параметра більше ніж у 10 разів ( $p \leq 0,02$ ;  $n = 6$ ) за накопичувальної концентрації 10 мкмоль/л (див. табл.).

За результатами скринінгових досліджень токолітичної активності похідних імідазо[1,2-а]азепінію нами було встановлено залежність між збільшенням часових параметрів фазових скорочень міометрія відносно контролю та наявністю в досліджених структурах оксиметильних і оксиетильних радикалів. Було припущено, що значне збільшення часових параметрів залежить від наявності в структурі похідних імідазо[1,2-а]азепінію атомів кисню та нітрогену, які здатні утворювати водневі зв'язки.

Аналогічне збільшення при введенні в структуру більшої кількості оксиметильних радикалів відмічено й для горизонтального параметра – тонусу. Сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 знижували тонуус поздовжніх смужок міометрія на фоні окситоцинової констрикції на  $47,000 \pm 0,027\%$  ( $p \leq 0,001$ ;  $n = 6$ ) та  $66,000 \pm 0,033\%$  ( $p \leq 0,02$ ;  $n = 6$ ) відповідно (за накопичувальної концентрації 10 мкмоль/л). Тенденція до зниження тонуусу під впливом сполуки ІФТ-211 не була статистично значимою.

Ураховуючи, що в структурі багатьох лікарських засобів, які дотепер

використовуються як токолітики, присутній оксиметильний радикал (папаверин – 4 радикали, індометацин – 1 радикал) та оксиетильний (дротаверин – 4 радикали, атозибан – 1 радикал), ми вважаємо за доцільне використання цих радикалів в дизайні нових структур для створення нових ефективних і безпечних для матері й плода токолітичних лікарських засобів.

Однак наявність токолітичних властивостей у досліджених сполук не знімає численних питань стосовно молекулярних та клітинних механізмів дії на скоротливу активність матки.

Опираючись на відомий факт про вплив окситоцину на клітини міометрія шляхом часткового інгібування активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи,  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани [19] та активації  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи саркоплазматичного ретикулуму міометрія [20], ми зробили припущення про те, що досліджені сполуки можуть впливати на зазначені вище  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи.

Добре відомо, що багато процесів життєдіяльності клітини контролюються за допомогою іонів  $\text{Ca}$ , і саме тому в клітині у стані спокою концентрація цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$  є низькою, на відміну від концентрацій позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ . Дуже важливу роль у процесі підтримання низьких концентрацій клітинного  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичних мембран – іонна помпа, яка здатна переносити  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичну мембрану, проти 10 000-кратного градієнта концентрації [11]. У незбудженій клітині  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа компенсує пасивний потік кальцію, який спрямований до міоцитів, а також видаляє з клітин  $\text{Ca}^{2+}$  після м'язового скорочення, підтримуючи фізіологічну концентрацію іонів  $\text{Ca}$  в цитоплазмі клітини [3]. У наших дослідках середнє значення питомої активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани становить  $3,4 \pm 0,3$  мкмоль Рі/мг білка за 1 год ( $p \leq 0,05$ ;  $n = 7$ ).

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза – інтегральний транспортний білок плазматичної мембрани клітин більшості тканин тварин [12].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза плазматичної мембрани відповідає за встановлення і збережен-

ня електрохімічного градієнта іонів Na та K в клітинах. Цей фермент транспортує Na<sup>+</sup> і K<sup>+</sup>, використовуючи енергію гідролізу АТР. При гідролізі 1 молекули АТР відбувається електрогенний обмін 3Na<sup>+</sup> з внутрішньоклітинного простору на 2 K<sup>+</sup> з позаклітинного простору [13, 14]. У наших дослідках середнє значення питомої ферментатичної активності Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазі складає 10,2 ± 0,7 мкмоль Рі/мг білка за 1 год (M ± m; p ≤ 0,05; n = 7).

«Базальна» Mg<sup>2+</sup>-АТРаза є маркерним ферментом плазматичних мембран гладеньких м'язів, що має досить високу ферментатичну активність. Не виключають, що в гладеньком'язових клітинах матки Mg<sup>2+</sup>-АТРаза виконує роль своєрідного рН-чутливого ферментатичного сенсора і є фактором контролю концентрації протонів Н<sup>+</sup> у міоплазмі [15, 16]. У наших дослідках середнє значення питомої ферментатичної активності «базальної» Mg<sup>2+</sup>-АТРазі складає 18,1 ± 1,2 мкмоль Рі/мг білка за 1 год відповідно (M ± m; p ≤ 0,05; n = 7).

У плазматичній мембрані міоцитів матки виявлено Са<sup>2+</sup>-АТРаза, яка є відмінною від Са<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРазі. Її активність проявляється за наявності в середовищі інкубації Са<sup>2+</sup> і АТР у мілімолярних концентраціях на тлі відсутності іонів Mg<sup>2+</sup> [17, 18]. Са<sup>2+</sup>-АТРаза є низькоафінною до активуючого катіона – константа активації іонами Са (K<sub>Са</sub>) дорівнює 1 ммоль/л [18]. У наших

дослідах середнє значення питомої ферментатичної активності Са<sup>2+</sup>-АТРазі складає 12,7 ± 2,0 мкмоль Рі/мг білка за 1 год (M ± m; p ≤ 0,05; n = 7).

При дослідженні впливу похідних імідазо[1,2-а]зепінію ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на чотири АТР-гідролізи плазматичної мембрани – транспортну Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРаза, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТРаза, Mg<sup>2+</sup>-АТРаза та Са<sup>2+</sup>-АТРаза, було встановлено, що ці сполуки в концентрації 100 мкмоль/л по-різному впливають на активність вказаних АТРАЗ (рис. 3).

ІФТ-176 та ІФТ-208 виявилися ефективними активаторами Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРазі, у їхній присутності ферментатична активність зростає на 53,6 ± 0,7 % і 71,1 ± 3,62 % відповідно порівняно з контролем (p ≤ 0,05; n = 5). ІФТ-211 майже не впливає на Са<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗну активність (109,0 ± 2,8 % відносно контролю).

Подібним чином досліджувані сполуки (ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211) впливають і на активність Mg<sup>2+</sup>-АТРазі плазматичної мембрани: 122,1 ± 01,3 %; 132,0 ± 0,8 % та 103,3 ± 0,5 % відповідно порівняно з контролем (p ≤ 0,05; n = 5).

Що ж стосується активності Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазі, то сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 виявили інгібуючий вплив на її активність: 67,7 ± 0,8 % та 57,6 ± 0,6 % відповідно порівняно з контролем (p ≤ 0,05; n = 5). Сполука ІФТ-211 не впливала на активність даної АТРазі (96,3 ± 1,9 %).

Сполуки ІФТ-208 та ІФТ-211 пригнічують активність Са<sup>2+</sup>-АТРазі до 88,1 ± 1,4 % та 68,7 ± 1,1 % відповідно порівняно з контролем (p ≤ 0,05; n = 5). Сполука ІФТ-176 майже не впливає на активність даної АТРазі (106,9 ± 1,9 %).

Інгібування скорочень, викликаних окситоцином, у дослідженнях *in vitro* на ізольованих смужках рогів матки щурів можна пов'язати з активацією Са<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРазі, що, у свою чергу, блокує один із етапів біохімічного механізму впливу окситоцину на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз у міометрії.

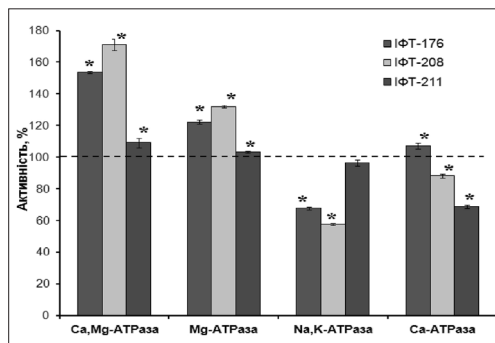


Рис. 3. Вплив ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на АТР-гідролізні активності в плазматичній мембрані клітин міометрії (n = 5)

Примітка. За 100 % прийнято значення питомої ферментатичної активності в контролі (за відсутності ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 у середовищі інкубації); \*P ≤ 0,05 відносно контролю.

## Висновки

1. Похідні імідазо[1,2-а]азепінію, а саме ІФТ-211, ІФТ-208, ІФТ-176, проявляють токолітичні властивості. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л сполука ІФТ-208 ефективно збільшувала інтервал між скороченнями, ІФТ-176 знижувала тонус ізольованих смужок міометрія, ІФТ-211 удвічі зменшувала амплітуду скорочення.

2. При дослідженні впливу похідних імідазо[1,2-а]азепінію на активність АТРаза у фракції плазматичних мембран клітин міометрія (транспортну  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза;  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза) було встановлено, що сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 активують  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза й інгібують  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, а сполука ІФТ-211 інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза.

1. Мохорт М. А. токолітичної активності похідних імідазо[1,2-а]азепінію / Мохорт М. А., Герашенко І. В. // Досягнення біології та медицини. – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 6–11.
2. Бабич Л. Г. Свойства кальциевого насоса эндоплазматического ретикулаума гладкомышечных клеток / Бабич Л. Г. // Укр. біохім. журн. – 1999. – Т. 71, № 2. – С. 20–27.
3. Kosterin S. O. Kinetics and energetics of  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the plasma membrane of smooth muscle cells / Kosterin S. O. // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2003. – Т. 35, № 3/4. – С. 215–228.
4. Кушкевич М. В. Физиологический прион и активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза плазматической мембраны клеток продолговатого мозга крыс разного возраста / Кушкевич М. В., Влизло В. В., Мартин Ю. В. // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 2. – С. 52–58.
5. Uterine contractility / Ed. by R.E. Garfield. -Serano Symposia, VSA, Norwill, Massachusets. – 1990. – 388 p.
6. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свиньи / Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепа А.А. [и др.] // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 50–56.
7. Functionally separate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in smooth muscle / Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 39. – P. 36411–36418.
8. Mechanisms of ouabain toxicity / Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. [et al.] // FASEB J. – 2003. – V. 17, № 12. – P. 1700–1702.
9. Векліч Т. О. Катіонна специфічність системи акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях клітин міометрія / Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 42–48.
10. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – V. 28, № 1–3. – P. 436–445.
11. Пестов Н. Б. Регуляция  $\text{Ca}^{2+}$  АТРаза плазматических мембран / Пестов Н. Б., Дмитриев Р. И., Шахпаронов М. И. // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 99–138.
12. Carnosine prevents necrotic and apoptotic death of rat thymocytes via ouabain sensitive  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$ -АТРаза / Smolyaninova L. V., Dergalev A. A., Kulebyakin K. Y. [et al.] // Cell Biochem Funct. – 2013. – V. 31, № 1. – P. 30–35.
13. Karpova L. V., Akkuratov E. E., Brodskaja O. M., Boldyrev A. A. // Biofizika. – 2010. – V. 55, № 6. – P. 1022–1029.
14. S-glutathionylation of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза catalytic alpha subunit is a determinant of the enzyme redox-sensitivity / Petrushanko I. Y., Yakushev S., Mitkevich V. A., Kamanina Y. V. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, № 38. – P. 195–205.
15. Данилович Г. В. Ідентифікація та характеристика «базальної»  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТРаза-гідролазної ферментативної активності у фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин / Данилович Г. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 6. – С. 30–40.
16. Кінетичне тлумачення рН-залежності ферментативної активності «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза сарколеми гладенького м'яза / Костерін С. О., Векліч Т. О., Прилуцький Ю. І., Бориско П. О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 6. – С. 37–45.
17. Михайлова М. В. Значение приспособительных модификаций в эволюции / Михайлова М. В., Гонтарева Н. Б., Нестеров В. П. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1992. – Т. 28, № 4. – С. 447–453.
18. Magocsi M. T.  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzyme / Magocsi M., Penniston J. T. // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – V. 1070, № 1. – P. 163–172.
19. Шинлова О. П. Влияние окситоцина на кальциевый насос сарколеммы миометрия / Шинлова О. П., Фомин В. П., Костерин С. // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59, № 2. – С. 75–79.
20.  $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$  в эндоплазматическом ретикулуме / Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Ровенец Н. А., Костерин С. А. // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, № 5. – С. 25–34.

---

---

**Н. А. Мохорт, И. В. Геращенко, А. А. Шкрабак, Ю. Ю. Мазур, Т. А. Веклич**  
**Производные имидазо[1,2-а]азепиния как модификаторы сократительной активности миомерии**

Цель работы – провести сравнительное исследование влияния некоторых производных имидазо[1,2-а]азепиния на сократительную активность матки и активность АТФаз плазматических мембран клеток миомерии. По результатам исследования токолитической активности среди производных имидазо[1,2-а]азепиния была установлена зависимость между увеличением временных параметров сокращения и тонусом, а также наличием в исследованных структурах оксиметильных и оксиэтильных радикалов. Было установлено, что значительное увеличение временных параметров фазных сокращений миомерии зависит от наличия в структуре производных имидазо[1,2-а]азепиния атомов кислорода и азота, которые способны образовывать водородные связи. Исследование действия производных имидазо[1,2-а]азепиния на активность АТФаз плазматической мембраны миомерии продемонстрировало, что соединения ИФТ-176, ИФТ-208 активируют  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазу и ингибируют  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФазу. Поэтому ингибирование сокращений мышечных полосок рогов матки, вызванных окситоцином, можно связать с активацией  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы, что, в свою очередь, блокирует один из этапов биохимического механизма влияния окситоцина на внутриклеточный кальциевый гомеостаз в миомерии. В структуре многих лекарственных препаратов, которые используются как токолитики на сегодняшний день, присутствует оксиметильный и оксиэтильный радикалы. Мы считаем целесообразным использование этих радикалов в дизайне новых структур при создании новых эффективных и безопасных лекарственных средств, способных модулировать сократительную функцию матки при определенных патологиях.

*Ключевые слова:* производные имидазо[1,2-а]азепиния,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФаза,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФаза,  $Mg^{2+}$ -АТФаза,  $Ca^{2+}$ -АТФаза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миомерий, окситоцин

**N. A. Mochort, I. V. Gerashchenko, A. A. Shkrabak, Yu. Yu. Mazur, T. O. Veklich**  
**The derivatives of imidazo[1,2-a]azepine as modifiers of myometrium contractile activity**

Preterm birth is a major contributor to perinatal mortality and morbidity worldwide. Tocolytic agents are drugs used to inhibit uterine contractions and to prevention preterm delivery. In this study we investigated the effects of the derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium on oxytocin-induced contractions in the rat uterus in vitro and ATPases activity in myometrium cell's plasma membrane. Contractile activity was studied isometrically and analysis of contractions was performed by the calculation of the basal tone, amplitude, interval between cycles of reduction, the phase of contraction and relaxation. Spontaneously active myometrium was activated with oxytocin which was added to the tissue bath solution. After oxytocin administration the derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium (0, 1; 1; 10  $\mu$ M) were added to the bath solution too. We investigated the activity of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -ATPase,  $Mg^{2+}$ -ATPase,  $Ca^{2+}$ -ATPase on the myometrial cell plasma membrane suspension. Student's t-test was used for statistical analysis. It has been found out that observed increasing in time parameters and tone depend on oxymethyl and oxyethyl residues in structures studied. It was suggested that remarkable increasing in time parameters depends on presence of oxygen and nitrogen atoms which can form hydrogen bonds with hydrogen in chemical structures of derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium. The date obtained shown that derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium IFT-176, IFT-208 activate  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase and inhibit  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -ATPase. The inhibition uterine horn's muscle stripes contractions caused by oxytocine may be due to  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activation. It is blocks one biochemical pathway oxytocine influence on calcium homeostasis of myometrium.

*Key words:* imidazo[1,2-a]azepinium derivatives,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -ATPase,  $Mg^{2+}$ -ATPase,  $Ca^{2+}$ -ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, oxytocine

---

Надійшла: 10.02.2014 р.

**Контактна особа:** Геращенко Інна Василівна, аспірант, відділ фармакології серцево-судинних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 82 90. Електронна пошта: InnaGer@bk.ru



О. О. Нагорна<sup>1</sup>, Н. О. Горчакова<sup>1</sup>, І. С. Чекман<sup>1</sup>,  
І. Ф. Бєленічев<sup>2</sup>, Т. С. Брюзгіна<sup>1</sup>

## Вплив сумісного застосування квінаприлу з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів із артеріальною гіпертензією

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

<sup>2</sup>Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя

*Ключові слова: квінаприл, ангіолін,  
артеріальна гіпертензія, жирні кислоти*

Артеріальна гіпертензія – одне з найрозповсюдженіших серцево-судинних захворювань [1]. Порівняльні дані щодо поширеності артеріальної гіпертензії (АГ), тенденції змін артеріального тиску (АТ) в європейських країнах дещо різняться. Поширеність АГ вважається близькою до 30–45 % від загальної чисельності населення, частота захворювань з віком збільшується [2]. Лікування АГ є важливою медичною проблемою. Це зумовлено перед усім тим, що підвищення артеріального тиску пов'язано зі зростанням серцево-судинних захворювань та збільшенням смертності. Сьогодні є необхідність ефективного та постійного контролю АТ. У повсякденній практиці терапевт та лікар-кардіолог регулярно здійснюють оптимальний підбір препаратів конкретному хворому, який має, крім АГ, інші захворювання [3]. Хворі з АГ потребують постійного лікування з індивідуальним добром препаратів. Для призначення антигіпертензивного препарату необхідно враховувати низку факторів, які можуть надалі вплинути на ефективність терапії (зокрема, наявність супутніх патологій, факторів ризику ураження органів-мішеней та ін.). Однією з груп лікарських засобів першої лінії, що широко ввійшли в клінічну практику, є інгібітори АПФ (іАПФ), які застосовують для лікування та профілактики АГ, серцевої недостатності, ішемічної хвороби серця та ряду супутніх захворювань (цукрового діабету, нефропатії тощо). Препарати добре контролюють добовий тиск, попереджають функціональні та біохімічні зміни в органах-мішенях [4].

У зв'язку з тим, що патогенез артеріальної гіпертензії пов'язаний з розвитком оксидативного стресу, порушенням акумуляції та розподілу жирних кислот в організмі [5, 6] вважають, що в схемі лікування АГ доцільно додавати метаболічні препарати з антиоксидантною дією, які відновлюють біохімічні показники обміну речовин в органах-мішенях [7].

Одним з найактивніших іАПФ є квінаприл, що має високу спорідненість до тканинного АПФ, поліпшує ендотелійзалежну вазодилатацію, має благодійний вплив на серцевий ритм [8, 9]. Новою біологічно активною сполукою з антиоксидантною дією, що також має ендотелійпротекторну, кардіопротекторну, протиішемічну активність, є ангіолін, субстанція якого попередньо мала назву «Лізиній» [10].

Таким чином, зважаючи на можливу регуляторну роль ангіоліну як кардіопротектора, доцільним є вивчення сумісного впливу ангіоліну з квінаприлом на одну з ланок патогенезу АГ.

*Мета дослідження* – встановити вплив сумісного застосування квінаприлу з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів з артеріальною гіпертензією.

*Матеріали та методи.* Експерименти проведено на 35 щурах обох статей, масою 180–220 г, серед яких 28 щурів лінії SHR (spontaneously hypertensive rats – спонтанно гіпертензивні щури), артеріальна гіпертензія яких за патогенезом наближається до артеріальної гіпертензії в людей, та 7 нормотензивних щурів лінії WKR. Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до Методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України. Визначення рівня жирних

кислот у плазмі крові щурів проводили за допомогою методу газорідинної хроматографії [11], газохроматографічний аналіз жирних кислот здійснювали на газовому хроматографії «Цвет» – 500 (Росія) в ізотермічному режимі з полум'янізаційним детектором. Кількісну оцінку спектра жирних кислот проводили за допомогою методу нормування площин, визначали їхній уміст у відсотках, при цьому за 100 % було прийнято суму насичених жирних кислот. У спектрі жирних кислот ідентифікували 5 насичених кислот (міристинова С14:0, пентодеканова С15:0, пальмітинова С16:0, маргарінова С17:0, стеаринова С18:0) та 4 ненасичених (олеїнова С18:1, лінолева С18:2, ліноленова С18:3, арахідонова С20:4).

Щурам протягом 90 днів внутрішньоплунково через зонд вводили таблетовану масу квінаприлу (Акупро, «Пфайзер», США) у дозі 10 мг/кг [12] та таблетовану масу ангіоліну (НПО «Фарматрон», Україна) у дозі 10 мг/кг [10].

Експерименти проводили на 5 групах тварин: 1 група – нормотензивні щури; 2 група – щури з гіпертензією; 3 група – щури з гіпертензією, яким вводили ангіолін; 4 група – щури з гіпертензією, яким вводили квінаприл;

5 група – щури з гіпертензією, яким вводили ангіолін з квінаприлом.

Статистичні розрахунки проводили за допомогою спеціалізованої програми «Statplus». Отримані результати оцінювали на підставі статистичної обробки методом варіаційної статистики. Вірогідність різниці між досліджуваними показниками визначали за тестом Т'юкі, різницю між показниками вважали статистично вірогідною при  $p \leq 0,05$ . Тварин декапітували під хлоридно-уретановим наркозом.

**Результати та їх обговорення.** Результати проведеного дослідження узагальнено в таблиці. Із таблиці видно, що в гіпертензивних щурів співвідношення насичених та ненасичених ЖК відрізняється від показників нормотензивних щурів.

Уміст жирних кислот як в органах мішенях, так і в плазмі крові висвітлює виразність змін при АГ та ефективність антигіпертензивної терапії. Відомо важлива роль жирних кислот у підтримці прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та метаболічної активності, а також здійсненні енергетичного постачання [13].

У щурів з гіпертензією в плазмі крові відмічено суттєве пониження насиченості ліпідного компонента на 31,4 % порівня-

Таблиця

*Жиринокислотний склад ліпідів плазми крові у нормотензивних та гіпертензивних щурів за впливу квінаприлу, ангіоліну та квінаприлу з ангіоліном, % (n = 7)*

Жирна кислота	Нормотензивні щури	Щури з АГ	Щури з АГ+ангіолін	Щури з АГ+квінаприл	Щури з АГ+квінаприл+ангіолін
Міристинова	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,1	3,9 ± 0,1**/*	5,0 ± 0,1**/*	3,5 ± 0,5**/*
Пентодеканова	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3
Пальмітинова	25,8 ± 1,5	16,7 ± 1,0*	28,1 ± 1,5**	33,0 ± 1,5**	27,5 ± 1,6**
Маргарінова	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Стеаринова	7,6 ± 0,7	5,9 ± 0,05*	8,1 ± 0,5**	10,6 ± 1,0**	8,7 ± 0,7**
Олеїнова	10,2 ± 1,0	8,2 ± 0,7	9,9 ± 1,0	8,3 ± 0,8	8,5 ± 0,5
Лінолева	10,4 ± 1,0	9,2 ± 0,9	15,3 ± 1,0	10,1 ± 1,0	15,0 ± 1,0
Ліноленова	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Арахідонова	40,6 ± 1,5	55,2 ± 1,5*	31,9 ± 1,5**/*	28,2 ± 1,5**/*	34,3 ± 1,5**/*
Σ НЖК	36,6 ± 2,0	25,1 ± 1,8*	42,3 ± 2,0**	51,7 ± 2,0**/*	41,8 ± 1,6**
Σ ННЖК	63,8 ± 2,0	74,9 ± 1,8*	57,7 ± 2,0**	48,3 ± 2,0**/*	58,2 ± 1,6**
Σ ПНЖК	51,7 ± 1,6	65,2 ± 1,5*	47,8 ± 1,6**	39,5 ± 1,8**/*	49,7 ± 1,3**

*Примітка. \*p < 0,05 порівняно з нормотензивними тваринами; \*\*p < 0,05 порівняно з тваринами з АГ; НЖК – насичені жирні кислоти; ННЖК – ненасичені жирні кислоти; ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти.*

но з показником у плазмі крові нормотензивних щурів за рахунок зменшення рівня пальмітинової кислоти на 35,3 % та стеаринової на 22,4 %. У той самий час зростає вміст арахідонової кислоти на 35,9 %, ненасичених жирних кислот на 15,8 %, поліненасичених жирних кислот на 26,3 %. Недостатній вміст насичених жирних кислот як енергетичного субстрату може призвести до порушення утворення АТФ, що спостерігається в клініці у хворих з АГ та в експериментах на щурах з АГ [15]. Для забезпечення функціонального складу клітин суттєве значення має співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у фосфоліпідах клітинних мембран. Зростання вмісту ненасичених і поліненасичених жирних кислот свідчить про інтенсифікацію окисних процесів і зміни проникності мембран. Підвищення рівня арахідонової кислоти характерне як для АГ, так і інших патологічних процесів, може бути пов'язано з інтенсифікацією синтезу ейкозаноїдів, що посилюють проникність мембран [5]. Однією з причин збільшення вмісту арахідонової кислоти може бути підвищення її утворення в цитоплазмі клітини, а також і посилення її вивільнення з фосфоліпідів плазматичних мембран, можливо за участю фосфоліпази  $A_2$  [6]. Результатом метаболізму арахідонової кислоти є утворення вільних радикалів, що за умов високих концентрацій цієї кислоти інтенсифікує перекисне окиснення ліпідів, що спостерігається в щурів з АГ [14]. Після 90 днів лікування ангіоліном у плазмі крові щурів зростає вміст міристинової, пальмітинової, стеаринової кислоти, знижується рівень арахідонової кислоти порівняно з показниками в плазмі крові щурів з АГ, що взаємопов'язано з антиоксидантними та кардіопротекторними властивостями сполуки. Зміни співвідношення лінолевої та арахідонової кислот викликає пониження рівня ненасичених, поліненасичених кислот та зростання насичених, що свідчить про нормалізацію окислювально-відновних та енергоутворюючих процесів. Квінаприл при 3-місячному введенні щурам викликає більше, ніж ангіолін підвищення вмісту міристинової кислоти в гіпертензивних та нормотензивних щурів. Також біль-

шим стає вміст пальмітинової, стеаринової кислот та зменшується вміст арахідонової кислоти порівняно з ангіоліном, що узгоджується з фармакодинамічними властивостями препарату, пов'язаними не тільки з активацією NO-синтази, але також інших антипроліферативних факторів [9]. За введення квінаприлу відмічено низький показник суми поліненасичених жирних кислот за рахунок зниження рівня арахідонової кислоти порівняно з контролем. Після 3 місяців введення щурам квінаприлу з ангіоліном спостерігаються зміни жирнокислотного складу ліпідів плазми крові, що подібні до дії ангіоліну. Це відбувається за рахунок відновлення співвідношення як насичених, так ненасичених і поліненасичених ЖК, при цьому вміст пальмітинової та арахідонової ЖК змінюється до рівня показників нормотензивних тварин.

Отримані результати дозволяють зробити висновок щодо позитивного впливу квінаприлу в сполученні з ангіоліном на жирнокислотний склад ліпідів плазми крові щурів з АГ, що може бути пов'язано з антиоксидантною дією останнього.

## Висновки

1. За артеріальної гіпертензії в плазмі крові щурів знижується вміст пальмітинової та стеаринової, підвищується рівень арахідонової кислот. Зростають також показники суми ненасичених та поліненасичених жирних кислот та зменшується сума насичених жирних кислот.

2. 3-місячне внутрішньошлункове введення квінаприлу призводить до підвищення вмісту міристинової, пальмітинової, стеаринової кислот у плазмі крові щурів з АГ, значного пониження показників суми ненасичених і поліненасичених жирних кислот за рахунок низького вмісту арахідонової кислоти в плазмі крові порівняно з гіпертензивними і нормотензивними щурами.

3. Квінаприл за сумісного застосування з ангіоліном протягом 3 місяців у щурів з артеріальною гіпертензією має нормалізуючий вплив на жирнокислотний склад ліпідів в плазмі крові подібно до ангіоліну.

1. Клінічні рекомендації з артеріальної гіпертензії Європейського товариства гіпертензії (ESH) та Європейського товариства кардіологів (ESC) 2013 р. / G. Mancia, R. Fagart, K. Narkiewitar [et al.] // Артеріальна гіпертензія. – 2013. – № 4. – С. 62–157.
2. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries / M. Pereira, N. Lunet, A. Azevedo, H. Barras // J. Hypertens. – 2009. – V. 27. – P. 963–975.
3. Administration – time differences in effects of hypertension mediations in ambulatory blood pressure regulation / R. C. Hermida, D. E. Avala, J. R. Fernander [et al.] // Chronobiol. Int. – 2013. – V. 30, № 1–2. – P. 280–314.
4. Радченко А. Д. «Старые» и «новые» ингибиторы АПФ: портит ли старый конь борозду? / А. Д. Радченко // Артериальная гипертензия. – 2011. – № 2. – С. 81–99.
5. Загородний М. І. Зміни жирнокислотного спектра ліпідів у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією // М. І. Загородний, Т. С. Брюзгіна, А. С. Свінцицький // Серце і судини. – 2008. – № 3. – С. 80–83.
6. Adibhatea R. M. A (2) reactive oxygen species and lipid peroxidation in CNS pathologies / R. M. Adibhatea, J. F. Hatcher // BMB Rep. – 2008. – V. 41. – P. 560–561.
7. Вплив антигіпертензивних та метаболітотропних препаратів на жирнокислотний склад ліпідів кардіоміоцитів у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / А. М. Пузиренко, І. С. Чекман, Т. С. Брюзгіна, Н. О. Горчакова // Укр. кардіол. журнал. – 2013. – Т. 185, № 4. – С. 67–74.
8. Nebivolol and Quinapril reduce P-Wave duration and dispersion in hypertensive patients / H. Kormaz, O. Onalan, M. Akbulat, Y. Orbay // Indian Pacing Electro physiol. – 2009. – V. 9. – P. 158–166.
9. Канорский С. Г. Преимущество терапии квинаприлом у пациентов с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью I-II функционального класса с сохранной функцией выброса левого желудочка / С. Г. Канорский, В. Г. Трегубов, В. М. Покровский // Кардиология. – 2012. – Т. 52, № 4. – С. 31–37.
10. Фармакологическая коррекция нарушений в сопряженных системах NO-свободные тиолы при экспериментальном инфаркте миокарда с помощью метаболитотропного кардиопротектора «лизиний» / И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиарова [и др.] // Экспериментальная физиология та біохімія. – 2012. – № 2. – С. 7–11.
11. Газохроматографический метод определения липидных показателей крови при ишемической болезни сердца / Т. С. Гичка, С. Брюзгина, Т. М. Врятник [и др.] // Укр. кардіол. журнал. – 1998. – № 7–8. – С. 50–52.
12. Lopez-Jaramillo P. Blockade of endothelial enzymes: new therapeutic targets / P. Lopez-Jaramillo, J. P. Casas // J. Hum. Hypertens. – 2002. – V. 16, Suppl 1. – P. 100–103.
13. Цветкова М. В. Роль неэстерифицированных жирных кислот в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / М. В. Цветкова, В. Н. Хирманов, Н. Н. Забина // Артериальная гипертензия. – 2010. – № 1. – С. 93–103.
14. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем: Пер. с нем. – М., 2000. – 469 с.

***Е. А. Нагорная, Н. А. Горчакова, И. С. Чекман,  
И. Ф. Беленичев, Т. С. Брюзгина***

### **Влияние совместного применения квинаприла с ангиолином на жирнокислотный состав липидов плазмы крови у крыс с артериальной гипертензией**

Одним из наиболее активных ингибиторов АПФ признан квинаприл, который обладает высоким сродством к АПФ, улучшает эндотелиальную вазодилатацию. Новым биологически активным соединением с антиоксидантным, эндотелиопротекторным, кардиопротекторным, противоишемическим эффектом является ангиолин. Цель исследования – изучение жирнокислотного состава плазмы крови у крыс с артериальной гипертензией в условиях раздельного и сочетанного применения квинаприла и ангиолина. В крови крыс со спонтанной артериальной гипертензией определяли уровень жирных кислот газохроматографическим методом. Квинаприл и ангиолин вводили внутривенно раздельно и совместно в комбинации в дозах 10 мг/кг в течение 3 месяцев. В экспериментах на крысах с артериальной гипертензией установлено понижение в плазме крови содержания пальмитиновой, стеариновой кислот, суммы насыщенных жирных кислот. В плазме возрастает уровень арахидоновой кислоты, сумма ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. Квинаприл нормализует содержание насыщенных жирных кислот и их сумму, вместе с тем, сумма ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот значительно снижена за счет низкого содержания арахидоновой кислоты. Квинаприл при совместном введении с ангиолином, подобно ангиолину, у крыс с артериальной гипертензией оказывает нормализующее действие на жирнокислотный состав липидов плазмы крови крыс с артериальной гипертензией.

*Ключевые слова: квинаприл, ангиолин, артериальная гипертензия, жирные кислоты*

---

**E. A. Nagornaya, N. A. Gorchakova, I. S. Chekman,  
I. Ph. Belenichev, T. S. Bruzgina**

**Cooperative quinapril and angiotensin influence on the fatty acids content in rats blood plasma with arterial hypertension**

Arterial hypertension is one of the most serious disease in the world. Changes in fatty acids blood plasma content are the important factor in the development of arterial hypertension. One of the most active ACE inhibitors now is quinapril that has a high affinity for tissue, improves endothelium-dependent vasodilatation and possesses a favourable effect on heart rate. Angiotensin is a new biologically active compound with antioxidant, endotheliumprotective, cardioprotective and antischemic effects. On the basis of the possible angiotensin regulatory role as cardioprotector, it is reasonable to study the cooperative influence of angiotensin with quinapril on one of the new aspects of arterial hypertension pathogenesis – the fatty acids content in rats blood plasma. The experiments have been performed in 35 rats of both sexes, weight 180–220 g, among which 28 spontaneous hypertensive rats (SHR), and 7 normotensive rats WKR line. Determination of fatty acids level in the rats' blood plasma has been performed by gas-liquid chromatography. Quinapril and angiotensin administered intraperitoneally separately and cooperatively, respectively, in doses of 10 mg/kg for 3 months. In experiments on rats with arterial hypertension it is stated lowering in blood plasma of palmitic, stearic acids, saturated fatty acids content and increasing the level of arachidonic acid, the amount of unsaturated and polyunsaturated fatty acids. Quinapril increased miramistic acid level in rats' blood plasma in hypertensive rats in more degree then under cooperative action with angiotensin. Quinapril increased of palmitic, stearic acids, saturated fatty acids content and decreased the level of arachidonic acid, the amount of unsaturated and polyunsaturated fatty acids significantly in both hypertensive and normotensive rats. Quinapril with angiotensin, as well as angiotensin in rats with arterial hypertension have a normalizing effect on the fatty acids content in the rats' blood plasma due to antioxidant and antiradical angiotensin properties.

*Key words: quinapril, angiotensin, arterial hypertension, fatty acids*

*Надійшла: 14.02.2014 р.*

---

**Контактна особа:** Чекман І. С., доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03157. Тел.: +38 0 44 454 49 24.

T. Novokhatska<sup>1</sup>, K. Klymenko<sup>1</sup>, V. Dosenko<sup>2</sup>, A. Soloviev<sup>1</sup>

## Fact or fancy: Does the high level of PKC-delta gene expression contribute to potassium channels malfunction at arterial hypertension and diabetes?

<sup>1</sup>SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine», Kiev

<sup>2</sup>Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kiev

*Key words: protein kinase C delta isoform, potassium channels, diabetes, arterial hypertension, RNA-interference*

Arterial hypertension development is a complex and multifactorial process that involves a number of functional systems that contribute to vascular malfunction development. It is well known that both vascular smooth muscle (VSM) contraction and relaxation are closely coupled to membrane potential, which, in turn, is mainly determined by potassium channels activity. The data obtained clearly indicate that potassium conductance is altered in essential hypertension [1]. It is known also that a high level of protein kinase C (PKC) activity in vascular wall [2] and related overproduction of reactive oxygen species (ROS) [3] are typical features for both essential arterial hypertension and diabetes.

One of the main mechanisms underlying an increased VSM contractility at arterial hypertension may be an increased PKC activity [4]. It is also known that this enzyme appear tightly involved in plasmolemmal ion permeability. For instance, it has been shown that PKC regulates activity of K<sup>+</sup> channels, which play an essential role in vascular function via its involvement in changes of membrane polarisation [5]. There is strong evidence that PKC modulates K<sup>+</sup> channels activity providing to increasing of vascular tone in both physiological and pathophysiological conditions [4, 6]. A crucial role in the regulation of smooth muscle cells (SMCs) plasma membrane polarization belongs to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels, which are predominant K<sup>+</sup> channels in vascular SMCs and appeared to have disturbances in sub-

units expression and regulation and thus become dysfunctional at hypertensive and diabetic conditions [7].

Vascular tone depends on normal and coordinated function of the main vascular wall components – endothelial (ECs) and smooth muscle cells (SMCs). A considerable number of clinical studies demonstrated that endothelium-dependent vasodilatation is abnormal in patients with 1 and 2 type of diabetes [8]. Among numerous pathophysiological pathways, which contribute to the development of diabetic vascular dysfunction, activation of regulatory enzyme protein kinase C (PKC) requires special attention. Being chronically activated by hyperglycemia, PKC has many targets in ECs and SMCs and regulates such vascular functions as cell growth, angiogenesis, vascular cells permeability, Ca<sup>2+</sup>-sensitization and SMCs contractility [9]. PKC- $\delta$  isoform expressed in SMCs is known to play crucial role in a number of pathological conditions [10]. Thus, PKC appeared to be a good target for pharmacological intervention in diabetic conditions.

RNA-interference (RNAi) is rapidly emerging as an essential gene-silencing tool. It is known that RNA-interference using small interfering RNAs (siRNAs, a double-stranded RNA molecule having 21-23 bp) represents a powerful tool for silencing a target gene in gene therapy [11]. Given the ability to knock down essentially any gene of interest, RNAi via siRNAs has generated a great deal of interest in both basic and applied pharmacology. The siRNAs appear as an extremely powerful and popular gene silencing agent.

*Thereby, the aim of this study was to identify weather PKC- $\delta$  gene silencing using siRNAs restores K<sup>+</sup> channels func-*

tion in VSM damaged following arterial hypertension and diabetic development.

**Materials and methods.** All animal studies were performed in accordance with the recommendations of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and approved by the Institutional Animal Care and with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct of research involving human subjects and/or animals.

*Induction of diabetes.* Diabetes was induced in male Wistar (WKY) rats (180–200 g) by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg) dissolved in buffer solution contained 0,9 % NaCl and 0,3 % citrate Na, pH 4.6.

*Isolation of vascular smooth muscle cells.* Isolated smooth muscle cells were obtained from rat thoracic aorta at mature male healthy WKY, spontaneously hypertensive rats (SHR), rats with STZ-induced diabetes, SHR and diabetic rats after siRNA targeted to PKC- $\delta$  isoform administration (250–300 g). Animals were killed by cervical dislocation following ketamine (45 mg/kg b.w., IP) and xylazine (5 mg/kg b.w., IP) anesthesia. The thoracic aorta (1,5–2,0 cm-long) was removed, cleaned of adipose and connective tissues and cut into rings (width 1,0–1,5 mm) in a cold nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing (in mM): 140 NaCl; 5,9 KCl; 2,5  $\text{MgCl}_2$ ; 11,5 glucose; 10 5-N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES), pH 7,4. Then the vascular tissues were transferred to a fresh nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing 2 mg/ml collagenase type IA (417 U/mg), 0,5 mg/ml protease type XXV, and 2 mg/ml bovine serum albumin. The tissues were then incubated for 33 min at 37 °C. After incubation, the tissues were washed (2–3 min) twice in a fresh nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution to remove the enzymes. Cells were dispersed by agitation using a glass pipette, and then transferred into buffer solution which content was described above. Aliquots of the myocytes were stored at +4 °C and remained functional for at least 5 hours.

*Electrophysiological studies.* To study whole-cell integral outward potassium currents (voltage clamp mode) the whole-cell patch clamp technique in the amphotericin B (250  $\mu\text{g/ml}$ ) perforated-patch configuration was used. Data acquisition and voltage protocols were performed using an Axopatch 200B Patch-Clamp amplifier and Digidata 1200 B interface (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) coupled to a computer equipped with pClamp software (version 6.02, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Membrane currents were filtered at 2 kHz and digitized at a sampling rate of 10 kHz. The reference electrode was an Ag-AgCl plug electrically connected to the bath.

At the beginning of each experiment, the junction potential between the pipette solution and bath solution was electronically adjusted to zero. No leakage current subtraction was performed on the original recordings, and all cells with input resistances below 1 G $\Omega$  were excluded from further analysis. Macroscopic current values were normalized as pA/pF. The membrane capacity of each cell was estimated by integrating the capacitive current generated by a 10 mV hyperpolarizing pulse after electronic cancellation of pipette-patch capacitance using Clampfit software (version 8.0, Axon Instruments Inc., Foster City, CA USA). All electrophysiological experiments were carried out at room temperature (20 °C). Patch pipettes were made from borosilicate glass (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England) and backfilled with intracellular solution (in mM): 140 KCl; 10 NaCl; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES; 11,5 glucose; 2 ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA); 1  $\text{CaCl}_2$  adjusted to pH 7,3 with KOH, resulting in a free  $[\text{Ca}^{2+}]$  of approximately 170 nM. Pipettes had resistances of 2,5–5,0 M $\Omega$ . The standard Krebs external solution contained (in mM): 140 NaCl; 5,9 KCl; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 2,5  $\text{CaCl}_2$ ; 11,5 glucose; 10 HEPES, pH 7,4.

Integral outward currents were elicited by 10 mV steps pulses with 300 ms duration between -100 and +70 mV from

holding potential of -60 mV. Holding potential was maintained at -60mV in all experiments. Macroscopic current values were normalized as pA/pF.

*Delta isoform PKC gene knockdown by RNA interference.* The silencing siRNAs for PKC -  $\delta$  (PRKCD-S-5' - GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU - 3'; PRKCD-A-5' - AGA UCU UUU GUU UCU GAG UUU - 3') genes were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany) and injected intravenously via the tail vein.

One-stranded siRNAs were made double-stranded by annealing. Before injection solutions of appropriate sense and antisense oligonucleotides were dissolved in annealing buffer with the following composition (mM): 30 HEPES-KOH; 100 KCl; 2 MgCl<sub>2</sub>; 50 NH<sub>4</sub>Ac; pH 7,4. Equal volumes of sense and antisense oligonucleotides solutions were mixed in the tube and then two times smaller volume of annealing buffer was added. Then, using thermocycler «GeneAmp System 2700» this solution was heated to 90 °C and incubated for 1 min and then during 45 min was cooled to room temperature. Annealed siRNAs were injected (40  $\mu$ g / per rat) twice via tail vein with 24 hours interval.

*Total mRNA isolation and real time (RT)-polymerase chain reaction (PCR).* Total RNA was isolated from rat aorta using a Trizol RNA-prep kit (Isogen, Russian Federation) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined with the use of a NanoDrop spectrophotometer ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was performed using a RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), using 200–300 ng of total RNA and a random hexamer primer. Single-chain DNA was used for real-time PCR (RT-PCR).

We performed amplification in 10  $\mu$ l of SYBR Green PCR Master Mix containing 30 pM of each primer. For amplification mRNA delta PKC and  $\beta$ -actin (housekeeping gene) fragments we used next primers: PKC delta sense 5' - CTG GAA TAG TGA GCT CCC AGA C - 3' and antisense 5' - ATC ACC AGT CAC CCA CTC TTC T - 3';  $\beta$ -actin sense 5' - TGT TAC GTC GCC TTG GAT TTT GAG - 3'

and antisense 5' - AAG AGA GAG ACA TAT CAG AAG C - 3'. Primers were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany). Sample volume was driven to 20  $\mu$ l with deionized water. Amplification was performed on thermocycler 7500 Fast Real-Time PCR System. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation and AmpliTaq Gold® DNA polymerase activation step at 95 °C for 10 min, followed by the treatments at 95 °C for 20 s, and at 65 °C for 45 s and for 50 cycles, followed by the dissociation step. For control of specificity we performed dissociation stage-sequential increase of temperature from 65 °C to 95 °C with registration of the drop in the double-stranded DNA-SYBR Green complexes fluorescence strength.

We performed calculations using the 7500 Fast System SDS software provided. The CT (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescence signal to exceed the detection threshold. The expression of the target gene relative to the housekeeping gene as the difference between the threshold values of the two genes was calculated.

*Chemicals.* Streptozotocin, norepinephrine, BSA, amphotericin B, collagenase, protease, dihydroethidium and all constituents of the Krebs solution were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA).

*Statistical analysis and data presentation.* Electrophysiological and PCR data analysis were performed using Origin 7.5 (Microcal Software, Northampton, MA, USA.) software.

Data are shown as means  $\pm$  S.E.M., n indicates the number of cells or preparations tested; each cell or preparation used for a specific experimental protocol was obtained from different animals. Multiple comparisons were performed using one way analysis of variance (ANOVA). If any significant difference was found the Tukey's multiple comparison test was applied. Differences were considered to be statistically significant when p was less than 0,05.

**Results and discussion.** In the present study we have tested the hypothesis that PKC- $\delta$  is involved in vascular dis-



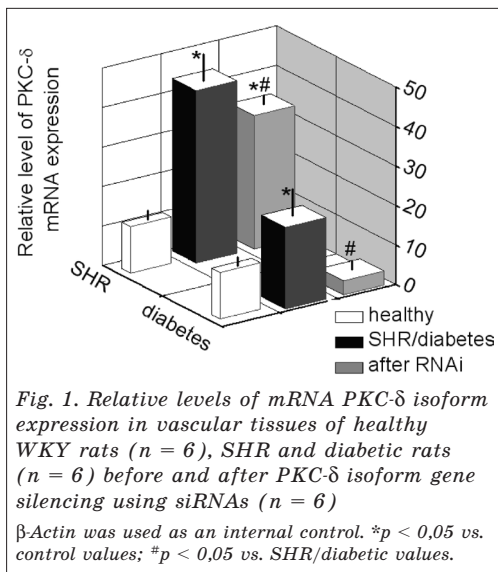
orders development, i.e. decreased integral outward potassium currents in vascular SMCs. Potassium channels are known to play an essential role in vascular function regulation and their dysfunction contributes in pathogenesis not only pulmonary and systemic hypertension but diabetes and atherosclerosis [12].

At the day of experiment, spontaneously hypertensive rats showed blood pressure levels with average meaning of  $158 \pm 2$  mm Hg ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ). Diabetic rats showed a high blood glucose levels with average meaning of  $30,0 \pm 0,5$  mM/l, ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ) while age-matched control rats demonstrated  $7,0 \pm 1,6$  mM/l ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ).

It is clear that arterial hypertension is a multifactorial process that involves a number of functional systems those contribute to dominance of constrictor influences over dilatation producing this way vascular hypercontractility and vascular tone elevation. VSM contraction is tightly coupled to membrane potential, which, in turn, is determined mainly by potassium channels activity.

It is well known that PKC is a group of regulatory enzymes that plays a key role in many cellular functions and affects a number of signal transduction pathways [13]. Among at least 12 PKC family members, lots of PKC isoforms are expressed in vascular tissues: PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta_1$ , PKC- $\beta_2$ , PKC- $\gamma$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\eta$ , PKC- $\zeta$ , PKC- $\delta$ , and PKC- $\iota/\lambda$  [13]. There is strong evidence of PKC- $\delta$  activation and/or overexpression in diabetes and while hypertension development [14, 15].

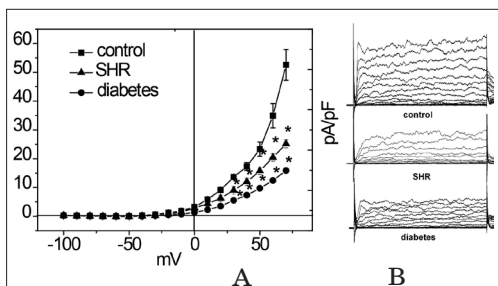
The data obtained in our study using RT-PCR experiments clearly demonstrate a significant diabetes-induced increase in PKC- $\delta$  isoform mRNA relative level in diabetic aortas as compared to controls. We have investigated the expression of PKC- $\delta$  isoform in vascular tissues in SHR and diabetic rats before and after its targeted disruption using siRNAs. Fig. 1 clearly demonstrates that mRNA delta-isoform expression measured using RT-PCR analysis was significantly higher in blood vessels from rats with arterial hypertension than those from WKY. Administration of siRNAs specific to



PKC- $\delta$  isoform genes resulted in significant decrease of relative level of its mRNA in SHR and diabetic rat aortas.

It is became clear also that one of the main mechanisms underlying increased VSM contractility is the increased PKC activity in vascular tissues [2]. It has been established that vascular tone elevation following ionizing irradiation is due to PKC-mediated increase in myofilaments  $Ca^{2+}$ -sensitivity [2] and PKC-dependent  $BK_{Ca}$  channelopathy [4].

The whole-cell patch clamp recordings were performed using aortic SMCs from SHR, diabetic rats on 3<sup>rd</sup> month of diabetes development; diabetic rats on 7<sup>th</sup> day after PKC- $\delta$  siRNAs administration and age-matched control healthy WKY.



**Fig. 2. Current-voltage relationships and original traces of integral outward potassium currents in isolated SMCs obtained from the thoracic aortas of healthy, SHR and diabetic rats**

The currents were elicited by 10-mV step pulses with 300-ms duration between -100 and +70 mV from a holding potential of -60 mV. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. control values.

Fig. 2 shows that the integral outward currents are decreased in aortic SMCs from SHR and diabetic rats as compared to controls,  $25 \pm 1$  pA/pF,  $16 \pm 1$  pA/pF and  $53 \pm 5$  pA/pF ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ), respectively.

Inhibited total outward currents in aortic SMCs from SHR appears significantly increased on 7<sup>th</sup> day as the result of a targeted disruption of PKC- $\delta$  isoform encoding gene using siRNAs from  $25 \pm 2$  pA/pF to  $36 \pm 3$  pA/pF ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ) (Fig. 3). Also we observed a significant increase in integral outward current amplitudes on 7<sup>th</sup> day after PKC- $\delta$  isoform gene silencing to  $24 \pm 3$  pA/pF ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ) in comparison with diabetic values.

The data obtained in our experiments clearly demonstrate a significant increase in integral outward potassium currents in isolated vascular SMCs obtained from diabetic rats after administration of siRNAs targeted to PKC- $\delta$  genes.

It was shown that the augmentation of integral outward  $K^+$ -current in spontaneously hypertensive rats after PKC-delta knockdown is due to  $BK_{Ca}$  function restoration [15]. Inhibition of  $BK_{Ca}$  channels in vascular SMCs produces membrane depolarization, elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), resulting in SMCs contraction and related vasoconstriction. Multiple studies demonstrate that  $BK_{Ca}$  are regulated by protein kinases and PKC inhibits the activation of these channels in different types of arterial smooth muscle [16].

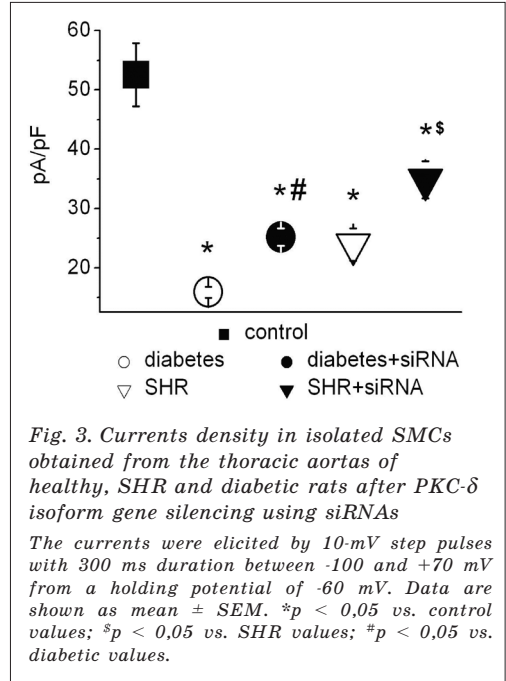


Fig. 3. Currents density in isolated SMCs obtained from the thoracic aortas of healthy, SHR and diabetic rats after PKC- $\delta$  isoform gene silencing using siRNAs

The currents were elicited by 10-mV step pulses with 300 ms duration between -100 and +70 mV from a holding potential of -60 mV. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. control values; \$ $p < 0,05$  vs. SHR values; # $p < 0,05$  vs. diabetic values.

Recently it was revealed, that PKC regulation of SMCs  $BK_{Ca}$  activity is ambiguous. It is known that PKC inhibits the open-state probability of  $BK_{Ca}$  channel  $\alpha$ -subunits, that depends on a phosphorylation of two distinct serines in the C terminus of the channel protein.

In conclusion, the main finding of this study shows that PKC- $\delta$  gene overexpression really decreases  $K^+$  channels activity and leads to vascular malfunction at essential hypertension and diabetes while RNAi technique is a good therapeutic approach to restore normal  $K^+$  channels function.

1. Cox R. H. Differential expression of voltage-gated  $K^+$  channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats / Cox R. H., Folande K., Swanson R. // Hypertension. – 2001. – V. 3. – P. 1315–1322.
2. Ionizing radiation alter myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C / Soloviev A., Tishkin S., Zelensky S.[et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2005. – V. 289. – P. R755–R762.
3. Lyle A. N. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species / Lyle A. N., Griending K. K. // Physiology. – 2006. – V. 21. – P. 269–280.
4. Protein kinase C-dependent inhibition of  $BK_{Ca}$  current in rat aorta smooth muscle cells following  $\gamma$ -irradiation / Kizub I., Pavlova O., Ivanova I., Soloviev A. // Int. J. Radiat. Biol. – 2010. – V. 86. – P. 291–299.
5. Protein kinase C inhibits delayed rectifier  $K^+$  current in rabbit vascular smooth muscle / Aiello E. A., Clement-Chomienne O., Sontag, D. P.[et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 1996. – V. 271. – P. H109–H119.
6. Taguchi K. Protein kinase C modulates  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells / Taguchi K., Kaneko K., Kubo T. // Biol. Pharm. Bull. – 2000. – V. 23. – P. 1450–1454.
7. Impaired  $Ca^{2+}$ -dependent activation of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker Diabetic Fatty rats / Lu T., Ye D., He T. [et al.] // Biophysical Journal. – 2008. – V. 95 (11). – P. 5165–5177.

8. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus / Johnstone M. T., Creager S. J., Scales K. M. [et al.] // *Circulation*. – 1993. – V. 88 (6). – P. 2510–2516.
9. Newton A. C. Protein kinase C: structure, function, and regulation / Newton A. C. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 1; 270. – P. 28495–28508.
10. Protein kinase C-d contributes to aneurysm pathogenesis through stimulation of apoptosis and inflammatory signaling / Morgan S., Yamanouchi D., Harberg C. [et al.] // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – V. 32 (10). – P. 2493–2502.
11. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with foliate-modified poly (ethyl-enimine) / Kim H., Jeong J. H., Cho K. C. [et al.] // *J. Controlled Release*. – 2005. – V. 104. – P. 223–232.
12. Nelson M. T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / Nelson M. T., Quayle J. M. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1995. – V. 268. – P. C799–C822.
13. Toker A. Signalling through protein kinase C / Toker A. // *Front Biosci.* – 1998. – V. 1; 3. – P. D1134–D1147.
14. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy / Gerald P., Hiraoka-Yamamoto J., Matsumoto M. [et al.] // *Nat. Med.* – 2009. – V. 15 (11). – P. 1298–1306.
15. Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing / Novokhatska T., Soloviev A., Tishkin S. [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2013. – V. 15; 718 (1–3). – P. 401–407.
16. Schubert R. Protein kinase C reduces the KCa current of rat tail artery smooth muscle cells / Schubert R., Noack T., Serebryakov V. N. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1999. – V. 276. – P. C648–C658.

**Т. В. Новохацька, К. І. Клименко, В. Є. Досенко, А. І. Соловійов**

### **Правда чи вигадка: чи насправді підвищений рівень експресії гена ПКС-дельта призводить до дисфункції калієвих каналів за артеріальної гіпертензії та діабету?**

Мета дослідження – ідентифікувати, чи насправді за розвитку артеріальної гіпертензії та цукрового діабету підвищений рівень експресії гена протеїнкінази С (ПКС) дельта призводить до порушення активності та функціонування калієвих каналів в гладеньком'язових клітинах аорти щура. Дослідження було проведено із застосуванням наступних методик: індукція діабету (стрептозотозин, 65 мг/кг), виділення гладеньком'язових клітин з аорти щура, перфорованого петч-клемпу в модифікації «ціла клітина», РНК-інтерференції за допомогою малих інтерферуючих РНК (міРНК) та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (РЧ-ПЛР). Результати РЧ-ПЛР продемонстрували значне підвищення рівня експресії гена дельта ізоформи ПКС у тварин як за артеріальної гіпертензії, так і за цукрового діабету порівняно зі здоровими щурами. Застосування методу РНК-інтерференції для пригнічення експресії гена ПКС- $\delta$  викликає тривалий та стабільний інтерференційний ефект, що проявляється в суттєвому зменшенні рівня експресії мРНК ПКС- $\delta$  на 7 добу в обох групах. Встановлено, що введення міРНК призводить до суттєвого збільшення щільності інтегральних трансмембранних струмів вихідного напрямку в ГМК судинної стінки за рахунок відновлення провідності крізь калієві канали різної провідності. Отримані дані свідчать, що дельта ізоформа ПКС залучена до розвитку каналопатії калієвих каналів аорти щура за розвитку як гіпертензивних станів, так і цукрового діабету. Результат дослідження чітко вказує на те, що надмірна експресія гена дельта ізоформи ПКС насправді знижує активність  $K^+$ -каналів та призводить до розвитку судинної дисфункції за артеріальної гіпертензії та діабету, тоді як застосування техніки РНК-інтерференції може бути хорошим терапевтичним підходом для відновлення нормального функціонування  $K^+$ -каналів.

*Ключові слова: дельта ізоформа протеїнкінази С, калієві канали, цукровий діабет, артеріальна гіпертензія, РНК-інтерференція*

**Т. В. Новохацкая, К. И. Клименко, В. Е. Досенко, А. И. Соловьев**

### **Правда или вымысел: действительно ли повышенный уровень экспрессии гена ПКС-дельта приводит к дисфункции калиевых каналов при артериальной гипертензии и диабете?**

Цель исследования – идентифицировать, действительно ли при развитии артериальной гипертензии и сахарного диабета повышенный уровень экспрессии гена протеинкиназы С (ПКС) дельта приводит к нарушению активности и функционирования калиевых каналов в гладкомышечных клетках аорты крысы. Исследование было проведено с применением следующих методик: индукция диабета (стрептозотозин, 65 мг/кг), выделение гладкомышечных клеток из аорты крысы, перфорованного пэтч-клемпа в модификации «целая клетка», РНК-интерференции с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР).

---

---

Результаты РВ-ПЦР продемонстрировали значительное повышение уровня экспрессии гена дельта изоформы ПКС у животных, как при артериальной гипертензии, так и при сахарном диабете по сравнению со здоровыми крысами. Применение метода РНК-интерференции для подавления экспрессии гена ПКС- $\delta$  вызывает длительный и стабильный интерференционный эффект, проявляющийся в существенном уменьшении уровня экспрессии мРНК ПКС- $\delta$  на 7 сутки в обеих группах. Установлено, что введение миРНК приводит к существенному увеличению плотности интегральных трансмембранных токов выходящего направления в ГМК сосудистой стенки за счет восстановления проводимости через калиевые каналы. Полученные данные свидетельствуют, что дельта изоформа ПКС вовлечена в развитие каналопатии калиевых каналов аорты крысы при развитии как гипертензивных состояний, так и сахарного диабета. Результат исследования четко указывает на то, что чрезмерная экспрессия гена дельта изоформы ПКС действительно снижает активность  $K^+$ -каналов и приводит к развитию сосудистой дисфункции при артериальной гипертензии и диабете, тогда как применение техники РНК-интерференции может быть хорошим терапевтическим подходом для восстановления нормального функционирования  $K^+$ -каналов.

*Ключевые слова: дельта изоформа протеинкиназы C, калиевые каналы, сахарный диабет, артериальная гипертензия, РНК-интерференция*

---

Надійшла: 14.02.2014 р.

**Контактна особа:** Новохацька Тетяна Василівна, молодший науковий співробітник, відділ експериментальної терапії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14. вул. Е. Потье, м. Київ, 03680. Тел.: +38 044 456 42 56.

А. О. Прискока

## Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Ключові слова: наночастинок срібла,  
гостра токсичність, миші

Срібло є одним із найактивніше досліджуваних металів у нанорозмірному діапазоні. Відоме своєю протимікробною активністю ще із стародавніх часів [1], срібло, у формі наночастинок відкриває нові можливості для лікування інфекційних хвороб, у тому числі викликаних антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів. Тим не менш у світовій літературі недостатньо даних щодо токсичності наночастинок срібла (НЧС). Дослідження, в основному, обмежуються даними цитотоксичності на культурах клітин, однак для впровадження НЧС як лікарський засіб необхідна оцінка впливу на цілісний організм. Нечисленні дослідження гострої токсичності при пероральному способі введення наночастинок срібла на мишах [2], щурах [3], а також при нашкірному введенні морським свинкам [4], щурам [3, 5] та кроликам [3] виявили низьку токсичність НЧС. У роботі [6], де спосіб введення був внутрішньовенний, а НЧС стабілізовані ПАР, показник  $LD_{50}$  був надзвичайно низький, що свідчить про високу токсичність досліджуваних авторами НЧС. Ці дані літератури настановлюють на думку, що наночастинок срібла залежно від форми, способу введення, розмірів та інших параметрів мають різний токсикологічний профіль.

На кафедрі фармакології та клінічної фармакології НМУ імені О. О. Богомольця протягом останніх 15 років проводяться дослідження з вивчення фармакологічних і токсикологічних властивостей нанометалів: срібла, міді, заліза [8–10].

*Мета роботи* – дослідження гострої токсичності НЧС.

*Матеріали та методи.* Об'єктом дослідження був колоїдний розчин НЧС (діаметр 30 нм, сферична форма), синтезованих за оригінальною методикою в Інституті біоколоїдної хімії, у концентрації 1080 мг/мл. Розмір наночастинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія). Розмір та форма наночастинок також підтверджені за допомогою електронно-трансмісійної мікроскопії (JEM-1230, «JEOL», Японія). У попередніх дослідженнях [11] було виявлено відсутність генотоксичного ефекту *in vivo* та *in vitro*, мутагенної дії даних наночастинок. Гостру токсичність НЧС досліджували на самках та самцях мишей лінії BALB/c, було обрано внутрішньоочеревинний спосіб введення, як один із шляхів, що забезпечує системний вплив [12]. У дослідження взято 56 самок та 56 самців мишей лінії BALB/c (вага  $20 \pm 2$  г), яких було розподілено на 8 груп по 7 особин (7 дослідних груп, що отримували НЧС у діапазоні доз 15–45 мг/кг у перерахунку на металічне срібло, та одна контрольна). Усіх тварин утримували за стандартних умов віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Дослідження проводили відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [13].

Дослідні групи розподілили відповідно до рівнів доз (15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг). Тваринам контрольної групи вводили воду для ін'єкцій (виробник –

ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»). Протягом перших 48 год після введення досліджуваної речовини спостерігали за смертністю, поведінкою тварин. За тваринами спостерігали протягом наступних 14 діб після введення. Зважування виконували безпосередньо перед уведенням, на 7 та 14 добу експерименту. Після закінчення дослідження тварини були виведені з експерименту шляхом шийної дислокації. Усі тварини підлягали розтину, у них були вилучені внутрішні органи для подальших досліджень (печінка, нирки, селезінка, серце, легені, головний мозок) та виконані відповідні статистичні розрахунки  $LD_{50}$ . Визначення  $LD_{50}$ , а також графічне відображення результатів проводили за допомогою програми BioStat 2009 v 5.8.4. (виробник – Analyst Soft), обраний метод розрахунку – пробіт-аналіз за Finney. Дослідження проводили відповідно до вітчизняних [12] та зарубіжних рекомендацій [14].

**Результати та їх обговорення.** *Спостереження за тваринами.* У перші

хвилини після введення досліджуваного препарату спостерігали пригнічення рухової активності в усіх експериментальних тварин. У самок з груп № 3 та № 5 (15 та 35 мг/кг відповідно) спостерігали «корчі» (тварини рухались, характерно вигинаючи тулуб, та волочили задні лапи), що свідчить про сильне подразнення органів черевної порожнини досліджуваним препаратом. У мишей обох статей з груп № 6 та 7 (дози 40 та 45 мг/кг відповідно) спостерігали гіперемію вух. Загибель тварин спостерігали здебільшого в перші 24 год експерименту. Відновлення рухової активності та апетиту в піддослідних мишей, що вижили, відбувалося через 24–48 год після введення препарату. У контрольній групі тварин відхилень від норми не відмічено. У всіх досліджуваних групах тварин, окрім самців групи № 2, спостерігали позитивну динаміку набору ваги (табл. 1).

*Результати розтину.* При розтині в усіх мишей дослідних груп виявлена виражена гіперемія очеревини та кишківника. Розвиток асептичного запа-

Таблиця 1

*Динаміка маси тіла мишей за внутрішньоочервинного введення наночасток срібла, г ( $M \pm m$ )*

Група тварин, (доза)	Маса тварин, г		
	Вихідні дані	7 доба	14 доба
<i>Самці</i>			
№ 1 (15 мг/кг)	20,27 ± 1,43*	24,27 ± 2,87*	25,98 ± 2,34*
№ 2 (20 мг/кг)	20,64 ± 0,97*	24,58 ± 2,62**	19,94 ± 2,79**
№ 3 (25 мг/кг)	20,67 ± 1,48*	26,58 ± 1,80***	21,40 ± 3,55***
№ 4 (30 мг/кг)	19,96 ± 1,55*	24,40 ± 1,30****	24,15 ± 2,19****
№ 5 (35 мг/кг)	19,67 ± 0,68*	21,43 ± 4,57***	22,78 ± 5,83***
№ 6 (40 мг/кг)	20,66 ± 1,43*	28,23 ± 1,57****	28,35 ± 0,26****
№ 7 (45 мг/кг)	19,71 ± 1,48*	-	-
Контроль (вода для ін'єкцій)	18,26 ± 0,20*	21,34 ± 2,09*	22,18 ± 2,42*
<i>Самки</i>			
№ 1 (15 мг/кг)	19,73 ± 2,09*	21,50 ± 1,59***	23,02 ± 3,39***
№ 2 (20 мг/кг)	19,33 ± 1,25*	22,12 ± 2,08***	22,86 ± 2,41***
№ 3 (25 мг/кг)	19,51 ± 1,36*	21,70 ± 2,14****	21,00 ± 2,83****
№ 4 (30 мг/кг)	19,51 ± 1,36*	-	-
№ 5 (35 мг/кг)	18,36 ± 0,63*	-	-
№ 6 (40 мг/кг)	19,76 ± 1,14*	-	-
№ 7 (45 мг/кг)	19,76 ± 1,41*	-	-
Контроль (вода для ін'єкцій)	18,54 ± 2,64*	20,99 ± 2,79*	21,37 ± 2,64*

*Примітка.* n – кількість тварин у групі на час зважування; \*n = 7; \*\*n = 6; \*\*\*n = 5; \*\*\*\*n = 4.

лення в черевній порожнині міг стати однією з причин загибелі піддослідних тварин. Відмічена світла зернистість печінки може свідчити про гепатотоксичний вплив уведеної речовини. У мишей, яким вводили дози, вищі за 25 мг/кг, виявлений чорний осад на внутрішній стороні очеревини, що, скоріш за все, являє собою окислені спо-

луки срібла. Масові коефіцієнти внутрішніх органів (печінки, нирок, селезінки, серця, легень, головного мозку) відображені в таблиці 2. Слід відзначити суттєве збільшення масового коефіцієнта печінки в дослідних групах самців, що свідчить про можливість негативного впливу уведеної субстанції на цей орган.

Таблиця 2

*Масові коефіцієнти внутрішніх органів мишей за внутрішньоочеревинного введення наночастинок срібла ( $M \pm m$ )*

Група тварин, (доза)	Маса тварин, г					
	печінка	нирка	селезінка	легені	серце	головний мозок
<i>Самці</i>						
№ 1 (15 мг/кг)	5,24 ± 0,78	0,83 ± 0,03*	0,72 ± 0,08*	1,35 ± 0,03*	0,61 ± 0,03*	1,72 ± 0,03*
№ 2 (20 мг/кг)	7,17 ± 0,40*	1,10 ± 0,04	0,89 ± 0,04*	1,89 ± 0,07*	0,89 ± 0,04*	2,65 ± 0,07*
№ 3 (25 мг/кг)	7,70 ± 0,31*	1,34 ± 0,21*	1,11 ± 0,06	1,98 ± 0,04*	0,94 ± 0,06*	2,24 ± 0,08
№ 4 (30 мг/кг)	9,46 ± 1,15*	1,36 ± 0,27	1,26 ± 0,18*	1,40 ± 0,93*	1,01 ± 0,14	2,63 ± 0,28*
№ 5 (35 мг/кг)	6,75 ± 1,42	0,77 ± 0,04*	0,69 ± 0,14*	1,61 ± 0,10	0,65 ± 0,08*	2,24 ± 0,06
№ 6 (40 мг/кг)	6,90 ± 2,07	0,93 ± 0,23	0,78 ± 0,21*	1,00 ± 0,02*	0,74 ± 0,26*	2,08 ± 0,62
№ 7 (45 мг/кг)	10,93 ± 0,25*	1,11 ± 0,01*	1,03 ± 0,02	2,14 ± 0,15*	1,37 ± 0,04*	3,21 ± 0,15*
Контроль (вода для ін'єкцій)	6,34 ± 0,19	1,10 ± 0,10	1,19 ± 0,34	1,60 ± 0,30	1,01 ± 0,09	2,21 ± 0,16
<i>Самки</i>						
№ 1 (15 мг/кг)	6,52 ± 0,28*	0,63 ± 0,01*	0,96 ± 0,12*	1,53 ± 0,01	0,86 ± 0,08	2,16 ± 0,11*
№ 2 (20 мг/кг)	6,24 ± 0,55*	0,52 ± 0,07*	0,60 ± 0,10*	1,48 ± 0,06	0,49 ± 0,03*	2,22 ± 0,10*
№ 3 (25 мг/кг)	7,24 ± 1,29*	0,67 ± 0,12*	0,88 ± 0,01*	1,72 ± 0,06*	0,73 ± 0,16*	2,11 ± 0,08*
№ 4 (30 мг/кг)	6,62 ± 0,03*	0,75 ± 0,01*	0,65 ± 0,04*	1,27 ± 0,02*	0,57 ± 0,01	2,06 ± 0,03*
№ 5 (35 мг/кг)	8,41 ± 0,66	0,78 ± 0,01*	1,29 ± 0,10*	1,66 ± 0,01*	0,67 ± 0,05	2,29 ± 0,01
№ 6 (40 мг/кг)	9,11 ± 0,45*	0,74 ± 0,04*	0,84 ± 0,05*	1,56 ± 0,20	0,64 ± 0,03	2,50 ± 0,18*
№ 7 (45 мг/кг)	8,15 ± 0,62	0,76 ± 0,05	0,79 ± 0,13	1,31 ± 0,02	0,81 ± 0,12*	2,54 ± 0,01*
Контроль (вода для ін'єкцій)	8,63 ± 0,07	0,82 ± 0,04	0,76 ± 0,03	1,44 ± 0,10	0,76 ± 0,03	2,63 ± 0,29

Примітка. n = 4-7. \*статистично достовірно порівняно з контролем, p < 0,05.

Таблиця 3

*Загибель самців та самок мишей  
BALB/c за внутрішньоочеревинного  
введення наночастинок срібла*

Група тварин, №	Доза, мг/кг	Кількість загиблих тварин	Загальна кількість тварин у групі
<i>Самці</i>			
1	15	0	7
2	20	1	7
3	25	2	7
4	30	3	7
5	35	2	7
6	40	3	7
7	45	7	7
<i>Самки</i>			
1	15	2	7
2	20	2	7
3	25	3	7
4	30	6	7
5	35	6	7
6	40	7	7
7	45	7	7

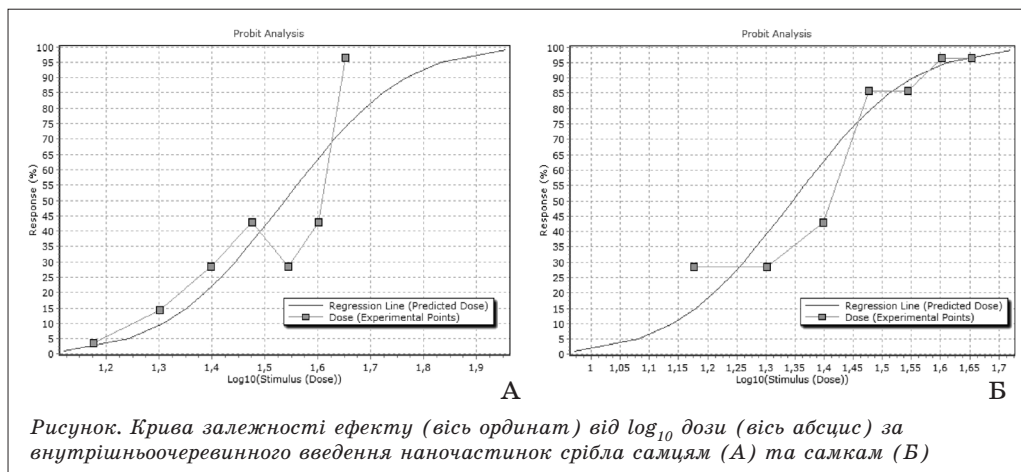
*Розрахунок  $LD_{50}$ .* Дані щодо смертності тварин підсумовано в таблиці 3. Криві залежності доза-ефект для самців та самок зображені на рисунку. Статистична обробка первинних даних виявила, що  $LD_{50}$  для самок є нижчою ніж для самців ( $22,17 \pm 2,36$  мг/кг та  $34,53 \pm 3,87$  мг/кг відповідно,  $p = 0,05$ ), що може свідчити про більшу чутливість самок до досліджуваного розчину срібла. Отримані дані з визначення  $LD_{50}$  дозволяють віднести дослі-

джувані наночастинки до III класу токсичності й характеризувати їх як «помірно токсичні сполуки» [12].

Отримані дані свідчать про те, що НЧС можуть бути токсичними при парентеральному застосуванні. Як показало наше дослідження, при внутрішньоочеревинному введенні високих доз НЧС спостерігається їхня подразнююча дія на очеревину та внутрішні органи, що проявляється характерним симптомом (корчі), змінами внутрішніх органів (гіперемія очеревини, кишківника), які свідчать про розвиток запалення. До того ж, відзначені зміни печінки дослідних тварин (поява світлої зернистості, збільшення маси печінки) можуть свідчити про гепатотоксичність досліджуваних наночастинок срібла. Дані літератури щодо гендерних особливостей токсичної дії НЧС відсутні. Тим не менш, у статтях [15–17] наводяться гендерні особливості кумуляції НЧС. Так, зокрема, відмічається більше накопичення НЧС у нирках самок порівняно із самцями, які, утім, не призводили до видимих негативних наслідків.

## Висновки

1. Внутрішньоочеревинне введення наночастинок срібла в колоїдному розчині самцям і самкам мишей BALB/c виявило, що  $LD_{50}$  для самців і самок становлять  $34,53 \pm 3,87$  мг/кг та  $22,17 \pm 2,36$  мг/кг ( $p = 0,05$ ) відповідно, розраховані за методом пробіт-аналізу Finney, що дозволяє віднести досліджувані наночастинки срібла до III класу токсичності «Помірно токсичні сполуки».





2. Суттєві відмінності в значеннях  $LD_{50}$  для самців та самок свідчать про залежність гострої токсичності від статі та більшу чутливість самок до наночастинок срібла за обраного шляху введення.

3. Спостереження за поведінкою тварин, а також результати розтину свідчать про виражену подразнюючу дію колоїдного розчину НЧС за внутрішньоочеревинного введення.

1. Alexander J. W. History of the medical use of silver / Alexander J. W. – Surgical infections. – 2009. – V. 10. – № 3. – P. 289–299.
2. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles / P. Maneewattanapinyo, W. Banlunara, C. Thammacharoen [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2011. – V. 73. – P. 1417–1423.
3. Kim J. S., Song K. S., Sung J. H. [et al.] // Nanotoxicology. – 2013. – V. 7, № 5. – P. 953–960.
4. Korani M., Rezayat S. M., Gilani K. [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 855–862.
5. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use / Jain J, Arora S, Rajwade J. M. [et al.] // Mol. Pharm. – 2009. – V. 6. – № 5. – P. 1388–1401.
6. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo / G. Ordzhonikidze, L. K. Ramaiyya, E. M. Egorova [et al.] – Acta naturae – 2009. – № 3. – P. 99–101.
7. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / Sung J. H., Ji J. H., Park J. D. [et al.]. – Toxicological sciences. – 2009. – V. 108. – № 2 – P. 452–461.
8. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний і соціальний аспекти / Б. Є. Патон, В. Ф. Москаленко, І. С. Чекман, Б. О. Мовчан // Вісник Національної академії наук України. – 2009. – № 6. – С. 76–80.
9. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – К. : Задруга, 2011. – 424 с.
10. Чекман І. С. Природні наноструктури та наномеханізми / І. С. Чекман, П. В. Симонов. – К. : Задруга, 2012. – 104 с.
11. Дослідження наночастинок срібла за критеріями генотоксичності, мутагенності та впливу на штами-пробіонти шлунково-кишкового тракту людини та тварин / Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, А. О. Прискока [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 3. – С. 40–46.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів / гол. ред. О. В. Стефанов. – К. : Авіценна, 2001. – С. 59–90.
13. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
14. United States Environmental Protection Agency OPPTS 885.3200 Acute Injection Toxicity / Pathogenicity // Microbial Pesticide Test Guidelines. – 1996. – P. 1–6.
15. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice / Y. Xue, S. Zhang, Y. Huang [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2012. – V. 32, № 11. – P. 890–899.
16. Kim W. Y. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats / W. Y. Kim, J. Kim, J. D. Park // J. Toxicol. Environ. Health. A. – 2009. – V. 72, № 21–22. – P. 1279–1284.
17. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / Sung J. H., Ji J. H., Park J. D. [et al.] // Toxicological sciences. – 2009. – V. 108. – № 2 – P. 452–461.

### **А. О. Прискока**

#### **Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення**

Наночастки срібла є перспективними для впровадження як ефективного протимікробного засобу. Проте маловивченим є токсикологічний аспект. Мета дослідження – вивчення гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення. Встановлено, що дані наночастинки при введенні мишам лінії BALB/c можуть бути віднесені до III класу токсичності «Помірно токсичні сполуки». Спостереження за тваринами, а також результати розтину виявили, що дані наночастинки мають виражену подразнюючу дію за даного способу введення. Також встановлена суттєва різниця  $LD_{50}$  для самців і самок, що свідчить про статевозалежні особливості токсичної дії наночастинок срібла. Ці факти необхідно враховувати при розробці парентеральної форми введення.

*Ключові слова: наночастинки срібла, гостра токсичність, миші*

### **А. О. Прискока**

#### **Исследование острой токсичности наночастиц серебра при внутрибрюшинном введении**

Наночастицы серебра являются перспективными для внедрения как эффективного противомикробного средства. Тем не менее, малоизученным является токсикологический аспект. Цель исследования – изучение острой токсичности наночастиц серебра при внутрибрюшинном введении. Установлено, что данные наночастицы при внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c могут быть отнесены к III классу токсичности «Умеренно токсичные соединения». Наблюдение за животными, а также результаты вскрытия выявили, что данные наночастицы обладают выраженным раздражающим действием при данном способе введения. Также установлена существенная разница  $LD_{50}$

---

---

для самцов и самок, что свидетельствует о зависимости токсического действия наночастиц серебра от пола. Эти факты необходимо учитывать при разработке парентеральной формы введения.

*Ключевые слова: наночастицы серебра, острая токсичность, мыши*

**A. O. Pryskoka**

### **Acute intraperitoneal toxicity study of silver nanoparticles**

Silver nanoparticles are prospective as an effective antimicrobial agent especially in treatment of antibiotic-resistant infections. Nevertheless, the toxicological aspect remains poorly studied. The aim of current work was to study acute toxicity of silver nanoparticles in terms of continuing their pre-clinical study. In previous studies these nanoparticles were proven to be non-genotoxic *in vitro* and *in vivo*, and non-mutagenic. In current studies we used 112 BALB/c mice (56 males and 56 females). Mice of each gender was divided into 7 study groups according to level of dose and 1 control group. For statistical evaluation of results there was used Finney's probit-analysis and specialized computer program. Mice were observed in first hours after administration and for 14 next days twice a day and clinical signs of acute intoxication were noticed. All mice (both died due to intoxication and sacrificed in the end of experiment) were subjects of autopsy and significant pathologic features were noticed. Weight measuring of animals was also provided. It was established that silver nanoparticles when administered intraperitoneally to BALB/c mice have LD<sub>50</sub> of 34,53 ± 3,87 mg/kg and 22,17 ± 2,36 mg/kg for males and females respectively (Finney probit-analysis method) and could be classified as III class or moderately toxic substance. Significant differences in LD<sub>50</sub> for males and females indicate the gender-specific toxicity of silver nanoparticles. Clinical signs of acute intoxication that were noticed during observation period include depression of movement activity in first hours after injection, hyperemia of ear blood vessels, disturbances in motion. Autopsy results showed pathologic changes in liver, hyperemia of internal organs blood vessels were noticed. All this signs evidence that silver nanoparticles have a prominent irritant effect when injected intraperitoneally and may cause inflammation. These facts should be taken into an account when designing parenteral drug form.

*Key words: silver nanoparticles, acute toxicity, mice*

---

*Надійшла: 18.12.2013 р.*

**Контактна особа:** Прискока Андрій Олегович, аспірант, кафедра фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 67 247 73 58.

О. М. Пясковська, Г. В. Горбик, Ю. Р. Якшибасва,  
Н. К. Родіонова, В. Я. Момот, Г. І. Соляник

## Корекція пухлино-асоційованої анемії поліфенолами винограду

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології  
імені Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ*

*Ключові слова: пухлино-асоційована  
анемія, карцинома легені Льюїс,  
поліфеноли винограду*

Прогрес наукових знань, особливо останніми роками, показав, що розуміння механізмів неконтрольованого росту та прогресії неоплазми неможливе без вивчення та глибокого аналізу взаємодії пухлинних і нормальних клітин організму. Така взаємодія відіграє критичну роль у процесах, що зумовлюють інвазію та метастазування злоякісних пухлин. Вплив пухлини на організм призводить до значних порушень у структурі нормальних тканин, які супроводжуються системними функціональними змінами. Така дія пухлини на організм сприяє формуванню паранеопластичного синдрому (ПНС), який характеризується неметастатичними системними проявами в організмі, та супроводжує розвиток пухлинного процесу [1, 2].

ПНС опосередкований гуморальними факторами, що продукуються як пухлиною, так і ефекторними клітинами імунної системи.

Слід зазначити, що ПНС характеризується широким спектром симптомів, які ускладнюють перебіг основного захворювання, а часто навіть представляють загрозу для життя онкологічних хворих [3, 4]. Традиційно корекція проявів ПНС базується на проведенні ефективної протипухлинної терапії [5, 6]. Таку терапію, на жаль, не можна провести у випадку резистентних форм злоякісних новоутворень. Отже, для поліпшення якості життя онкологічних хворих з резистентними пухлинами необхідно шукати підходи до лікування симптомів

ПНС із використанням пухлино-неспецифічних агентів.

Найтяжчі форми ПНС, такі як порушення гемопоєзу, ураження печінки й нирок, є протипоказанням для проведення протипухлинної терапії. Яскравим прикладом такої форми ПНС є анемія, зумовлена розвитком пухлинного процесу [7, 8]. Близько 30 % первинних онкологічних хворих страждають на анемію, причому в половини з них на момент встановлення діагнозу рівень гемоглобіну є нижчим 90 г/л, що не дозволяє почати протипухлинну хіміотерапію (ХТ) і променеву терапію [9]. Для корекції паранеопластичної анемії у світі широко використовуються еритропоетини [10, 11]. На жаль, аналіз результатів їхнього клінічного застосування показав досить високий ризик стимуляції пухлинного процесу [12].

Тому пошук пухлино-неспецифічних агентів, що забезпечують корекцію паранеопластичної анемії, є актуальною проблемою сучасної експериментальної та клінічної онкології.

Сьогодні велика увага приділяється поліфенолам винограду, багато з яких проявляють широкий спектр фармакологічної активності (антиоксидантну, протизапальну, кардіопротекторну та ін.) і характеризуються досить низькою токсичністю [13, 14]. У деяких дослідженнях була показана здатність поліфенольних сполук вибірково відновлювати функціональну активність лімфоцитів і проявляти протекторну дію на еритропоез [15, 16]. Так, наприклад, резвератрол демонструє антианемічні властивості внаслідок його здатності інгібувати оксидативний стрес в еритроцитах, індукований протипухлинними агентами [17]. Раніше

нами було показано, що поліфеноли винограду проявляють здатність суттєво знижувати токсичні прояви традиційної цитотоксичної протипухлинної терапії [18, 19]. Незважаючи на достатньо велику кількість наукових публікацій стосовно протекторної дії поліфенольних сполук, майже не досліджувалась їхня здатність коригувати прояви паранеопластичного синдрому. *Мета дослідження* – вивчення впливу поліфенолів винограду на розвиток анемії, зумовленої паранеопластичним синдромом.

**Матеріали та методи.** Здатність поліфенолів винограду коригувати паранеопластичну анемію досліджували з використанням харчового концентрату «Еноант» (еноант), який розроблено Національним інститутом винограду та вина Української аграрної академії наук з сорту винограду Каберне-Совіньон у 2004 році (виробник МЧП «РЕССФУД») та рекомендовано для використання в 2010 році. Загальна концентрація поліфенолів в еноанті становить 18–20 г/дм<sup>3</sup>, серед яких кверцетин, катехін та резвератрол реєструються в достатньо високих концентраціях.

Оскільки потенційні модифікатори проявів ПНС можуть збільшувати ризик пухлинної прогресії, пошук таких агентів неможливий без використання метастатичних експериментальних пухлинних моделей з різними проявами паранеопластичної симптоматики. У своїй роботі ми використовували варіант карциноми легені Льюїс (LLC/R9), ріст якої в організмі мишей лінії C57/Bl супроводжується формуванням ПНС [20]. Симптоматика ПНС включає виражену анемію (значне зменшення змісту еритроцитів, рівня гемоглобіну й гематокриту) на тлі розвитку екстремедулярного гемопоєзу (спленомегалії, гепатомегалії) та інволюції тимуса.

Дослідження проведено на мишах самицях лінії C57Bl вагою 18–23 г, віком 2,0–2,5 міс, розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Пухлинні клітини лінії LLC/R9 культивували в

середовищі RPMI-1640 у присутності 10 % ембріональної сироватки бика, 2 мМ L-глутаміну та гентаміцину (40 мкг/мл) при +37 °С в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> та перещеплювали мишам у кількості 1·10<sup>6</sup> клітин на тварину. Після інокуляції пухлинних клітин тварин було розподілені на три групи (по 10–12 мишей у кожній). Тваринам експериментальної групи вводили еноант per os один раз на один день, п'ять разів на один тиждень, протягом трьох тижнів, починаючи з другої доби після перещеплення клітин. Сумарна доза складала 0,03 мл/г ваги тварини. Мишам контрольної групи у відповідному режимі вводили дистильовану воду. Для порівняння третій групі тварин вводили у відповідному режимі резвератрол (Sigma, США), як один з важливих поліфенольних компонентів еноанту, в сумарній дозі 0,02 мг/г ваги тварини.

Вимірювання розміру пухлини проводили кожну третю добу росту пухлин починаючи з 10 доби після її перещеплення. Для цього за допомогою штангенциркуля проводили визначення діаметра пухлини в кожній тварини, після чого вираховували об'єм пухлини за формулою:

$$V = \frac{3,14 (d)^3}{6},$$

де d – діаметр пухлини (мм).

Після закінчення терапії (21 доба росту пухлин) тварин декапітували під легким ефірним наркозом, видаляли легені, підраховували кількість метастазів та визначали їхній діаметр (з використанням біокулярного мікроскопа та міліметрової шкали), розраховували об'єм метастазів.

Аналізували гемограму та лейкограму периферичної крові, мієлограму кісткового мозку, визначали вагу та клітинність селезінки, печінки, тимуса.

Статистичний аналіз одержаних результатів дослідження проводили з використанням описативних методів, t-критерію та u-критерію.

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведеного дослідження показано, що еноант не стимулює ріст

карциноми легені Льюїс LLC/R9 (рис. 1). Більше того, на 18 добу (тобто на кінець терапії еноантом) спостерігали незначне, але статистично достовірне пригнічення росту пухлини на 20 % ( $p < 0,05$ ). Протиухлинний ефект був короткостроковий і вже через 2 доби після закінчення введення еноанту об'єми пухлин експериментальної та контрольної груп не відрізнялись. Уведення резвератролу зумовлювало наприкінці терапії тенденцію до стимуляції росту LLC/R9, яка на 21 добу носила характер статистично достовірного збільшення об'єму пухлини на 25,6 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем (показником тварин, що отримували воду).

При цьому ні еноант, ні резвератрол не впливали на метастазування експериментальної пухлини. Як видно з рисунка 2, відсутня достовірна різниця між досліджуваними групами як за кількістю легеневих метастазів, так і за їхнім об'ємом.

Терапія еноантом призводила до корекції анемії, яка виражалася в статистично достовірному підвищенні кількості еритроцитів (на 31 %,  $p < 0,05$ ), умісту гемоглобіну і гематокриту (на 54,4 % та 66,8 % відповідно;  $p < 0,01$ ) до рівня цих показників у інтактних тварин (табл. 1). Аналіз показників периферичної крові мишей з LLC/R9 після введення резвератролу показав, що здатність еноанту коригувати паранеопластичну анемію лише частково зумовлена присутністю в цьому концентраті резвератролу. Після терапії резвератролом спостерігалася лише

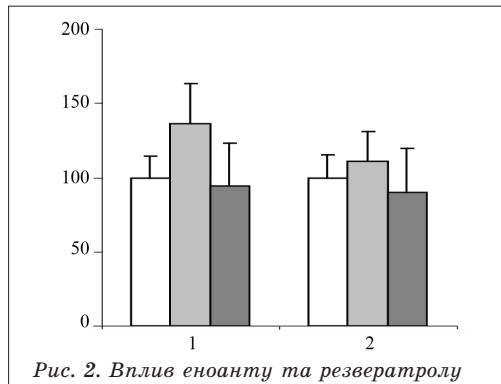


Рис. 2. Вплив еноанту та резвератролу на кількість легеневих метастазів (1) та об'єм метастатичного ураження легені (2).

Дані представлені у відсотках до відповідних показників мишей контрольної групи.

Позначення такі самі, як на рисунку 1.

тенденція до збільшення кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, а підвищення рівня гематокриту (на 40 %,  $p < 0,05$ ) було статистично достовірним.

Одним з проявів паранеопластичного синдрому в мишей з LLC/R9 є зниження кількості тромбоцитів на 48 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з відповідним показником інтактних тварин (табл. 1). Уведення еноанту призводило до підвищення кількості тромбоцитів більш ніж на 116 % ( $p < 0,001$ ). Скоріш за все така властивість еноанту зумовлена наявністю в його складі саме резвератролу, тому що введення лише його самого призводило до підвищення рівня тромбоцитів на 151 % ( $p < 0,001$ ).

На відміну від значного впливу еноанту (та до деякої міри й резвератролу)

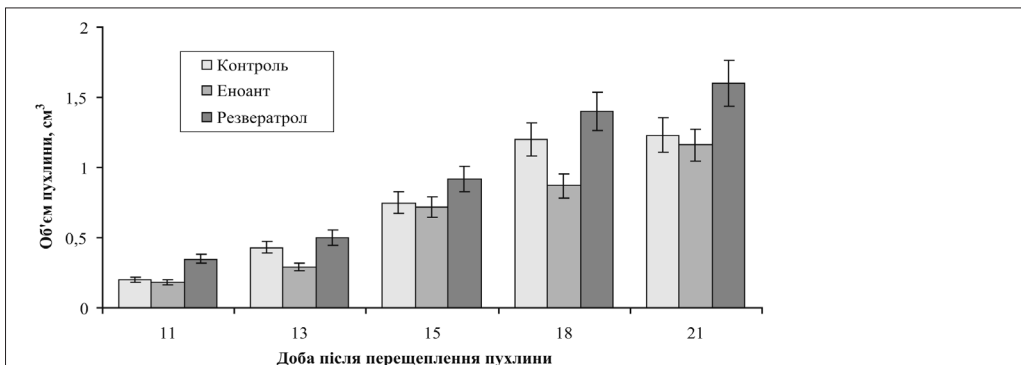


Рис. 1. Вплив еноанту та резвератролу на кінетику росту LLC/R9

Примітка. \*Достовірно до показника контролю.

**Вплив еноанту та резвератролу на показники периферичної крові мишей з LLC/R9**

Показник гемограми	Група тварин			
	Інтактні миші	Миші з LLC/R9, яким вводили:		
		воду	еноант	резвератрол
RBC · 10 <sup>6</sup> /мкл	10,3 ± 0,2	6,8 ± 0,8 <sup>#</sup>	8,9 ± 0,4 <sup>*</sup>	7,2 ± 0,95
Hgb, г/дл	13,3 ± 0,3	7,9 ± 1,1 <sup>#</sup>	12,2 ± 0,7 <sup>*</sup>	110 ± 0,9
Ht, %	43,7 ± 1,2	23,5 ± 2,7 <sup>#</sup>	39,2 ± 1,5 <sup>*</sup>	32,8 ± 2,1 <sup>*</sup>
MCV, фл	42,1 ± 0,9	41,90 ± 0,3	44,1 ± 2,4	45,8 ± 2,9
MCH, пг	12,8 ± 0,2	13,92 ± 0,2	14,5 ± 0,7	15,3 ± 0,7
MCHC, г/дл	30,5 ± 0,3	33,20 ± 0,8	32,9 ± 0,5	33,4 ± 0,6
RDW, %	17,9 ± 0,6	26,77 ± 1,10 <sup>#</sup>	19,6 ± 1,6 <sup>*</sup>	24,6 ± 2,9
PLT, ·1000/мкл	198,3 ± 28,4	102,0 ± 22,5 <sup>#</sup>	219,6 ± 15,2 <sup>*</sup>	256,0 ± 44,0 <sup>*</sup>

Примітка. 1) RBC – кількість еритроцитів, Hgb – уміст гемоглобіну, Ht – гематокрит, MCV – об'єм еритроциту, MCH – уміст гемоглобіну в еритроцитах, MCHC – концентрація гемоглобіну в еритроцитах, RDW – ширина розподілу еритроцитів, PLT – кількість тромбоцитів. 2) Тут і в табл. 2–4: <sup>#</sup>достоєрно до показників інтактних мишей, <sup>\*</sup>достоєрно до показників тварин з пухлинами, що отримували воду.

Таблиця 2

**Вплив еноанту та резвератролу на лейкограму мишей з LLC/R9**

Показник лейкограми (абсолютна кількість, · 1000/мкл)	Група тварин			
	Інтактні миші	Миші з LLC/R9, яким вводили:		
		воду	еноант	резвератрол
WBC	6,8 ± 0,6	11,2 ± 1,0 <sup>#</sup>	10,3 ± 0,5	12,1 ± 2,7
LY	5,4 ± 0,5	8,2 ± 0,9 <sup>#</sup>	7,6 ± 0,4	8,06 ± 1,60
Mo	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1 <sup>#</sup>	1,3 ± 0,3	1,00 ± 0,05 <sup>*</sup>
Gr	0,60 ± 0,01	1,5 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,1 ± 0,2	3,1 ± 1,1

Примітка. WBC – загальна кількість лейкоцитів, LY – лімфоцити, Mo – моноцити, Gr – гранулоцити.

на червоний ристок крові не виявлено суттєвого впливу цих поліфенольних агентів на білий ристок крові.

Як видно з таблиці 2, терапія еноантом та резвератролом не впливає на виражений лейкоцитоз у тварин з пухлинами. Слід зауважити, що при аналізі даних кістковомозкового кровотворення на 21 добу росту пухлин статистично достовірних відмінностей відносного вмісту клітин окремих рядів кровотворення між контрольними тваринами та мишами, що отримували еноант, не виявлено, що в значній мірі обумовлено суттєвою індивідуальною варіабельністю показників (табл. 3).

Між тим виявлено збільшення загальної кількості мієлокаріоцитів на 32 % ( $p < 0,001$ ) після введення еноанту (табл. 4), що вказує на існування

позитивного впливу еноанту на кістковомозкове кровотворення, яке передує корекції показників периферичної крові наприкінці терапії. Одним з механізмів корекції анемії еноантом може бути зниження цитотоксичного впливу пухлини LLC/R9 на систему кровотворення за рахунок його антиоксидантних властивостей [21].

Частково такий висновок підтверджується результатами аналізу впливу еноанту на вагу та клітинність селезінки. Препарат (на відміну від резвератролу) статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) знижує як вагу (на 43 %), так і клітинність (41 %) селезінки, зумовлюючи нормалізацію цих показників до рівня інтактного контролю (рис. 3).

Слід зауважити, що еноант позитивно впливає на такі прояви ПНС, як гепатомегалія та інволюція тимуса. Як

Показники кісткового мозку мишей з LLC/R9 за впливу еноанту

Показник мієлограми	Інтактні миші	Миші з пухлинами, які отримували:	
		воду	еноант
Недиференційовані бласти (%)	0,83 ± 0,17	0,80 ± 0,35	1,30 ± 0,48
Нейтрофільні (%): мієлобласти	0,83 ± 0,44	2,40 ± 0,90	1,30 ± 0,58
промієлоцити	2,00 ± 0,76	5,60 ± 0,58 <sup>#</sup>	5,52 ± 1,35
мієлоцити	4,50 ± 1,61	11,80 ± 2,11 <sup>#</sup>	10,50 ± 3,36
метамієлоцити	7,33 ± 1,92	9,80 ± 2,31	6,83 ± 1,55
паличкоядерні	19,67 ± 3,17	12,50 ± 3,10	9,80 ± 4,33
сегментоядерні	23,00 ± 1,61	6,33 ± 0,33 <sup>#</sup>	5,20 ± 1,25
Еозинофільні (%): про- та мієлоцити	0,50 ± 0,29	0,70 ± 0,19	1,00 ± 0,38
метамієлоцити	0,33 ± 0,33	1,80 ± 0,58	1,50 ± 0,48
паличко- та сегментоядерні	0,50 ± 0,29	1,90 ± 1,1	1,80 ± 0,67
Усі гранулоцити ( %), у тому числі:	62,33 ± 8,90	46,90 ± 2,11 <sup>#</sup>	48,10 ± 3,36
диференціюючі, %	18,50 ± 6,66	31,70 ± 4,52 <sup>#</sup>	32,20 ± 4,52
зрілі, %	43,83 ± 2,24	15,20 ± 1,92 <sup>#</sup>	16,10 ± 3,27
Усі еритроїдні (%), у тому числі:	26,83 ± 7,51	31,10 ± 5,70	35,60 ± 5,48
еритробласти	0,67 ± 0,17	0,71 ± 0,50	0,80 ± 0,56
пронормобласти	3,50 ± 1,26	0,94 ± 0,36 <sup>#</sup>	1,20 ± 0,86
нормобласти базофільні	3,50 ± 1,04	6,60 ± 1,73	4,30 ± 0,96
нормобласти поліхроматофільні	7,50 ± 2,75	14,20 ± 2,90 <sup>#</sup>	16,70 ± 3,36
нормобласти оксифільні	10,83 ± 3,37	8,70 ± 2,10	12,60 ± 4,13
Мієло-еритроїдне співвідношення	3,47 ± 1,10	1,22 ± 0,22 <sup>#</sup>	2,58 ± 0,94
Лімфоцити, %	8,00 ± 1,00	14,60 ± 5,20	9,60 ± 2,59
Мегакаріобласти, -цити (%)	0,33 ± 0,17	0,60 ± 0,29	0,50 ± 0,01
Загальний мітотичний індекс (MI) (‰)	5,67 ± 1,20	11,40 ± 2,80 <sup>#</sup>	13,67 ± 2,41
MI червоного ряду (‰)	1,67 ± 1,20	7,50 ± 2,60 <sup>#</sup>	9,33 ± 1,72
MI білого ряду (‰)	4,00 ± 0,58	3,60 ± 0,77	4,67 ± 1,03

видно на рисунку 4, введення еноанту мишам з LLC/R9 обумовлює тенденцію до нормалізації ваги та клітинності

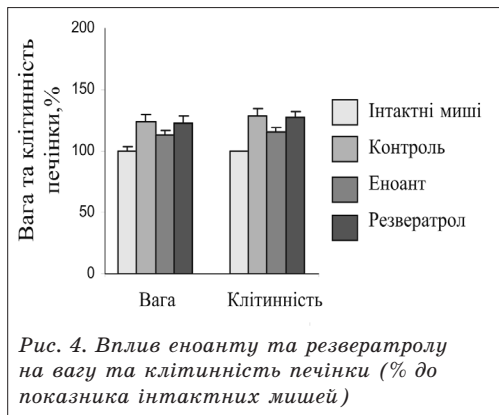
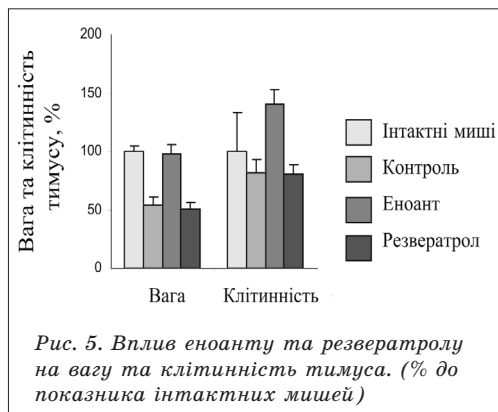
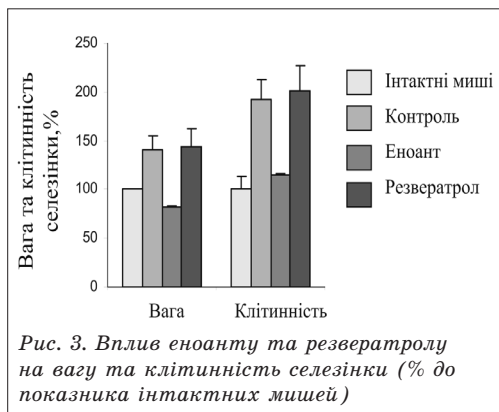
Таблиця 4

Вплив еноанту на клітинність кісткового мозку мишей з LLC/R9

Група тварин		Кількість мієлокаріоцитів ( $\bullet 10^6$ /кістку)
Інтактні миші		19,6 ± 0,4
Миші з LLC/R9	Контроль	9,4 ± 0,4 <sup>#</sup>
	Еноант	12,4 ± 1,2 <sup>*</sup>

печінки, при цьому зменшення клітинності цього органа (на 10 %) порівняно з відповідним показником у мишей без терапії еноантом статистично достовірне ( $p < 0,05$ ).

Більш виражений вплив еноант проявляє на вагу та клітинність тимуса. Ріст та метастазування карциноми легені Льюїс обумовлює значну інволюцію тимуса (рис. 5). Введення еноанту статистично достовірно збільшує вагу та клітинність цього органу на 45 % та 60 % ( $p < 0,05$ ) відповідно в порівнянні з показниками мишей без терапії еноантом.



гематологічну симптоматику ПНС супроводжувалася також нормалізацією ваги та клітинності селезінки, печінки та тимуса. Отримані результати вказують на перспективність застосування поліфенолів винограду для корекції проявів ПНС.

### Висновки

1. Еноант – харчовий концентрат поліфенолів винограду за умов перорального курсового введення мишам протягом 3 тижнів проявляв здатність до корекції паранеопластичної анемії та тромбоцитопенії: підвищувалася кількість еритроцитів, тромбоцитів та рівень гемоглобіну в крові тварин з перещепленим варіантом карциноми легені Льюїс LLC/R9.

2. Резвератрол (курсове введення мишам протягом 3 тижнів) не впливав на еритропоез, однак достовірно підвищував кількість тромбоцитів у периферичній крові тварин з пухлиною.

3. Позитивний вплив еноанту на гематологічну симптоматику ПНС у мишей супроводжувався нормалізацією ваги та клітинності селезінки, печінки та тимуса.

4. На фоні корекції проявів паранеопластичного синдрому еноант не стимулював ріст та метастазування злоякісної пухлини.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження показали, що застосування поліфенолів винограду позитивно впливає на еритроцитарну ланку периферичної крові, зумовлює корекцію анемії, асоційованої з ростом та метастазуванням карциноми легені Льюїс LLC/R9. Після введення еноанту кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну хоча й були трохи нижчими, ніж в інтактному контролі, але вірогідно перевищували показники мишей, які не отримували препарат. Уведення еноанту призводило також до корекції тромбоцитопенії (яка формувалася в мишей у процесі росту карциноми LLC/R9), рестрували суттєве підвищення вмісту тромбоцитів до рівня інтактного контролю. Здатність еноанту позитивно впливати на

1. Finora K. Common paraneoplastic syndromes / K. Finora // Clin. Tech. Small Anim. Pract. – 2003 – V. 18, № 2 – P. 123–126.
2. Paraneoplastic symptoms: Cachexia, polycythemia, and hypercalcemia are, respectively, related to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in renal clear cell carcinoma / G. X. Ding, C. C. Feng, N. H. Song [et al.] // Urol. Oncol. – 2013 – V. 31, № 8. – P. 1820–1825.
3. Mechanisms of paraneoplastic syndromes in mice bearing a spontaneous lung adenocarcinoma / M. Parma, M. Diament, K. Garcia [et.al.] // Tumour Biol. – 1999 – V. 20, № 6. – P. 304–311.



4. *Tarin D.* Update on clinical and mechanistic aspects of paraneoplastic syndromes. / D. Tarin // *Cancer Metastasis Rev.* – 2013 – V. 20.
5. *Thomas L.* Management of paraneoplastic syndromes in lung cancer / L. Thomas, Y. Kwok, M. J. Edelman // *Curr. Treat. Options Oncol.* – 2004. V. 5, № 1. – P. 51–62.
6. *Rosenfeld M. R.* Diagnosis and Management of Paraneoplastic Neurologic Disorders / M. R. Rosenfeld, J. Dalmau // *Curr. Treat. Options Oncol.* – 2013. – V. 31.
7. *Puthenparambil J.* Autoimmune hemolytic anemia as a paraneoplastic phenomenon in solid tumors: A critical analysis of 52 cases reported in the literature / J. Puthenparambil, K. Lechner, G. Kornek. // *Wien Klin Wochenschr.* – 2010. – V. 122, № (7–8). – P. 229–236.
8. *Cella D.* Factors influencing quality of life in cancer patients: anemia and fatigue / D. Cella // *Seminars in Oncology.* – 1998. – V. 25. – P. 43–46.
9. *Schwartz R. N.* Anemia in patients with cancer: incidence, causes, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols / R. N. Schwartz // *Am. J. Health Syst. Pharm.* – 2007. – V. 64. – S. 5–S. 13.
10. *Glaspay J. A.* Erythropoiesis-stimulating agents in oncology / J. A. Glaspay // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2008. – № 6. – P. 565–575.
11. Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer / M. Aapro, W. Jelkmann, S. N. Constantinescu [et al.] // *Br. J. Cancer.* doi:10.1038/bjc.2012-42.
12. *Henke M.* Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? / M. Henke, D. Mattern, M. J. Pepe // *Clin Oncol.* – 2006 – V. 24. – P. 4708–4713.
13. *Curin Y.* Polyphenols as potential therapeutic agents against cardiovascular diseases / Y. Curin, R. Andriantsitohaina // *Pharmacological Reports.* – 2005. – V. 57. – P. 97–107.
14. *Brisdelli F.* Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties / F. Brisdelli, G. D'Andrea, A. Bozzi // *Curr. Drug Metab.* – 2009. – № 1. – P. 530–546.
15. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis / G. Sen, S. Mandal, Roy S. Saha [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 38. – P. 1257–1264.
16. Resveratrol Reduces Radiation-Induced Chromosome Aberration Frequencies in Mouse Bone Marrow Cells / R. E. Carstena, A. M. Bachand, S. M. Baileya, R. L. Ullricha // *Radiat. Res.* – 2008. – V. 169. – P. 633–638.
17. *Mikstacka R.* Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro / R. Mikstacka, A. M. Rimando, E. Ignatowicz // *Plant. Foods Hum. Nutr.* – 2010. – V. 65. – P. 57–63.
18. Коррекция токсических проявлений цисплатина полифенолами винограда / Г. И. Соляник, О. Н. Пясковская, И. Н. Тодор, О. И. Дасюкевич // *Онкология.* – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 222–224.
19. Correction of the cancer therapy-induced anemia by the grape polyphenol concentrate Enoant / G. Solyanik, V. Misin, O. Pyaskovskaya [et al.] // *Advanced bioactive compounds countering the effects of radiological, chemical and biological agents. Strategies to counter biological damage, Series: NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology.* // Pierce G. N.; Mizin V. I.; Omelchenko A. (Eds.). – 2013. – P. 43–54.
20. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: relations with tumor derived VEGF / Fedorchuk O. G., Pyaskovskaya O. M., Skivka L. M. [et al.] // *Cytokine.* – 2012. – V. 57, № 1. – P. 81–88.
21. *Keser S.* Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis inifera* L.) and grape products / S. Keser, S. Celik, S. Turkoglu // *J. Food Sci. Nutr.* – 2013. – V. 64, № 2. – P. 210–216.

**О. Н. Пясковская, Г. В. Горбик, Ю. Р. Якшибаева, Н. К. Родионова,  
В. Я. Момот, Г. И. Соляник**

### **Коррекция опухоль-ассоциированной анемии полифенолами винограда**

В статье представлены результаты исследования влияния полифенолов винограда на развитие паранеопластического синдрома у мышей с ангиогенным вариантом карциномы легкого Льюиса LLC/R9. Как источник полифенолов винограда использовали пищевой концентрат «Эноант», в котором суммарная концентрация полифенолов составляет 18–20 г/дм<sup>3</sup>, а также резвератрол. Показано, что пероральное введение «Эноанта» приводит к коррекции паранеопластической анемии и тромбоцитопении, вызывает увеличение количества эритроцитов и тромбоцитов, а также повышение уровня гемоглобина в крови мышей с LLC/R9. Позитивное влияние эноанта на гематологическую симптоматику паранеопластического синдрома сопровождалось также нормализацией веса и клеточности селезенки, печени и тимуса. В отличие от эноанта введение резвератрола не влияло на показатели эритропоза, однако приводило к нормализации количества тромбоцитов в периферической крови мышей с опухолью.

*Ключевые слова:* опухоль-ассоциированная анемия, карцинома легкого Льюиса, полифенолы винограда

---

**O. N. Pyaskovskaya, G. V. Gorbik, Yu. R. Yakshibaeva, N. K. Rodionova, V. Y. Momot, G. I. Solyanik**

**Correction of cancer-associated anemia by grape polyphenols**

It is known that growing neoplasm exerts an influence on distant organs, which it has not invaded or colonized. Such systemic effects cause the serious signs and symptoms, collectively described as paraneoplastic syndrome (PNS). A broad spectrum of symptomatic manifestations of PNS (including anemia) may pose the most troublesome and threatening clinical problems for cancer patients. Treatments of paraneoplastic conditions (by tumor-specific and/or non-specific agents) can, therefore, contribute to an improved quality of life, and in some cases, prolong life. That's why the development of corresponding therapy is an actual problem of experimental and clinical oncology. The aim of the work was to study the ability of grape polyphenols to correct paraneoplastic anemia in mice with transplanted angiogenic variant of Lewis lung carcinoma LLC/R9. Grape polyphenol concentrate «Enoant» (18–20 g/dm<sup>3</sup> of polyphenols) and resveratrol were used for management of paraneoplastic anemia. Enoant and resveratrol was administered per os daily during 3 weeks starting from 2<sup>nd</sup> day after tumor cell inoculation in total dose 0,03 ml/g and 0,02 mg/g of body weight, respectively. Control mice were administrated with distilled water. The volume of primary tumor as well as total volume of lung metastases and the number of metastatic nodules were estimated. Hematological and bone marrow indices, weight and cellular content of spleen, liver, and thymus of tumor bearing mice were analyzed. It was revealed that Enoant didn't stimulate LLC/R9 growth and metastasis. Moreover Enoant treatment resulted in significant increase of erythrocyte count by 31% ( $p < 0,05$ ), haemoglobin content and hematocrit by 54,4 % and 66,8 %, correspondently ( $p < 0,01$ ), and platelet number by 116 % ( $p < 0,001$ ) as compared to corresponding indices of control animals. Total content of myelokaryocytes in Enoant treated tumor bearing mice was by 32 % ( $p < 0,001$ ) higher than that in control mice. It indicated that treatment with Enoant had a positive effect upon bone marrow hematopoiesis in tumor bearing mice. Besides Enoant treatment caused significant decrease the weight and cellular content of spleen and liver by approximately 42 % and 10 % correspondently, and considerable increase the weight and cellular content of thymus by 60 % ( $p < 0,05$ ) in LLC/R9 bearing mice treated with Enoant as compared to control mice. Treatment of LLC/R9 bearing mice with resveratrol didn't affect anemia indices but resulted in significant elevation of platelet number up to that of control animals. The data obtained support that grape polyphenols are promising agents for correction of paraneoplastic anemia.

*Key words: cancer-associated anemia, Lewis lung carcinoma, grape polyphenols*

---

*Надійшла: 07.02.2014 р.*

**Контактна особа:** Горбик Григорій Васильович, молодший науковий співробітник, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, буд. 45, вул. Васильківська, м. Київ, 03022. Тел.: + 38 0 44 256 94 17. Електронна пошта: grigor.72@mail.ru

С. В. Пакришень, О. М. Килимник

## Морфо-функціональний стан скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів при доксорубіциновій кардіоміопатії та можливі шляхи її фармакологічної корекції

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

**Ключові слова:** кардіотоксичність, ультраструктура, доксорубіцин, амлодипін, димеодипін

Частота розвитку пошкоджень серця при лікуванні антрациклінами (доксорубіцином, даунорубіцином, епірубіцином та ін.) становить 5–60 %. Кардіотоксичність цих препаратів є причиною зниження якості життя та передчасної смерті онкологічних хворих [1].

Натепер висунуто декілька гіпотез щодо вибіркової токсичності антрациклінових антибіотиків, серед яких надмірна генерація вільних радикалів, здатних викликати перекисне окиснення ліпідів і пошкодження внутрішньоклітинних мембран; взаємодія з актинміозиною скоротливою системою; порушення внутрішньоклітинного гомеостазу  $Ca^{2+}$  [2–4]. Зокрема, виявлене під впливом доксорубіцину збільшення концентрації кальцію в цитоплазмі може викликати переваженню клітини цими іонами, спричинити активацію фосфоліпази, посилити процеси перекисного окиснення і призвести до незворотних змін цитомембран [5–7]. За таких умов може бути перспективним застосування антагоністів кальцію.

**Мета дослідження** – вивчення можливого коригуючого впливу антагоністів кальцію – амлодипіну та димеодипіну – на ультраструктурний стан скоротливої системи міокарда лівого шлуночка щурів за умов доксорубіцинової кардіоміопатії.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведено на 74 білих нелінійних статевозрілих щурах обох статей масою 140–270 г, у яких шляхом чотириразо-

вого (з інтервалом 1 тижд.) внутрішньоочеревинного введення розчину доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг маси тіла моделювали антрациклінову кардіоміопатію.

Блокаторами каналів  $Ca^{2+}$  у нашому дослідженні були димеодипін – новий оригінальний фторвмісний засіб, доклінічні дослідження якого були проведені у відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» [8], та амлодипін як референтний препарат.

Піддослідні тварини були розподілені на чотири групи. Щурам першої групи ( $n = 34$ ) вводили доксорубіцин. Тваринам другої ( $n = 20$ ) та третьої ( $n = 20$ ) груп від дня третьої ін'єкції доксорубіцину щоденно *per os* вводили амлодипін і димеодипін відповідно в дозі 1,5 мг/кг упродовж 28 днів. Через 14 днів після останнього введення препаратів проводили евтаназію піддослідних тварин, які вижили (перша група – 14; друга – 17; третя – 7), шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Четверту групу становили 6 інтактних щурів.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [9] та Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин [10].

Для електронномікроскопічного аналізу фрагменти міокарда лівого шлуночка фіксували в 4 % розчині параформальдегіду, дофіксували 1 % розчином  $OsO_4$ , контрастували 2 % ураніл-ацетатом, зневоднення проводили за загальноприйнятою методикою та поміщали в суміш епону з аралдитом. Ультратонкі зрізи отримували на ультратомі

ЛКВПШ, контрастували розчином уранілацетату та цитрату свинцю та досліджували в електронному мікроскопі JEM-1010. Мікрофотографії отримували з використанням цифрової фотокамери LeicaDFC 320 і комп'ютерної програми LeicaQWin.

Для кількісної оцінки стану скоротливого апарату кардіоміоцитів визначали об'ємну щільність міофібрил, площу зрізу мітохондрій, їхню кількісну та об'ємну щільність.

При статистичному аналізі отриманих даних було використано дискриптивну статистику; порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерію Стюдента) при нормальному розподілі показників, що виражені в інтервальній шкалі. Відповідність закону нормального розподілу ознак перевіряли за допомогою метода Шапіро-Уїлка. В інших випадках використовували непараметричний метод (U-критерій Манна-Уїтні, Колмогорова-Смірнова). Усі дані представлено у вигляді середнього  $\pm$  похибка середнього значення. Різниця визнавалася значущою при  $p < 0,05$  [11]. Усі розрахунки здійснено в програмі SPSS 13.0 for Windows.

**Результати та їх обговорення.** За даними електронної мікроскопії в міо-

карді щурів на 14 добу після останньої ін'єкції доксорубіцину переважають скоротливі кардіоміоцити (КМЦ) з важкими ознаками альтерації і міститься незначна кількість непошкоджених КМЦ. У частини кардіоміоцитів визначаються виражені некробіотичні зміни з деструкцією міофіламентів, руйнуванням мітохондрій, деформацією ядер, порушенням цілісності сарколеми з виходом органел за межі клітини (рис. 1). Часто трапляються різнонаправлені міофібрили, що перетинаються між собою (рис. 2). У порівнянні з групою інтактних тварин у саркомерах спостерігається фрагментація Z-ліній зі зміщенням телофрагм одна відносно одної, визначаються ознаки лізису I-смуг та локальні просвітлення цитозолю.

У тварин першої групи в робочому міокарді виявляються ділянки з повною втратою поперечної посмугованості. Контрактурно змінені КМЦ демонструють глибокі структурні зміни: відмічаються смуги перескорочення біля M- та Z-ліній, висота саркомерів зменшується, зникають H-зони, подекуди відмічається відрив телофрагми від сарколеми, навколо Z-ліній містяться вакуолі. У деяких ділянках міокарда надлишкове скорочення міофібрил призводить до різкого звуження Z-ліній, A- та I-диски не розрізняються (рис. 3).

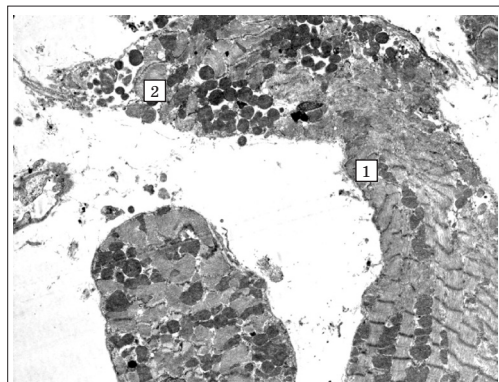


Рис. 1. Фрагмент міокарда лівого шлуночка серця щура через 14 днів після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Стоншені, неправильної форми кардіоміоцити (1).

Ділянки лізису саркоплазми з виходом органел в інтерстиційний простір (2).

Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 7500$ .

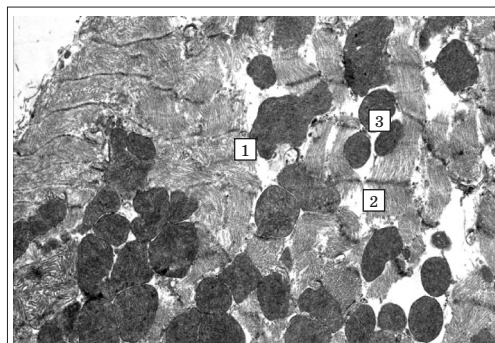


Рис. 2. Фрагмент кардіоміоцита лівого шлуночка щура на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Ділянки неупорядковано розташованих міофібрил із зміщенням Z-ліній в саркомерах (1) та лізису міофібрил (2). Мітохондрії з електронно-щільним матриксом та поодинокими кристами (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 19\ 500$ .

Ядра КМЦ щурів першої групи зміщені в субсарколемальну зону, вирізняються поліморфізмом, мають значну кількість інвагінацій нуклеолеми, подекуди фрагментовані, містять зменшену кількість еухроматину.

У саркоплазмі трапляється значна кількість крапель ліпідів та зменшується порівняно з інтактними тваринами вміст гранул глікогену. Елементи саркоплазматичної системи різко розширені, в її трубочках і цистернах накопичується гомогенна, середньої електронної щільності речовина. Ці зміни саркоплазматичної сітки, яка акумулює  $Ca^{2+}$ , можуть зумовлювати порушення функцій міофібрил і мітохондрій. У клітинах з вираженими змінами філаментів відмічається значна кількість рибосом і полісом, вакуолізація та розпад мембран саркомерулярних структур, а Т-трубочки глибоко проникають у саркоплазму.

Матрикс мітохондрій ущільнений, кількість крист значно зменшена, вони майже не диференціюються, у деяких органелах виявляються лише поодинокі фрагменти двоконтурних крист.

На 14 добу після формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії порушується розташування десмосом та щільних з'єднань, що позначається на стані вставних дисків, до яких кри-

пляться міофібрили. У частині КМЦ спостерігаються розширення нексусів, в інших – десмосоми зближуються, утворюючи скупчення, а щільні контакти часто розширені, унаслідок чого формуються проміжки між сусідніми цитомембранами (рис. 4).

Таким чином, зумовлена доксорубіцином підвищена концентрація іонів кальцію в КМЦ призводить до низки структурно-функціональних змін їхньої скоротливої системи та процесів енергозабезпечення.

Ультраструктурні зміни КМЦ щурів при застосуванні блокаторів каналів  $Ca^{2+}$  амлодипіну та димедипіну на тлі доксорубіцинової кардіоміопатії були подібними. Загалом антагоністи іонів кальцію приводили до зниження альтеративних проявів, спричинених доксорубіцином. Частково нормалізувався стан міофібрил, були відсутні патологічні зміни в саркоплазматичному ретикулумі та системі Т-трубочок, що вказує на покращання кальцієвого обміну та скоротливої функції міокарда. Частка зменшених у довжині саркомерів була незначною, сарколема та вставні диски мали невиразні зміни, а розташування Z- та M-ліній не відрізнялося від таких у інтактних тварин (рис. 5). Ядра, звичайні за розмірами, містять більше активного еухроматину

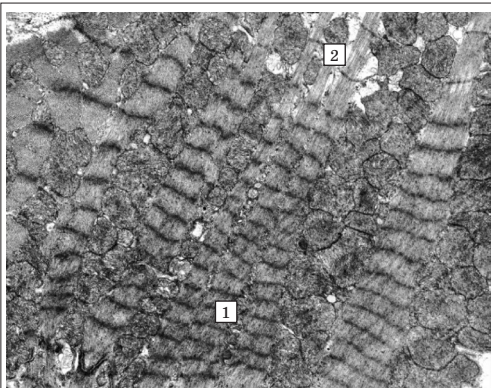


Рис. 3. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура через 14 днів після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Контрактурні зміни: висота саркомерів значно зменшена, відсутня світла зона в дисках (1), наявні ділянки лізису міофібрил (2). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 7500$ .

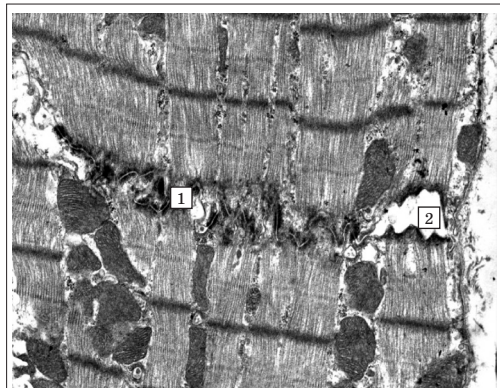


Рис. 4. Фрагмент кардіоміоцита лівого шлуночка щура на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Десмосомальні контакти (1). Розходження щільних контактів (2). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 18\ 000$ .

(рис. 6). Уміст глікогенових гранул був суттєво вищим, ніж у КМЦ тварин першої групи, хоча й дещо нижчим від кількості глікогену в міокарді інтактних тварин.

Водночас поряд із слабо зміненими КМЦ виявлялися й стоншені та контрактурно змінені серцеві м'язові волокна, у яких зберігалися досить значні за розмірами ділянки лізису міофібрил, а також осередки їхнього розщеплення і розволокнення на більш тонкі пучки (рис. 7). Спостерігалася деформація Z-ліній та їхня фрагментація. Уміст органел біосинтетичного плану (рибосоми, комплекс Гольджі, полісоми) у локусах ушкоджених міофібрил підвищений.

Мітохондрії з вираженою гомогенізацією матриксу, тотальною фрагментацією та лізисом крист спостерігаються рідко. У деяких КМЦ виявляються значні скупчення мітохондрій у приядерній зоні та під сарколемою. Більшість мітохондрій – овальної форми, спостерігаються мітохондрії неправильної форми, різні за розмірами, зовнішні мембрани поодиноких органел з дрібними вогнищами пошкодженнями та незначною покрученістю контурів. Відзначається різноманітність розташування та кіль-

кості крист: у частини мітохондрій вони добре диференціюються, паралельно розташовані, проміжки між ними не збільшені (рис. 5, 7), у частини мітохондрій кристи розташовані дугоподібно, лише в деяких мітохондріях визначаються ділянки руйнування крист (рис. 8). Більшу частину об'єму займає матрикс помірної електронної щільності, у деяких мітохондріях матрикс просвітлений.

Відновлення структури та функції мітохондрій за рахунок гіпертрофії та гіперплазії створює умови для зменшення гіпоксичного пошкодження кардіоміоцитів.

Отже, у нашому дослідженні встановлено, що зумовлена амлодипіном і димедипіном нормалізація вмісту іонів кальцію призводить до часткового відновлення ультраструктури КМЦ щурів на тлі кардіоміопатії доксорубіцинового генезу.

При аналізі морфометричних показників стану ультраструктур КМЦ у щурів першої групи, дослідження яких проводилося на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії, відмічається достовірне зменшення всіх досліджуваних показників порівняно з такими в інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ),

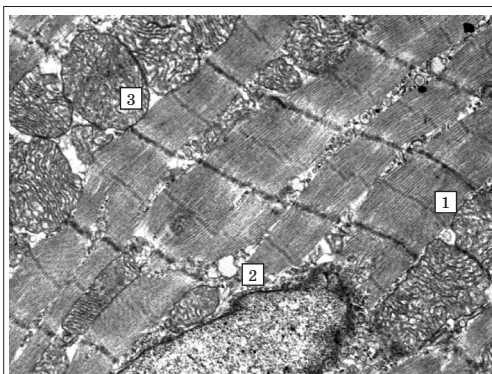


Рис. 5. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Паралельне розташування міофібрил, чіткість M- та Z-ліній (1). Незначне розширення каналців саркоплазматичної сітки (2). Матрикс мітохондрій середньої електронної щільності, кристи мітохондрій диференціюються (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 24\ 000$ .

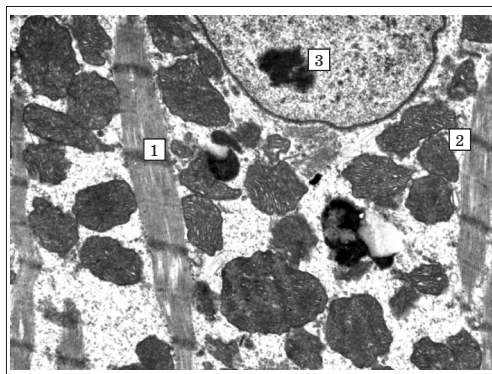


Рис. 6. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні димедипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Z-лінії чіткі, довжина саркомерів однакова (1), більшість мітохондрій з чіткими зовнішніми мембранами, кристи виражені (2), ядро з рівномірно розподіленим хроматином і ядерцем (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 12\ 000$ .

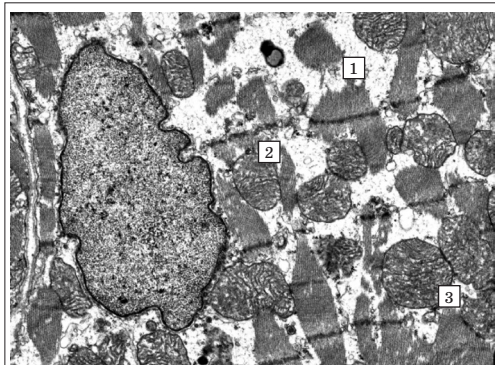


Рис. 7. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Ділянки міоцитолізу з розволокненням та деструкцією міофібрил (1), розриви Z-ліній (2), мітохондрії з матриксом помірної електронної щільності (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 16\ 000$ .

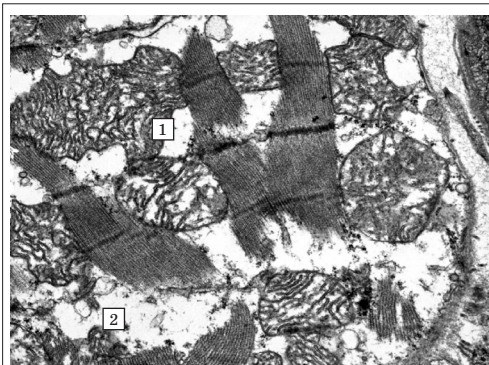


Рис. 8. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Мітохондрії з нерівномірно розширеним простором між кристами внаслідок локального лізису матриксу та крист (1). Канальці саркоплазматичної сітки (2). Електронно-мікроскопічне фото. Зб.  $\times 22\ 500$ .

що є відображенням виражених альтеративних змін міокарда, спричинених доксорубіцином (таблиця).

Унаслідок того, що зменшення об'ємів, які займають в КМЦ мітохондрії, відбувається більшою мірою, ніж зменшення об'єму міофібрил, показник співвідношення об'ємів цих структур у щурів першої групи достовірно менше, ніж у інтактних тварин: 1: 0,86

(у інтактних – 1: 0,9). Тобто, крім загального зменшення представництва скоротливого та енергетичного апаратів, знижується і насиченість КМЦ мітохондріями на одиницю об'єму міофібрил.

Після введення амлодипіну більшість морфометричних показників достовірно не відрізняються ( $p \geq 0,05$ ) від інтактних тварин. Виняток становили

Таблиця

**Морфометричні показники ультраструктур кардіоміоцитів підслідних щурів,  $M \pm t$**

Група тварин / Показник	Інтактні тварини (n = 6)	Доксорубіцин (n = 14)	Амлодипін (n = 7)	Димеодипін (n = 6)
Об'ємна щільність міофібрил, %	34,20 $\pm$ 1,94	24,06 $\pm$ 1,14*	32,10 $\pm$ 1,21**/**	32,02 $\pm$ 1,34**/**
Площа зрізу мітохондрій, $10^{-2}/\text{мкм}^2$	41,70 $\pm$ 2,06	35,10 $\pm$ 1,51*	40,10 $\pm$ 1,61**	39,90 $\pm$ 1,08**
Кількісна щільність мітохондрій, $10^{-2}/\text{мкм}^3$	51,50 $\pm$ 3,29	41,30 $\pm$ 2,75*	48,2 $\pm$ 2,3**	47,20 $\pm$ 2,18
Об'ємна щільність мітохондрій, %	30,6 $\pm$ 2,9	21,1 $\pm$ 1,6*	28,2 $\pm$ 1,4**/**	28,3 $\pm$ 2,1**/**
Об'ємне мітох.-міофіб. відношення, у.о.	0,90	0,86	0,88	0,88

Примітка. \*Достовірно відносно групи інтактних щурів ( $p \leq 0,05$ ), \*\*достовірно відносно групи контрольних щурів ( $p \leq 0,05$ ).

показники об'ємної щільності МТ і МФ (14 доба спостережень) та кількісна щільність МТ. На 14 добу при застосуванні амлодипіну всі морфометричні показники МТ та МФ достовірно відрізняються ( $p \leq 0,05$ ) від таких у контрольних тварин на 14 добу дослідження, що пояснюється ослабленням деструктивних процесів, частковим відновленням скоротливого та енергетичного апарату кардіоміоцитів.

При застосуванні димедипіну зміни морфометричних показників мають таку саму спрямованість та близькі за значеннями, як і при застосуванні амлодипіну ( $p \leq 0,05$ ). При порівнянні показників об'ємної щільності МТ та МФ з показниками інтактних тварин виявляються достовірні відмінності, які можна пояснити наявністю вогнищ альтерації в міокарді. На 14 добу дослідження при введенні димедипіну відмічається достовірне збільшення площі зрізу та об'ємної щільності мітохондрій, об'ємної щільності міофібрил ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з показниками контрольної групи тварин, що свідчить про зменшення вираженості та площі ушкодження міокарда, відновлення енергетичних та скоротливих компартментів міоцитів.

Результати ультраструктурного дослідження впливу блокаторів кальцієвих каналів на тлі сформованої доксорубіцинової кардіоміопатії доводять, що

димедипін і амлодипін покращують ультраструктуру міокарда і, як наслідок, функцію серця.

## Висновки

1. При введенні амлодипіну та димедипіну за умови доксорубіцинової кардіоміопатії структурні порушення скоротливого апарату КМЦ мають меншу вираженість, морфо-функціональний стан мітохондрій і міофіламентів частково відновлюється, що вказує на ефективність цих препаратів для лікування та профілактики антрациклінових ушкоджень серця.

2. Морфометричні зміни ультраструктури кардіоміоцитів при застосуванні амлодипіну та димедипіну мають однакову спрямованість та ступінь вираженості, тому обидва препарати можуть ефективно застосовуватися при доксорубіцинової кардіоміопатії.

3. Незважаючи на низку позитивних змін в ультраструктурі кардіоміоцитів під впливом амлодипіну та димедипіну на тлі доксорубіцинової кардіоміопатії, зберігаються ділянки пошкодження скоротливого апарату КМЦ і відсутня повна відповідність будови органел групі інтактних тварин, що свідчить про часткове відновлення енергетичної та скоротливої функції КМЦ при дії досліджуваних блокаторів  $Ca^{2+}$ -каналів.

1. Калинкина Н. В. Антрациклиновые кардиомиопатии / Калинкина Н. В. // Укр. кардиол. журнал. – 2004. – № 2. – С. 116–112.
2. Крикова А. В. Кардиотоксические эффекты антрациклиновых антибиотиков / А. В. Крикова // Научно-практ. медицинский журнал «Медицинские вести регионов», Смоленск. – 2008. – № 1. – С. 50–53.
3. Непомнящих Л. М. Влияние доксорубина на дилатационное ремоделирование миокарда в период прогрессивного роста / Л. М. Непомнящих // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 4 (вып. 1). – С. 147–151.
4. Simunek T. Anthracycline – induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Simunek, M. Strba, O. Popelova // Pharmacol. Reports. – 2009. – V. 61 – P. 154–171.
5. Миронова Г. Д. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции / Г. Д. Миронова, Е. В. Качаева, А. Т. Копылов // Вестник РАМН. – 2007. – № 2. – С. 34–43.
6. Капелько В. И. Концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме кардиомиоцитов и сократительная функция сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии / В. И. Капелько, К. Виллиамс, Дж. П. Морган // Кардиология. – 1996. – Т. 36, № 12. – С. 57–61.
7. Berthiaume J. M. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity / J. M. Berthiaume, K. B. Wallace // Cell Biol. Toxicol. – 2007. – V. 23, № 1. – P. 15–25.
8. Мохорт М. А. Кардіотропна дія нового антагоніста кальцію дигідропіридинового ряду / М. А. Мохорт // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (63). – С. 99–102.



- 
9. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

**С. В. Пакришень, Е. Н. Килимник**

**Морфо-функциональное состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов крыс при доxorубициновой кардиомиопатии и возможные пути ее фармакологической коррекции**

Изучали влияние антагонистов  $Ca^{2+}$  дигидропиридинового ряда (амлодипина и димеодипина) на развитие антрациклиновой кардиомиопатии у крыс. Состояние сократительного аппарата миокарда левого желудочка сердца исследовали методами электронной микроскопии. Морфометрически изучали объемные части миофибрилл и митохондрий, площадь среза митохондрий и их количественную плотность, проводили статистическую обработку и анализ полученных результатов. В эксперименте на крысах установлено, что введение доxorубицина приводит к необратимым дистрофически-некротическим изменениям кардиомиоцитов. Установленные ультраструктурные изменения саркоплазматического ретикулума, митохондрий, миофибрилл приводят к нарушению сократительного и энергетического аппаратов кардиомиоцитов. В результате эксперимента установлено, что при применении амлодипина и димеодипина при сформированной доxorубициновой кардиомиопатии отмечается значительное уменьшение дистрофически-некротических изменений, происходит нормализация кальциевого обмена, улучшается структура саркоплазматического ретикулума, частично восстанавливается морфо-функциональное состояние митохондрий и миофибрилл, что указывает на частичную нормализацию энергетической функции кардиомиоцитов и является свидетельством кардиопротекторных свойств блокаторов кальциевых каналов в условиях эксперимента.

*Ключевые слова:* кардиотоксичность, ультраструктура, доxorубицин, амлодипин, димеодипин

**S. V. Pakryshen', E. N. Kilymnyk**

**Morpho-functional state of cardiomyocytes contractile apparatus in rats with doxorubicin cardiomyopathy and possible ways of its pharmacological correction**

Dihydropyridine  $Ca^{2+}$  antagonists (amlodipine and dimeodipine) effect on the anthracycline cardiomyopathy development in rats was studied. The contractile apparatus of left ventricle myocardium was studied using electron microscopy. The volume parts of myofibrils and mitochondria, mitochondrial cut area and its quantitative density were investigated by morphometry, statistical processing and analysis of the results. Doxorubicin administration leads to the irreversible necrotic and dystrophic changes in cardiomyocytes. Ultrastructural changes in sarcoplasmic reticulum, mitochondria and myofibrils lead to the alterations of contractile and energetic apparatuses in cardiomyocytes. The experiment found that amlodipine and dimeodipine administration to rats with doxorubicin cardiomyopathy showed a significant decrease in dystrophic and necrotic changes, led to the normalization of calcium metabolism, improved the structure of the sarcoplasmic reticulum, partially reversed the morphological and functional state of mitochondria and myofibrils, indicating that the partial normalization of the energy function of cardiomyocytes is evidence of cardioprotective properties calcium channel blockers under experiment.

*Key words:* cardiotoxicity, ultrastructure, doxorubicin, amlodipine, dimeodipine

Надійшла: 10.02.2014 р.

---

**Контактна особа:** Килимник О. М., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 91 98.

## **За сторінками журналу «WHO Pharmaceuticals Newsletter»**

### **Апиксабан, дабигатран і ривароксабан**

#### **Риск серйозного кровотечення – уточнення протипоказаній применительно ко всем трем препаратам**

**Великобританія.** Агентство по регулюванню лікарств та изделий медичинського призначення (MHRA) объявило, що протипоказання для дабигатрану (Pradaxa®), які включають ряд станів, коли пацієнт має значительний ризик кровотечень, також застосовуються до двох інших нових пероральних антикоагулянтів: апиксабану (Eliquis®) та ривароксабану (Xarelto®). Дабигатран являється потужним, перорально активним, прямим інгібітором вільного тромбіна, фібрин-зв'язаного тромбіна та індукційованої тромбіном агрегації тромбоцитів. Апиксабан та ривароксабан – прямі, високоселективні, перорально активні інгібітори активованого фактора X (фактор Ха). Ці три нові пероральні антикоагулянти ліцензовані для: 1) профілактики венозних тромбозів та емболій у дорослих; 2) профілактики інсульту та системної емболії у дорослих з неклапанною фібриляцією передсердь та одного або декількох факторів ризику ІБС. Ривароксабан додатково ліцензован для: 1) лікування тромбозу глибоких вен та емболії легочної артерії, а також повернення повторного тромбозу у дорослих.

В даний час для всіх доз цих антикоагулянтів (дабигатрану, апиксабану та ривароксабану) поширюються наступні протипоказання: пошкодження або стани, які можуть бути фактором значительного ризику розвитку кровотечень. До них можуть відноситися: 1) розвиваюча або недавно розвинулася язва шлунково-кишкового тракту; наявність злоякісних новоутворень з високим ризиком кровотечення; недавні травми голови або спинного мозку; недавні проведені хірургічні операції на мозку, спинному мозку або очях; недавнє внутрішньочерепне кровоизливання; відоме або підозрюване варикозне розширення вен шлункового тракту; артеріовенозні пороки розвитку; аневризми судин, або порушення великих інтраспинальних або внутримозгових судин; 2) супутнє лікування будь-яким іншим антикоагулянтом, наприклад, нефракціонованим гепарином, низькомолекулярним гепарином (наприклад, еноксапарином або дальтепарином), похідними гепарину (наприклад, фондапаринуксом) або пероральними антикоагулянтами (наприклад, варфарином).

Додаткові рекомендації та інформація для медичних працівників: 1) при прийнятті рішення про призначення цих антикоагулянтів особливу увагу слід приділяти пацієнтам з іншими станами, процедурами та супутнєю терапією (наприклад, нестероїдними протизапальними, антитромбоцитарними препаратами), які можуть збільшити ризик кровотечень; 2) слід звернути увагу на функцію нирок. Порушення функції нирок може бути протипоказанням або рекомендацією не використовувати антикоагулянт, або ж може вимагати зниження дози; рекомендації відрізняються для цих трьох препаратів; 3) до того як почати прийом цих препаратів, слід ретельно розглянути протипоказання, дозування, а також застереження та заходи обережності, специфічні для використання кожного препарату, разом з факторами ризику розвитку кровотечень у пацієнта (наприклад, порушення функцій нирок).

Також зазначається, що для будь-якого з цих трьох нових пероральних антикоагулянтів немає жодних конкретних антагоністів.

*Джерело: Drug Safety Update, October 2013, Volume 7, issue 3, A1 MHRA, ([www.mhra.gov.uk](http://www.mhra.gov.uk)).*

### **Комбіновані гормональні контрацептиви Переваги продовжують переважувати ризик**

**Європа.** Європейське агентство по лікарственным препаратам (EMA) підготувало огляд по комбінованим гормональним контрацептивам (КГК), в якому особливу увагу приділяється ризику розвитку венозної тромбоемболії (ВТЕ). Комітет EMA (CHMP) прийшов до висновку, що користь від КГК при використанні небажаної вагітності переважає над ризиком, і що відомий ризик ВТЕ при прийомі низьких доз КГК (етинілестрадіол < 50 мкг) є достатньо низьким. Існують відмінності в ризику ВТЕ в залежності від типу прогестагену, який міститься в різних КГК. Існуючі в даний час дані показують, що КГК, що містять прогестагени левоноргестрел, норестистерон або норгестимат, мають найменший ризик розвитку ВТЕ. В огляді також приділяється увагу ризику артеріальної тромбоемболії (АТЕ). Цей ризик оцінюється як дуже низький. Крім того, відсутні докази відмінностей в рівні ризику між препаратами в залежності від типу прогестагену. Огляд підкреслює важливість надання необхідної інформації жінкам, а також консультирующим та надающим медичну допомогу лікарям, чіткої та сучасної інформації. Інформація про препарати буде оновлюватися, щоб допомогти жінкам приймати об'єктивні рішення про вибір контрацепції разом з їх лікарями. Важливо, щоб жінки були інформовані про ризик ВТЕ, її ознаки та симптоми. Лікарям при

---

---

назначении контрацептивов следует учитывать индивидуальные факторы риска женщины, а также степень риска ВТЭ при назначении конкретного КГК по сравнению с другими препаратами. Мнение CHMP, в соответствии с предыдущей рекомендацией Комитета по фармаконадзору (PRAC), теперь будет направлено в Европейскую комиссию для принятия юридически обязывающего решения об обновлении информации обо всех КГК на всей территории ЕС. Врачам также советуют: при назначении КГК тщательно оценивать индивидуальные факторы риска женщины, особенно касающиеся развития ВТЭ, и различия в рисках ВТЭ у различных препаратов. КГК противопоказаны, если женщина имеет один серьезный или несколько факторов риска, которые свидетельствуют о высоком риске образования тромбов; поскольку отдельные факторы риска у женщины будут меняться с течением времени, существует необходимость регулярно повторно оценивать пригодность используемого контрацептива. Важно также, чтобы при назначении КГК повысить осведомленность женщины о признаках и симптомах венозной и артериальной тромбоэмболии; если женщина имеет симптомы тромбоэмболии, врачи должны всегда рассматривать возможность их возникновения при приеме КГК.

*Источник: Press release, EMA, 22, November 2013 (www.ema.europa.eu).*

### **Бевацизумаб Некротизирующий фасциит**

**Австралия.** Администрация по терапевтическим товарам (TGA) рекомендовала специалистам в области здравоохранения ознакомиться с обновленной информацией о препарате бевацизумаб (Авастин®), которая теперь включает меры предосторожности по некротизирующему фасцииту. После постановки диагноза рекомендуется сразу же прекратить прием бевацизумаба и предпринять соответствующую терапию. Бевацизумаб является противоопухолевым средством, человеческим моноклональным антителом, которое селективно связывается и ингибирует биологическую активность сосудистого эндотелиального фактора роста человека (VEGF). Ингибирование активности VEGF снижает васкуляризацию опухолей, тем самым препятствуя их росту. Некротизирующий фасциит является опасной для жизни бактериальной инфекцией мягких тканей. Она характеризуется быстро распространяющимся некрозом поверхностной фасции и подкожной клетчатки. Симптомы могут включать внезапную сильную боль в пораженной области; покраснение, гиперемию, отек или заполненные жидкостью волдыри на коже; шелушение, обесцвечивание кожи в поврежденной области, а также лихорадку. Другие симптомы могут включать спутанность сознания, обмороки и головокружение. Были получены сообщения о развитии некротического фасциита у небольшого количества пациентов, получавших бевацизумаб в рамках клинических испытаний и в посмаркетинговых условиях. Некоторые из этих случаев закончились смертельным исходом. Сообщений о развитии некротизирующего фасциита у пациентов, получающих бевацизумаб в Австралии, не было. Опубликованные случаи показывают, что некротический фасциит развивается у пациентов с несколькими различными типами рака. Тем не менее, было установлено, что случаи инфекционного поражения, связанные с бевацизумабом редки и, как правило, вторичны по отношению к осложнениям заживления ран, желудочно-кишечным перфорациям или образованию свищей.

*Источник: Medicines Safety Update Vol 4, No. 4, August 2013 (www.tga.gov.au).*

### **Низкомолекулярные гепарины Рекомендации по снижению риска кровотечения в области позвоночника и паралича**

**США.** FDA рекомендует медицинским сотрудникам тщательно следить за сроками установки и удаления спинного катетера у пациентов, принимавших такие антикоагулянты, как эноксапарин. Рекомендуется отложить введение антикоагулянтов на некоторое время после удаления катетера, чтобы уменьшить риск кровотечения в области позвоночника и последующий паралич после спинальных инъекций, в том числе эпидуральных процедур и поясничных проколов. Эти новые рекомендации по схеме назначения, позволяющие снизить риск эпидуральной или спинальной гематомы, будут добавлены в маркировку низкомолекулярных антикоагулянтов, в том числе Lovenox®, генерических препаратов эноксапарина и аналогичных продуктов. Эпидуральная или спинальная гематомы являются известными факторами риска эноксапарина при проведении спинальных процедур и уже описаны и внесены в соответствующие разделы информации о препаратах и на этикетке Lovenox® и генерических препаратов эноксапарина. Однако до сих пор эти серьезные побочные эффекты продолжают иметь место. FDA (США), работала совместно с производителем Lovenox®, Sanofi-Aventis, для оценки этого риска и обновления рекомендаций по применению препарата. Маркировка генериков эноксапарина также будет пересмотрена соответственно, так же как и других низкомолекулярных продуктов гепарина. Важно отметить, что все антикоагулянты имеют риск возникновения спинального кровотечения при их применении совместно с эпидуральной/спинно-мозговой анестезией или спинальным проколом. FDA продолжает работу по оценке безопасности других антикоагулянтов, чтобы определить необходимость дополнения этикеток.

*Источник: FDA Drug Safety Communication, US FDA 6 November 2013 (www.fda.gov).*

---

**Составители: член-корреспондент НАМН Украины Т. А. Бухтиарова,  
кандидат медицинских наук Т. К. Ефимцева**

## ДО ЮВІЛЕЮ СВІТЛАНИ МЕФОДІЇВНИ ДРОГОВОЗ

27 січня 2014 року виповнюється 75 років Світлані Мефодіївні Дрогоровоз – авторитетному фармакологу, доктору медичних наук, професору Національного фармацевтичного університету, заслуженому працівнику народної освіти України, керівнику Харківського регіонального експертного відділення Державного експертного центру лікарських засобів МОЗ України, заслуженому професору Національного фармацевтичного університету та Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Світлана Мефодіївна Дрогоровоз народилася 27 січня 1939 року в Омській області. У 1958 році вступила до Тернопільського медичного інституту, який закінчила в 1964 році за спеціальністю «Лікувальна справа». Трудову діяльність розпочала в 1964 році. З липня 1964 року по 1965 рік Світлана Мефодіївна працювала лікарем Тернопільської обласної лікарні.

Свою наукову діяльність С. М. Дрогоровоз розпочала з аспірантури на кафедрі фармакології Тернопільського медичного інституту під керівництвом професора Н. П. Скакуна (провідного фармаколога-гепатолога СРСР), де в 1967 році захистила кандидатську дисертацію на тему «Желчеотделительная функция печени при стафилококковой инфекции и интоксикации». У 1969 році Світлані Мефодіївні присуджено науковий ступінь кандидата медичних наук.

З 1970 року науково-педагогічну діяльність С. М. Дрогоровоз продовжила на кафедрі фармакології Харківського фармацевтичного інституту (ХФІ). У 1972 році захистила докторську дисертацію на тему «Сравнительное изучение и особенности действия желчегонных препаратов на желчеобразовательную функцию печени в норме и патологии». У 1980 році Світлані Мефодіївні присуджено вчене звання професора.



У 1976–1984 роках Світлана Мефодіївна обіймала посаду проректора з наукової роботи Харківського фармацевтичного інституту. У 1972–2011 роках С. М. Дрогоровоз очолювала кафедру фармакології Харківського фармацевтичного інституту – Української фармацевтичної академії – Національного фармацевтичного університету. Професор С. М. Дрогоровоз стала ініціатором нових сучасних напрямів у навчально-методичній та науково-дослідній роботі. За розробку навчально-методичного комплексу, який неодноразово експонувався на ВДНГ України та СРСР, кафедра в 1990 році була нагороджена Міністерством вищої і середньої освіти першою премією як найкраща серед вузів України.

Школа професора С. М. Дрогоровоз відома далеко за межами України. Вона підготувала 13 докторів та 39 кандидатів наук.

Світлана Мефодіївна – провідний вітчизняний фахівець у галузі фармакології засобів, що застосовуються для

---

---

лікування захворювань печінки. Під її керівництвом проведено низку фундаментальних досліджень, що дозволили встановити нові механізми патогенезу захворювань та уражень печінки. Це стало підґрунтям для розробки принципово нових підходів до створення ефективних вітчизняних гепатопротекторів, що не поступаються іноземним аналогам (антраль, тіотриазолін, ліолів та ін.). Це були перші синтетичні гепатопротектори, дозволені до медичного застосування в СНД. Запропонована професором С. М. Дрогвоз методика визначення вмісту холестеролу та жовчних кислот у жовчі відома як в Україні, так і в інших країнах.

С. М. Дрогвоз є співавтором понад 20 лікарських препаратів, автором понад 700 наукових праць, серед яких 250 авторських свідоцтв, 7 монографій, 8 підручників з фармакології українською, російською, англійською, французькою, арабською мовами.

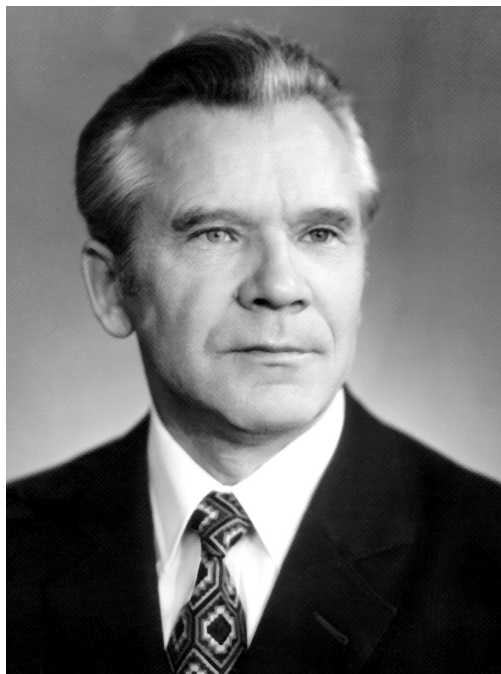
Світлана Мефодіївна Дрогвоз нагороджена медалями «За трудовое отличие», «Ветеран труда», «Изобретатель СССР», має звання почесного професора Національного фармацевтичного університету, почесного професора Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського,

почесне звання «Заслужений працівник освіти України».

Сьогодні С. М. Дрогвоз працює на посаді професора кафедри фармакології НФаУ. Як і завжди, вона невтомна, енергійна та сповнена наснаги. Студенти багатьох поколінь знають професора С. М. Дрогвоз як неперевершеного лектора, який вміє захопити аудиторію, небагатьма словами пояснити будь-яке питання фармакології, і як мудрого, справедливого педагога. Доброзичливий наставник, Світлана Мефодіївна постійно працює з молоддю та передає їй свій багатий науковий та педагогічний досвід. Професор С. М. Дрогвоз активно займається створенням навчальної літератури. Тільки за останні роки вона стала автором низки оригінальних навчальних та довідкових видань, а саме «Фармакологія в допомогу студенту, провизору и врачу», «Побічна дія ліків», «Лікарська токсикологія», «Хронофармакологія» та ін.

Колектив Національного фармацевтичного університету, вся фармакологічна громадськість щиро зичать Світлані Мефодіївні доброго здоров'я, щастя, наснаги, нових творчих успіхів і досягнень у науковій і педагогічній праці.

## ДО 90-РІЧЧЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ ФЕДОРА ПЕТРОВИЧА ТРІНУСА



Федір Петрович Трінус – один із фундаторів сучасної української фармакології, токсикології, антидотології, відомий спеціаліст у галузі створення нових лікарських засобів, заслужений діяч науки та техніки України, доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАМН та НАН України, член-кореспондент РАМН.

Федір Петрович народився 25 лютого 1924 року в селі Старому Любарі Любарського району Житомирської області в родині селян. З самого дитинства Федір Петрович мріяв бути лікарем, але в 1941 році війна перервала його мирне життя. З перших місяців війни він був підпільником, партизаном, а після звільнення рідної Житомирщини від німецько-фашистських загарбників вступив до лав Радянської армії. Під час бойових дій Федора Петровича було тяжко поранено. За успішне виконання бойових завдань Ф. П. Трінуса було нагороджено бойовими нагородами.

У 1946 році після демобілізації Ф. П. Трінус вступив до Київського медичного інституту, де навчався в 1946–1952 роках. Після закінчення інституту він вступив до аспірантури на кафедрі фармакології, працював під керівництвом всесвітньо відомого фармаколога, академіка АМН СРСР А. І. Черкеса. У 1956 році Федір Петрович захистив кандидатську дисертацію на тему «Перетворення сульфаніламідів в організмі при підвищенні обміну речовин». У 1956–1965 роках він пройшов шлях від асистента до доцента кафедри та захистив дисертацію на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук «Механізми дії вазоактивних речовин на гладенькі м'язи судинної стінки». З 1965 року його доля нерозривно пов'язана з Київським НДІ фармакології та токсикології, де він працював на посаді завідувачого відділом, а з 1968 по 1986 рік – на посаді директора. У 1986 році він перейшов на посаду завідувачого відділом фармакології протизапальних та анальгезуючих засобів Інституту.

Ф. П. Трінус відомий дослідженнями з механізмів дії нестероїдних антифлогістиків, неопіодних анальгетиків, протипухлинних засобів та антидотів. У 60-80-ті роки минулого століття в Київському НДІ фармакології та токсикології під керівництвом Ф. П. Трінуса проводилися наукові дослідження, спрямовані на розробку та впровадження в медичну практику нових лікарських засобів та антидотів. Під його керівництвом вивчено та впроваджено в клінічну та ветеринарну практику нові лікарські препарати та антидоти, серед яких: амізон, піримідант, антиціан, алоксим. Результати його досліджень узагальнені в монографіях «Нестероидные противовоспалительные средства» (1987 р.), «Фармакологическая регуляция воспаления» (1987 р.), «Ненаркотические анальгетики» (1980 р.)

---

---

та ін. Ф. П. Трінус автор понад 400 наукових робіт, 165 авторських свідоцтв, 5 патентів.

Велику увагу Федір Петрович приділяв науково-літературній роботі. Велике значення для охорони здоров'я, інформування спеціалістів щодо ліків мала його книга «Фармакотерапевтичний справочник», перше видання якого вийшло ще в 70-ті роки минулого століття. У подальшому книга неодноразово оновлювалася відповідно до змін номенклатури лікарських засобів і нових даних про їхні властивості, механізми дії, досвід застосування та перевидавалася 8 разів. Для декількох поколінь лікарів ця книга була настільною не тільки як довідник, але й як об'єктивне джерело сучасних знань з фармакології та терапії. Саме це видання зробило Ф. П. Трінуса одним із найвідоміших фармакологів держави.

Велику увагу Ф. П. Трінус приділяв вихованню висококваліфікованих спе-

ціалістів-фармакологів. Він підготував 9 докторів та 15 кандидатів наук.

Високий рівень наукових заслуг Федора Петровича було оцінено обранням членом-кореспондентом РАМН, НАН та НАМН України, членом закордонних наукових спілок, нагородженням орденами та медалями.

Федір Петрович Трінус прожив тривале та яскраве життя, яке є зразком служіння науці та людям. Результати його наукових праць залишаються актуальними. А пам'ять про нього як видатного фармаколога та громадянина буде жити довгі роки.

Колектив ДУ «Інститут  
фармакології та токсикології НАМН  
України»

ВГО «Асоціація фармакологів  
України»

---

---

## Правила для авторів

---

1. У журналі «Фармакологія та лікарська токсикологія»/ «Pharmacology and drug toxicology») публікуються оглядові та оригінальні наукові статті, що стосуються:

- досліджень фармако- та токсикодинаміки лікарських засобів;
- пошуку та розробки нових потенційних лікарських засобів, вивчення механізмів їхньої дії, фармакологічних та токсичних властивостей;
- пошуку нових шляхів фармакологічної корекції патологічних станів, експериментального обґрунтування схем та методів фармакотерапії поширених захворювань;
- взаємодії між ліками;
- побічних ефектів при застосуванні ліків;
- питань фармацевтики, фармацевтичного ринку, фармакоекономіки.

Журнал «Фармакологія та лікарська токсикологія» включено до переліку журналів, публікації в яких зараховуються при захисті дисертацій у галузі медичних, біологічних та фармацевтичних наук.

2. Не приймаються до розгляду матеріали, що стосуються діагностики захворювань та немедикаментозних методів лікування.

3. Журнал публікує наступні типи статей:

- оригінальні наукові статті за результатами проведених досліджень;
- короткі інформаційні повідомлення;
- проблемні та оглядові статті.

4. Мова статей: українська, російська або англійська.

5. Основні вимоги до оригінальних статей:

- новизна та обґрунтованість фактичного матеріалу;
- оформлення рукопису відповідно до вимог журналу.

6. Дотримання принципів біоетики:

дослідження, яким присвячено статтю, мають бути проведені відповідно до Етичного Кодексу Всесвітньої Медичної асоціації (Хельсінська декларація) щодо досліджень, до яких долучають людей, або відповідно до Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах. Це має бути зазначено у відповідному розділі статті (Матеріали та методи).

7. Текст оригінальної статті має бути побудований за наступною схемою:

- індекс УДК у верхньому лівому куті листа (відповідно до всіх ключових слів);
- прізвища та ініціали автора/ів (по центру). Назва організації, де працює автор, із зазначенням міста. Якщо авторів декілька, і вони працюють у різних установах, необхідно арабськими цифрами зробити цифровий надрядковий знак, що відповідає установі, де працює кожний з авторів. Назва установи, з відповідним цифровим позначенням, має бути вказана в нижньому колонтитулі;
- назва статті – великими жирними літерами (по центру). Назва статті має бути лаконічною та інформативною, подається без використання вузькоспеціалізованих скорочень, крапка в кінці назви не ставиться;
- ключові слова (до 10 слів);

*Вступна частина:*

- постановка проблеми в загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями;
- аналіз досліджень, які присвячені розв'язанню даної проблеми й на які спирається автор;



- 
- 
- виділення невіршених частин загальної проблеми, яким присвячується означена стаття, та
  - формулювання цілей (мети) роботи (постановка завдання);

*Матеріали та методи:*

– наводяться описи методів, реактивів та умов проведення дослідів. Обов'язково наводяться вид та кількість тварин, а також використані в досліді методи знеболення та етаназії, твердження щодо схвалення досліджень комісією з біоетики в разі проведення досліджень із залученням людини або тварин. Обов'язково мають бути зазначені методи статистичної обробки результатів та програма, за допомогою якої було зроблено статистичний аналіз;

*Результати та їх обговорення:*

– виклад основного матеріалу дослідження з аналізом отриманих наукових результатів;

*Висновки:*

– висновки даного дослідження та перспективи подальших розробок у даному напрямі;

*Список літературних посилань:*

– подається на окремих аркушах та включає всі роботи, що згадуються в тексті, у порядку їхнього цитування на мові оригіналу (приклад оформлення літературних посилань наведено далі). Список літературних посилань до статті складається в послідовній нумерації та має містити джерела за останні п'ять років. При посиланні на журнальні статті наводять прізвище та ініціали авторів, назву роботи, назву журналу, рік, том, номер, сторінки; при посиланні на монографії – місто, видавництво, рік видання, кількість сторінок. Якщо у джерела більше 4 авторів, вказують 3 перших і далі «та ін.». Посилання на неопубліковані роботи не допускається. Посилання на бібліографічні джерела в тексті статті наводять у квадратних дужках;

*Реферат (резюме):*

– реферат (резюме) статті українською, російською та англійською мовами з назвою роботи, прізвищем та ініціалами автора/-ів, тексту, у якому має бути відображено мету, методи (тільки називаються) та результати дослідження (стисло), а також основні висновки та рекомендації. Зазначені розділи необхідно відокремити абзацами. Завершується реферат ключовими словами відповідною мовою. Реферат та ключові слова обов'язково подаються українською, російською та англійською мовами та мають бути ідентичними. Рекомендований середній об'єм тексту реферату – до 300 слів.

При написанні реферату англійською мовою доцільно користуватися послугами кваліфікованих перекладачів з подальшим науковим редагуванням тексту автором/-ами.

Російськомовним авторам достатньо надати резюме російською та англійською мовами. Переклад на українську здійснюватиметься редакцією.

Англomовним авторам достатньо надати резюме англійською мовою. Переклад на українську та російську мови здійснюватиметься редакцією.

8. Стаття має бути підписаною авторами та супроводжуватись:

- листом від організації, де виконано цю роботу;
- експертним висновком про можливість публікації (тільки для вітчизняних авторів);
- відомостями про авторів із зазначенням контактної особи, наукового ступеня, звання, місця роботи, контактного телефону, поштової та електронної адреси.

9. Матеріали статті мають бути викладені українською, російською або англійською мовою. Матеріали надаються на паперовому носії (білому аркуші форматом А 4 через 1,5 інтервалу в форматі текстового редактора MS WORD for Windows, формат файлу – \*.doc, без ручних перенесень, шрифтом Times New Roman 14 пт, з інтервалом 1,5 та в електронному вигляді з ідентичним текстом статті у форматі текстового редактора MS WORD for Windows).

---

---

10. Обсяг матеріалів оригінальних досліджень має становити 6–12 сторінок, оглядів – 12–20 сторінок, включаючи ілюстрації, таблиці та список літератури. У паперового та електронного варіантів рукопису мають бути наступні береги: лівий – 3,5 см, правий – 1,5 см, верхній та нижній – по 2,5 см.

У сторінок рукопису має бути наскрізна нумерація, у тому числі з таблицями, рисунками, переліком літературних посилань, рефератами.

11. Таблиці, рисунки та підписи до них необхідно розміщувати у порядку їхнього згадування в тексті. Назви таблиць та рисунків мають бути лаконічними та інформативними, без скорочень та абревіатур. Заголовки окремих граф мають відповідати їхньому змісту. На всі рисунки й таблиці в тексті необхідно робити посилання.

Усі рисунки та фотографії мають бути чіткими й контрастними і додаватися в електронному вигляді у форматі .tif або .jpg. У підписах до мікрофотографій, що ілюструють результати патоморфологічних досліджень, необхідно вказувати ступінь збільшення і метод фарбування.

12. Позначки різних мір, одиниці фізичних величин, результати клінічних і лабораторних досліджень слід наводити відповідно до Міжнародної системи одиниць (СІ), медичні терміни – згідно з Міжнародною анатомічною та Міжнародною гістологічною номенклатурами, назви захворювань – за Міжнародною класифікацією хвороб 10-го перегляду. Назви фірм-виробників лікарських препаратів та реактивів, використаних у дослідях, треба подавати в оригінальній транскрипції. Латинські назви роду та виду мікроорганізмів необхідно виділяти курсивом.

Скорочення в тексті слів, імен, термінів (крім загальновідомих) не допускається. Абревіатури розшифровуються після першого згадування і залишаються незмінними протягом усього тексту.

13. Відповідальність за вірогідність та оригінальність наданих матеріалів (результатів досліджень, фактів, цитат, прізвищ, імен тощо) покладається на авторів.

Надсилати до редакції роботи, що опубліковані в інших виданнях або направлені до друку в інші редакції, не допускається.

14. Статті, оформлені без дотримання правил, не розглядаються і не повертаються авторам. Текст статті має бути старанно вивіреною. Коректура авторам не висилається. Відхилені рукописи не повертаються.

15. Матеріали статей рецензуються. Редакція залишає за собою право на редагування та скорочення одержаних матеріалів, публікацію їх у вигляді коротких повідомлень.

16. Журнал реферується Українським Реферативним журналом. Опубліковані матеріали зберігаються в базі даних «Україніка наукова» та відкриті до ON-лайнного доступу на WEB-сайті журналу: [pharmtox-j.org.ua](http://pharmtox-j.org.ua)

17. Авторський текстовий матеріал (2 примірники статті разом з супровідними документами) надається особисто або надсилається на поштову адресу редакції: 03680, м. Київ, вул. Ежена Потье, 14, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», редакція журналу «Фармакологія та лікарська токсикологія». На останній сторінці одного з примірників мають бути власноручні підписи всіх авторів (цим підтверджується їхня згода на друкування статті та використання персональних даних).

Електронний варіант статті можна надавати на компакт-диску, на USB-накопичувачі (тільки за особистої подачі) або надсилати електронною поштою як прикріплені файли. Адреса електронної пошти: [misliviets@inbox.ru](mailto:misliviets@inbox.ru).

**Зразок оформлення списку літератури**

<b>Характеристика джерела</b>	<b>Приклад оформлення</b>
<i>Монографія</i>	
Один автор	Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш. – М. : Высшая школа, 1991. – 527 с.
Два автори	Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова. – М. : Высшая школа, 1991. – 527 с.
Три автори	Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М. : Высшая школа, 1991. – 527 с.
Чотири автори	Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – К. : Вища шк., 1983. – 383 с.
П'ять і більше авторів	Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др.]. – К. : Вища шк., 1983. – 383 с.
Складова частина книги або збірника	Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биологии: под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
	Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / Коваленко В. М., Стефанов О. В., Максимов Ю. М., Трахтенберг І. М. // Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації: за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 74–97.
Стаття в журналі	Шишкова К. В. Особливості функціонального стану серцево-судинної системи хворих на ревматоїдний артрит, поєднаний з ішемічною хворобою / Шишкова К. В. // Укр. мед. альманах. – 2009. – Т. 12, № 6. – С. 219–221.
Електронний ресурс	Malate-Aspartate Shunt in Neuronal Adaptation to Ischemic Conditions: Molecular–Biochemical Mechanisms of Activation and Regulation / Belenichev I. F, Kolesnik Yu. M., Pavlov S. V. [et al.] // Neurochem. J. – 2012. – V. 6, № 1. – P. 22–28.
	Сучасні питання хірургічного лікування хворих із вперше виявленим деструктивним туберкульозом легень (огляд літератури) [Електронний ресурс] / Б. В. Радіонов [та ін.]. – Режим доступу: <a href="http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2008/kalabuha2008.pdf">http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2008/kalabuha2008.pdf</a>
Тези доповіді	Пішель В. Я. Вплив тестостерону і флутаміду на перебіг морфінової залежності та морфологічні характеристики головного мозку білих щурів / В. Я. Пішель, О. В. Сергієнко, А. В. Матвієнко // Фармакологія – 2006 – крок у майбутнє: тез. доп. – Одеса, 2006. – С. 135–136.
Автореферат дисертації	Добреля Н. В. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом при артеріальній гіпертензії різного генезу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 4.03.05 «Фармакологія» / Добреля Наталія Володимирівна; ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». – Київ, 2013. – 22 с.
Патент	Пат. № 86668, UA, МПК C07D 249/08 (2006.01), A61K 31/4196 (2006.01), A61P 9/00, A61P 9/10 (2006.01), A61P 25/28 (2006.01). Лізінний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М. та ін.; – власник ТОВ «НВО Фарматрон». – № а200705865; заявл. 25.10.07; опубл. 12.05.09, Бюл. № 9.
Методичні вказівки	Доклінічне вивчення засобів для лікування та профілактики захворювань слизової оболонки порожнини рота: методичні рекомендації // К. М. Косенко, В. Я. Скиба, А. П. Левицький [та ін.]. – К., 2002. – 19 с.
Інтернет-сторінка	Термінологія законодавства України // <a href="http://www.rada.kiev.ua/laws/pravo/new/termin.html">http://www.rada.kiev.ua/laws/pravo/new/termin.html</a>

## Правила для авторов

1. В журнале «Фармакология и лекарственная токсикология» / «Pharmacology and drug toxicology») публикуются обзорные и оригинальные научные статьи, касающиеся:

- исследований фармако- и токсикодинамики лекарственных средств;
- поиска и разработки новых потенциальных лекарственных средств, изучения механизмов их действия, фармакологических и токсических свойств;
- поиска новых путей фармакологической коррекции патологических состояний, экспериментального обоснования схем и методов фармакотерапии распространенных заболеваний;
- взаимодействия между лекарствами;
- побочных эффектов при применении лекарств;
- вопросов фармацевтики, фармацевтического рынка, фармакоэкономики.

Журнал «Фармакология и лекарственная токсикология» включен в перечень журналов, публикации в которых засчитываются при защите диссертаций в области медицинских, биологических и фармацевтических наук.

2. Не принимаются к рассмотрению материалы, касающиеся диагностики заболеваний и немедикаментозных методов лечения.

3. Журнал публикует следующие типы статей:

- оригинальные научные статьи по результатам проведенных исследований;
- короткие информационные сообщения;
- проблемные и обзорные статьи.

4. Язык статей: украинский, русский или английский.

5. Основные требования к оригинальным статьям:

- новизна и обоснованность фактического материала;
- оформление рукописи в соответствии с требованиями журнала.

6. Соблюдение принципов биоэтики:

- исследование, которому посвящена статья, должно быть проведено в соответствии с Этическим Кодексом Всемирной Медицинской ассоциации (Хельсинская декларация) по исследованиям, к которым приобщают людей, или в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU при экспериментах на животных. Это должно быть указано в соответствующем разделе статьи (Материалы и методы).

7. Текст оригинальной статьи должен быть построен по следующей схеме:

- индекс УДК в верхнем левом углу листа (в соответствии со всеми ключевыми словами);
- фамилии и инициалы автора/ов (по центру). Название организации, где работает автор, с указанием города. Если авторов несколько, и они работают в разных учреждениях, необходимо арабскими цифрами сделать цифровой надстрочный знак, соответствующий учреждению, где работает каждый из авторов. Название учреждения с соответствующим цифровым обозначением должно быть указано в нижнем колонтитуле;
- название статьи – большими жирными буквами (по центру). Название статьи должно быть лаконичным и информативным, подается без использования узкоспециализированных сокращений, точка в конце названия не ставится;
- ключевые слова (до 10 слов);

*Вступительная часть:*

- постановка проблемы в общем виде и ее связь с важными научными или практическими задачами;
- анализ исследований, посвященных решению данной проблемы, на которые опирается автор;

- 
- 
- выделение нерешенных частей общей проблемы, которым посвящается статья;
  - формулировка цели исследования (постановка задачи);

*Материалы и методы:*

- приводится описание методов, реактивов и условий проведения опытов. Обязательно указывается вид и количество животных, а также использованные в опытах методы обезболивания и эвтаназии, утверждение об одобрении исследований комиссией по биоэтике при проведении исследований с участием человека и животных. Обязательно должны быть указаны методы статистической обработки результатов и программа, с помощью которой был проведен статистический анализ;

*Результаты и обсуждение:*

- изложение основного материала исследования с анализом полученных научных результатов;

*Выводы:*

- выводы данного исследования и перспективы дальнейших разработок в данном направлении;

*Список литературы:*

- подается на отдельных листах и включает все работы, упоминаемые в тексте, в порядке их цитирования на языке оригинала (примеры оформления литературных ссылок приведены далее). Список литературных ссылок составляется в последовательной нумерации и должен содержать источники за последние пять лет. При ссылке на журнальные статьи указывают фамилию и инициалы авторов, название работы, название журнала, год, том, номер, страницы; при ссылке на монографии – город, издательство, год издания, количество страниц. Если у источника более 4 авторов, указывают 3 первых и дальше «и др.». Ссылки на неопубликованные работы не допускаются. Ссылки на библиографические источники в тексте статьи приводятся в квадратных скобках;

*Реферат (резюме):*

- реферат (резюме) статьи на украинском, русском и английском языках с названием работы, фамилией и инициалами автора/-ов текста, в котором должны быть отражены цель, методы (только называются) и результаты исследования (кратко), а также основные выводы и рекомендации. Указанные разделы должны быть отделены абзацами. Завершается работа ключевыми словами на соответствующем языке. Реферат и ключевые слова обязательно предоставляются на украинском, русском и английском языках и должны быть идентичными. Рекомендуемый средний объем текста реферата – до 300 слов.

При написании реферата на английском языке целесообразно пользоваться услугами квалифицированных переводчиков с последующим научным редактированием текста автором/-ами.

Русскоязычным авторам достаточно предоставить резюме на русском и английском языках. Перевод на украинский будет осуществляться редакцией.

Англоязычным авторам достаточно предоставить резюме на английском языке. Перевод на украинский и русский языки будет осуществляться редакцией.

**8. Статья должна быть подписана всеми авторами и сопровождаться:**

- письмом от организации, где выполнена эта работа;
- экспертным заключением о возможности публикации (только для отечественных авторов);
- сведениями об авторах с указанием контактного лица, ученой степени, звания, места работы, контактного телефона, почтового и электронного адреса.

9. Материалы статьи должны быть изложены на украинском, русском или английском языке. Материалы предоставляются на бумажном носителе (белом листе формата А 4 через 1,5 интервала в формате текстового редактора MS WORD for Windows, формат файла – \*.doc, без ручных переносов, шрифт Times New Roman 14 пт, с интервалом 1,5 и в электронном виде с идентичным текстом статьи в формате текстового редактора MS WORD for Windows).

---

---

10. Объем материалов оригинальных исследований должен составлять 6–12 страниц, обзоров – 12–20 страниц, включая иллюстрации, таблицы и список литературы. Бумажный и электронный варианты рукописей должны иметь поля: левое – 3,5 см, правое – 1,5 см, сверху и снизу – по 2,5 см.

Страницы рукописи должны иметь сквозную нумерацию, в том числе с таблицами, рисунками, списком литературных ссылок, рефератами.

11. Таблицы, рисунки и подписи к ним необходимо размещать в порядке их упоминания в тексте. Названия таблиц и рисунков должны быть лаконичными и информативными, без сокращений и аббревиатур. Заголовки отдельных графов должны соответствовать их содержанию. На все рисунки и таблицы в тексте нужно делать ссылки.

Все рисунки и фотографии должны быть четкими и контрастными и добавляться в электронном виде в формате \*.tif или \*.jpg. В подписях к микрофотографиям, иллюстрирующим результаты патоморфологических исследований, необходимо указывать степень увеличения и метод окрашивания.

12. Обозначение различных мер, единицы физических величин, результаты клинических и лабораторных исследований следует приводить в соответствии с Международной системой единиц (СИ), медицинские термины – по Международной анатомической и Международной гистологической номенклатурам, названия заболеваний – по Международной классификации болезней 10-го пересмотра. Названия фирм-производителей лекарственных препаратов и реактивов, использованных в опытах, надо подавать в оригинальной транскрипции. Латинские названия рода и вида микроорганизмов необходимо выделить курсивом.

Сокращение в тексте слов, имен, терминов (кроме общеизвестных) не допускается. Аббревиатуры расшифровываются после первого упоминания и остаются неизменными на протяжении всего текста.

13. Ответственность за достоверность и оригинальность представленных материалов (результатов исследований, фактов, цитат, фамилий, имен и т. п.) возлагается на авторов.

Направлять в редакцию работы, опубликованные в других изданиях или направленные в печать в другие редакции, не допускается.

14. Статьи, оформленные без соблюдения правил, не рассматриваются и не возвращаются авторам. Текст статьи должен быть тщательно выверен. Корректурa авторам не высылается. Отклоненные рукописи не возвращаются.

15. Материалы статей рецензируются. Редакция оставляет за собой право на редактирование и сокращение полученных материалов, публикацию их в виде коротких сообщений.

16. Журнал реферируется Украинским реферативным журналом. Опубликованные материалы хранятся в базе данных «Украиника научная» и открыты в ON-лайнном доступе на WEB-сайте журнала: [pharmtox-j.org.ua](http://pharmtox-j.org.ua)

17. Авторский текстовый материал (2 экземпляра статьи вместе с сопроводительными документами) подается лично или направляется на почтовый адрес редакции: 03680, г. Киев, ул. Эжена Потье, 14, ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМНУ», редакция журнала «Фармакология и лекарственная токсикология». На последней странице одного из экземпляров должны быть собственноручные подписи всех авторов (этим подтверждается их согласие на печатание статьи и использование персональных данных).

Электронный вариант статьи можно подавать на компакт-диске, на USB-накопителе (только при подаче лично) или направить по электронной почте как прикрепленные файлы. Адрес электронной почты: [misliviets@inbox.ru](mailto:misliviets@inbox.ru).

## ОБЗОРЫ

<i>Бобырев В. Н., Девяткина Н. Н.</i> Новые механизмы действия ромашки и календулы как основа их применения в современных лекарственных средствах для стоматологической практики .....	3
<i>Кизуб И. В., Клименко К. И., Соловьев А. И.</i> Участие протеинкиназы С в механизмах нарушения сосудистого тонуса при сахарном диабете. Часть 1 .....	10
<i>Мариевский В. Ф., Воронин Е. Ф., Чекман И. С., Гребельник А. И.</i> Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид: перспективное биоцидное средство .....	17

## СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

<i>Бондарев Е. В.</i> Экспериментальное обоснование применения глюкозамина гидрохлорида как средства ноотропного действия .....	22
---	----

## В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

<i>Бобкова Л. С., Бухтиарова Т. А.</i> Моделирование анальгетической активности производных пиридина путем определения дескрипторов, комплементарных к нейромедиаторам .....	26
<i>Бутко Я. А., Дроговоз С. М., Ляпунова А. Н., Булыга Л. А.</i> Исследование влияния глюкокортикостероидов и керамидов на иммунобиохимические маркеры воспаления при аллергическом дерматите .....	35
<i>Валика В. В., Парий С. Б., Руснак Л. Г., Унгурияну А. И., Николай Е. С., Тодираш М. П.</i> Доклиническое исследование гепатопротекторной эффективности нового комбинированного препарата Neamon-hera .....	40
<i>Дорошенко А. М.</i> Исследование острой токсичности наночастиц железа при внутрижелудочном и внутривенном путях введения .....	48
<i>Клименко К. И., Новохацкая Т. В., Поляков В. И., Жуковский О. И., Бондарь В. Н., Соловьев А. И.</i> Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на выходящие калиевые токи в миоцитах аорты крыс с экспериментальным диабетом .....	58
<i>Мохорт Н. А., Геращенко И. В., Шкрабак А. А., Мазур Ю. Ю., Веклич Т. А.</i> Производные имидазо[1,2-а]азепиния как модификаторы сократительной активности миомеритрия .....	65
<i>Нагорная Е. А., Горчакова Н. А., Чекман И. С., Беленичев И. Ф., Брюзгина Т. С.</i> Влияние совместного применения квинаприла с ангиолином на жирнокислотный состав липидов плазмы крови у крыс с артериальной гипертензией .....	73
<i>Новохацкая Т. В., Клименко К. И., Досенко В. Е., Соловьев А. И.</i> Правда или вымысел: действительно ли повышенный уровень экспрессии гена ПКС-дельта приводит к дисфункции калиевых каналов при артериальной гипертензии и диабете? .....	78
<i>Прискока А. О.</i> Исследование острой токсичности наночастиц серебра при внутрибрюшинном введении .....	85
<i>Пясковская О. Н., Горбик Г. В., Якшибаева Ю. Р., Родионова Н. К., Момот В. Я., Соляник Г. И.</i> Коррекция опухоль-ассоциированной анемии полифенолами винограда .....	91
<i>Пакришень С. В., Килимник Е. Н.</i> Морфо-функциональное состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов крыс при доксорубициновой кардиомиопатии и возможные пути ее фармакологической коррекции .....	99

## ИНФОРМАЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

<b>ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ</b> .....	106
------------------------------------	-----

## ЛИЧНОСТИ

К юбилею Светланы Мефодиевны Дроговоз .....	108
К 90-летию со дня рождения Федора Петровича Тринуса .....	110

<b>ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ</b> .....	116
----------------------------------	-----

# CONTENT

---

## REVIEWS

- Bobyrev V. N., Devyatkina N. N.* New mechanisms of chamomile and calendula as the basis of their use in modern medicinal remedies for dental practice ..... 3
- Kizub I. V., Klymenko K. I., Soloviev A. I.* Protein kinase C participation in mechanisms of vascular tone abnormality in diabetes mellitus. Part 1 ..... 10
- Marievsky V. F., Voronin E. F., Chekman I. S., Grebelnyk A. I.* Polyhexamethylene guanidine hydrochloride as a perspective biocidal medication ..... 17

## CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

- Bondarev Ye. V.* Experimental basis of glucosamine hydrochloride use as a nootropic action mean ..... 22

## IN SCIENTIFIC LABORATORIES

- Bobkova L. S., Buhtiarova T. A.* Modeling of analgesic activity of the pyridine derivatives by determining descriptors complementary to neuromediators ..... 26
- Butko Y. O., Drogovoz S. M., Lyapunova A. N., Bulyga L. O.* The study of glucocorticosteroids and ceramides influence on immunobiochemical markers of inflammation in allergic dermatitis ..... 35
- Valica V., Parii S., Rusnac L., Ungureanu A., Nicolai E., Todiras M.* Preclinical studies of hepatoprotective efficacy of a new combined drug Neamon-hepa ..... 40
- Doroshenko A. M.* Study of iron nanoparticles acute oral and intravenous toxicity ..... 48
- Klymenko K. I., Novokhatska T. V., Polyakov V. I., Zhukovsky O. I., Bondar V. V., Soloviev A. I.* The effect of taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol on outward potassium currents in aortic myocytes of rats with experimental diabetes ..... 58
- Mochort N. A., Gerashchenko I. V., Shkrabak A. A., Mazur Yu. Yu., Veklich T. O.* The derivatives of imidazo[1,2-a]azepine as modifiers of myometrium contractile activity ..... 65
- Nagornaya E. A., Gorchakova N. A., Chekman I. S., Belenichev I. Ph., Bruzgina T. S.* Cooperative quinapril and angiotensin influence on the fatty acids content in rats blood plasma with arterial hypertension ..... 73
- Novokhatska T., Klymenko K., Dosenko V., Soloviev A.* Fact or fancy: Does the high level of PKC-delta gene expression contribute to potassium channels malfunction at arterial hypertension and diabetes? ..... 78
- Pryskoka A. O.* Acute intraperitoneal toxicity study of silver nanoparticles ..... 85
- Pyaskovskaya O. N., Gorbik G. V., Yakshibaeva Yu. R., Rodionova N. K., Momot V. Y., Solyanik G. I.* Correction of cancer-associated anemia by grape polyphenols ..... 91
- Pakryshen' S. V., Kylymnyk E. N.* Morpho-functional state of cardiomyocytes contractile apparatus in rats with doxorubicin cardiomyopathy and possible ways of its pharmacological correction ..... 99

- INFORMATION FOR DRUG`S SAFE USE** ..... 106

- PERSONALITIES** ..... 108