СПІВЗАСНОВНИКИ

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

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ

PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.
Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 6(41)/2014

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Kizub I. V. Rho-kinase: one of the main links in Ca^{2+} sensitization in diabetes-induced vascular smooth muscle hypercontractility 3

Слесарчук В. Ю. Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина 11

Шарикіна Н. І., Мєшкова Н. О., Міщенко О. В., Хавич О. О., Кудрявцева І. Г., Пенделюк С. І. Трансдукція мітогенних сигналів як основа створення протипухлинних таргетних препаратів (частина II) 19

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Котов О. О., Громов Л. О., Ярош О. К. Формування резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму за тривалого введення мишам 27

Макаренко О. В., Криворучко Т. М. Експериментальна оцінка антипаркінсонічної активності цитиколіну сумісно з амантадином 32

Нефьодов О. О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних аналгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу 37

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Добреля Н. В., Стрєлков Є. В., Хромов О. С., Клименко К. І., Новохацька Т. В., Соловйов А. І. Роль дельта-ізоформи протеїнкінази С у розвитку порушень коронарного кровотоку, що викликані цукровим діабетом 44

Мокляк Є. В., Важнича О. М., Андрусишина І. М. Вплив композитних наночастинок магнетиту на вміст заліза в органах та плазмі крові щурів за умов гострої крововтрати 51

Мохорт М. А., Кутовий Ю. М. Вплив похідних імідазо[1,2-а]азепінію на скоротливу активність ізольованого серця щура 59

Посохова К. А., Стечишин І. П. Ефективність препаратів кверцетину за експериментального цукрового діабету 66

Чікіткіна О. М., Кононенко Н. М., Лар`яновська Ю. Б. Вплив глікверину на ліпідний обмін та стан печінки щурів на тлі метаболічного синдрому 72

Щудрова Т. С., Заморський І. І. Порівняльна оцінка нефропротекторної активності органоспецифічних пептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів 81

Ярош О. К., Нагорна О. О., Кучеренко Л. І., Волуй А. В., Кузнєцова О. В. Кардіотропність нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після внутрішньом'язового введення 87

ОСОБИСТОСТІ

До 75-річчя видатного науковця 93

СОДЕРЖАНИЕ 95

CONTENT 96

м. Київ
Видавець: ТОВ «Видавничий дім «Авіцена», 2014 р.

© «Фармакологія та лікарська токсикологія», 2014 р.

© ВД «Авіцена», 2014 р.

УДК 612.133; 616.132

I. V. Kizub

Rho-kinase: one of the main links in Ca^{2+} sensitization in diabetes-induced vascular smooth muscle hypercontractility

SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the NAMS of Ukraine», Kiev

Key words: diabetes, protein kinase C, Rho-kinase, Ca^{2+} sensitization, vascular smooth muscle, vascular tone

Diabetes mellitus (DM) is a widespread syndrome that is rapidly rising in frequency throughout the world. Hyperglycemia and alterations of metabolism are the most severe components of DM [1]. Near 5–10 % of patients with DM have autoimmune type 1 insulin-dependent diabetes, whereas 90–95 % have type 2 DM (insulin-independent), which is a consequence of lifestyle patterns contributing to obesity [1]. Type 2 DM typically occurs in the context of a cluster of cardiovascular risk factors [1]. DM is known to cause multiple dysfunctions including cardiovascular diseases, which are major causes of mortality, end-stage renal disease, and blindness [2]. The macrovascular manifestations of DM, such as angiopathy, atherosclerosis, medial calcification, and arterial hypertension, have been shown to mostly locate in coronary and carotid arteries, cerebral vessels, and large peripheral arteries of the lower extremities [2]. The microvascular complications of DM include retinopathy, nephropathy, and peripheral neuropathy [2]. Increased blood flow and elevated vascular tone have also been documented for DM [2]. A growing body of evidence indicates that endothelial and smooth muscle dysfunctions are present in various regions of the vasculature in both diabetic patients and animal models of DM [3, 4]. Hyperglycemia is considered to be a key factor responsible for the development of vascular complications in DM [2]. Several hyperglycemia-associated mechanisms, including oxidative stress have been identified to contribute to the development of DM-associated vascular dysfunctions [5]. Dysfunctions in the regulation of vascular cells permeability, growth, angiogenesis, and vascular smooth muscle contractility in DM have been shown to involve Rho-associated coiled-coil kinase (Rho-kinase or ROCK) up-regulation [4, 5].

© I. V. Kizub, 2014

Rho-kinase

The Rho-kinases or ROCKs is a small group of serine/threonine kinases, regulatory enzymes that also play an important role in vascular function regulation [6].ROCKs are represented with two isoforms encoded by two different genes, ROCK-1 (ROCK I or ROKβ) and ROCK-2 (ROCK II or ROKα) [7]. Both isoforms are highly homologous and are expressed in vascular tissues [8]. ROCK is mainly dispersed in the cytoplasm, but is partially translocated to the peripheral membrane upon activation [7].

ROCK is activated by monomeric G proteins (small GTPases) of the Rho (Ras homolog) protein family [6, 7, 9–11]. The Rho protein family consists of at least 20 members classified into 5 groups: the Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd, and RhoBTB subfamilies, whereas RhoD, Rif, and RhoH/TTF do not fall into any obvious grouping [11]. Proteins of the Rho family regulate a wide range of fundamental cell functions such as contraction, motility, proliferation, and apoptosis [11]. RhoA, belonging to the Rho-like subfamily, is the main upstream activator of ROCK [11]. Binding of the active GTP-bound form of RhoA to the Rho-binding domain stimulates the phosphotransferase activity of ROCK by disrupting the interaction between the catalytic and the inhibitory C-terminal regions of the enzyme [10]. However, the

stimulatory effect of RhoA on ROCK activity is limited. RhoA functions as a molecular switch which cycles between an inactive GDP-bound and active GTP-bound conformations. Activated RhoA interacts with downstream targets leading to cellular responses. Upon activation RhoA is translocated from the cytosol to the cell membrane [10]. Activation of Rho GTPases is regulated by several mechanisms including the activation of heterotrimeric G protein-coupled receptors [10]. Three types of regulators of Rho proteins have been identified. Rho guanine-nucleotide exchange factors (RhoGEF) promote the formation of the GTP-bound form of Rho proteins [11], whereas Rho GTPase activating protein (RhoGAP) accelerates the intrinsic GTPase activity resulting in the GDP-bound form [11]. Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor (RhoGDI) binds to a subset of Rho proteins, inhibits nucleotide exchange and sequesters these proteins away from the membrane, where normally they would be active [11]. On the other hand, it has been shown that ROCK-1 activity can be inhibited by the Rho protein Rnd3/RhoE which binds to the N-terminal region of ROCK-1 and prevents RhoA binding to the Rho-binding domain [12]. Two other small G proteins of the Ras superfamily, Gem and Rad, have been shown to inhibit the ROCK function [12].

The Rho/ROCK signaling pathway has been implicated in the pathogenesis of diabetes. It has been demonstrated that ROCK activity is enhanced in vascular tissues in diabetes [8, 9, 13, 14]. Recent publications demonstrated that diabetes type 1-induced vascular dysfunction in the rat aorta arises due to an upregulation of ROCK-2 isoform [15]. An increased level of ROCK-2 protein expression in corpus cavernosum of diabetic mice and retinal vessels of type 1 model diabetic rats [16] has also been reported. ROCK-1 gene and protein upregulation has also been reported from different vessels in various diabetic animal models [14]. The mRNA and protein levels of RhoA are also increased in arteries of diabetic rats and mice [9, 14, 16, 17]. The mechanism of RhoA and ROCK activation by high glucose levels remains to be defined. However ROS, thought to play a central role in the pathogenesis of vascular diabetic complications, have been shown to activate RhoA [18]. In another study, the authors reported that glucose-induced calcium-independent phospholipase $A_2\beta$ ($iPLA_2\beta$) upregulation may activate the RhoA/ROCK via 12/15-lipoxygenases in vascular smoth muscle cells (SMCs) [19]. On the other hand, it has been suggested that activation of ROCK in DM and high glucose level can be mediated by ErbB2 and Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) [20]. ErbB2 is a transmembrane tyrosine kinase receptor of the epidermal growth factor receptor (ErbB/EGFR) family which downstream effector in vascular SMCs is ERK1/2 [20] (see Figure).

Mechanisms of Ca^{2+} sensitization in vascular SMCs in DM

While numerous studies have demonstrated that DM impairs vascular function by inhibiting endothelium-dependent vasodilatation [3, 4], others have shown that DM enhances vascular contractility in an endothelium-independent manner [13, 21–23]. A large number of studies suggest that vascular smooth muscle contractile responses are dramatically enhanced in diabetes [9, 13, 22–24].

It is well known that vascular smooth muscle contractile responses are primarily triggered by increased intracellular concentration of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Both increased Ca^{2+} influx and release of $Ca^{2+}$from intracellular stores have been proposed to be involved in DM, contributing to the enhanced vascular reactivity [25]. There is evidence that stimulation of arteries with α_1-adrenomimetics is associated with increased Ca^{2+} influx in diabetic vessels over normal ones [24]. Other authors have also reported increased intracellular Ca^{2+} to be involved in the diabetic vascular hyperreactivity [24, 25]. However, there is a controversy here with reports of inhibition of voltage- and store-operated Ca^{2+} entry channels in vascular SMC in DM [26]. Alternatively, Ca^{2+} sensitization of the con-

tractile proteins has been proposed as a more general mechanism of the elevated DM-associated vascular contractility [9, 17, 22, 23]. One striking observation supporting this view is the enhanced contractile response to α_1-adrenomimetics by arteries from diabetic rats and mice which is not associated with $[Ca^{2+}]_i$ changes [13]. Similarly, under high glucose conditions, thromboxane A_2-induced aortic smooth muscle contraction has also been shown to increase independently from intracellular calcium concentration [27].

Phosphorylation and dephosphorylation of the 20-kDa myosin light chain (MLC) are the major regulatory mechanisms of smooth muscle contractility. Increased $[Ca^{2+}]_i$ activates calmodulin-dependent MLC kinase (MLCK) which catalyzes the phosphorylation of MLC at Thr18 and Ser19 leading to actin-myosin interaction and vascular smooth muscles contraction [28]. On top of this primary regulatory pathway, several modulatory pathways exist in smooth muscles that can alter the magnitude of the force that is developed at any given $[Ca^{2+}]_i$ [28]. ROCK-mediated [6, 10] mechanisms have been shown to be involved in elevated myofilament sensitivity to Ca^{2+}.

These pathways converge to phosphorylate an inhibitory protein CPI-17 at Thr38 [28-30] (see Figure). The CPI-17, or Protein kinase C (PKC) – dependent protein phosphatase-1 (PP1) inhibitor of 17 kDa, effects on smooth muscle myosin light chain phosphatase (MLCP) [28–30]. The MLCP holoenzyme of smooth muscles is a heterotrimer consisting of three subunits: the 130-kDa, 38-kDa, and 21-kDa subunit [31]. The 38-kDa subunit is identified as catalytic subunit PP1cδ. The 130-kDa subunit is a regulatory and myosin-bound MLCP targeting subunit 1 (MYPT1) [31]. Phosphorylated CPI-17 directly binds to MLCP and inhibits its activity [32]. Inhibition of MLCP results in a higher level of MLC phosphorylation for any given level of $[Ca^{2+}]_i$ and activity of MLCK [32]. This phenomenon, known as Ca^{2+} sensitization of smooth muscles, could thereby maintain vascular contraction [10].

ROCK-mediated SMCs Ca^{2+} sensitization in DM

Numerous studies have demonstrated that enhanced contractile responses to α-adrenomimetics, angiotensin II (ANG II), and 5-hydroxytryptamine (5-TH) in vessels from animal models of both types of DM [4, 9, 13, 20, 24, 33] are mediated by ROCK.

For increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity in the DM ROCK-mediated mechanism have been shown [6, 9, 10, 23, 30, 31]. In this mechanism, ROCK phosphorylates CPI-17 at Thr38 [28–30] which then directly binds to PP1cδ and inhibits the activity of MLCP [32] (see Figure). In addition, ROCK directly phosphorylates the MYPT1 subunit of MLCP at Thr855 and/or Thr850, Thr695, Thr696, and Thr697 [6, 10, 30, 31, 34] that also consequently inhibits the phosphatase activity.

In smooth muscle cells from STZ-induced model of type 1 diabetes rats, phosphorylation levels of MYPT1 in aorta has been shown to be significantly elevated [15]. Similar results have been obtained from the saphenous vein of patients with DM by Matsuo and coauthors, which have shown that the hyperreactivity to 5-HT in smooth muscles of these vessels is due to higher phosphorylation of MLCP, evident from elevation of the P (Thr696)-MYPT1 to total MYPT1 ratio [34].

Our research group has shown that elevated vascular SMC contractility in rats with STZ-induced DM is associated with enhanced Ca^{2+} sensitivity of contractile myofilaments and ROCK is clearly contribute to this process in diabetic vasculature [23]. ROCK-mediated calcium sensitization has been shown to be responsible for hypertension development in type 2 diabetes as well [13, 17]. It has also been suggested recently that ROCK mediate Ca^{2+} sensitization in smooth muscles of the intrarenal interlobar artery of type 2 diabetic (*ob/ob*) mice [13]. It has been shown that α_1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in penile [24] and gracilis arteries [33] from rat models of prediabetes/metabolic syndrome (obese Zucker rats) also involves ROCK-dependent Ca^{2+} sensitization.

Other authors have demonstrated that ROCK-mediated CPI-17 phosphorylation increase in vascular SMCs of the type 2 diabetic *db/db* mice model and SMCs cultured in presence of high glucose concentration [9]. Both activation of the ROCK pathways that phosphorylates CPI-17 and increase in total CPI-17 protein level seem to be involved [9], and CPI-17 up-regulation/activation in type 2 diabetic *db/db* mice vasculature is associated with a significant blood pressure increase [35].

Interaction between ROCK and PKC in mechanisms of SMCs Ca^{2+} sensitization in DM

A number of papers have reported a link between the ROCK- and PKC-mediated pathways in diabetes orunder high glucose conditions. PKC is presented with a family of serine/threonine kinases, with 10 isoforms and has been reported to be also involved in mechanisms of SMCs Ca^{2+} sensitization in DM [36].

Hyperglycemia in DM results in an overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the ensuing oxidative stress which contributes to the activation of PKC [36]. Furthermore, there is strong evidence that PKC activation is mediated, at least in part, by induction of oxidative stress and increased production of ROS [37]. In vascular tissues, PKC activation can also be mediated by diacylglycerol (DAG) [36] which has been shown to be elevated in DM [21, 27]. Hyperglycemia can enhance the amount of DAG primarily by increasing *de novo* DAG synthesis from the glycolytic intermediate dihydroxyacetone phosphate (DHAP), as well as by inducing phosphorylation of the phospholipase Cγ (PLCγ) [21, 36] (Figure).

Some investigations suggest that ROCK is upstream of PKC in diabetic bladder [38] and diabetic cardiomyocytes [39], whereas in diabetic vascular SMC ROCK has been reported to be down-

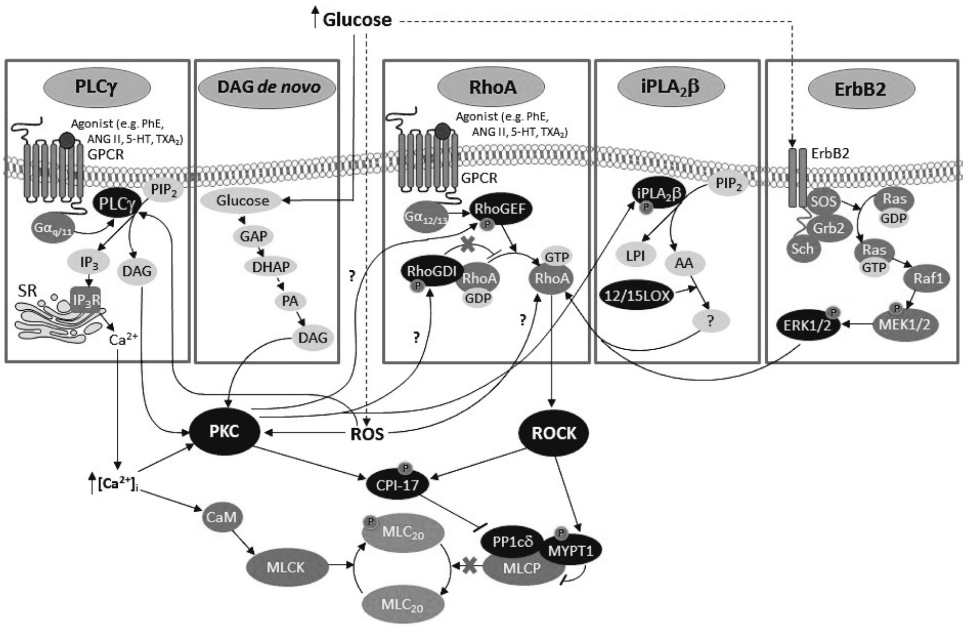

Figure. A scheme illustrating the ROCK-mediated mechanisms of contractile proteins Ca^{2+} sensitization in vascular smooth muscle cells in DM

DHAP – dihydroxyacetone phosphate; GAP – glyceraldehyde-3-phosphate; GPCR – G-protein coupled receptor; Grb-2 – growth factor receptor-bound protein 2; MEK1/2 – mitogen-activated protein kinase kinases 1 and 2; PA – phosphatidic acid; Raf1 – rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene protein kinase 1; Ras – rat sarcoma protein; Sch–Src homology 2 domain containing transforming protein; SOS –«sonof sevenless» homolog protein; TXA_2 – Thromboxane A_2. Definitions of other abbreviations see in the main text.

stream of PKC [9, 20]. Xie and coauthors have shown that PKC in vascular SMC is required for high glucose-induced ROCK activation and consequently CPI-17 phosphorylation [9]. These authors also suggest that, although PKC can directly phosphorylate CPI-17 upon some agonist stimulation in the vascular smooth muscle tissue under physiological conditions, PKC is not the kinase that directly phosphorylates CPI-17 in the presence of high glucose [9]. It has been shown that ROCK mRNA and protein levels can be upregulated through PKC and it is luckily that under diabetic conditions RhoA/ROCK and CPI-17 are downstream effectors of PKC [9]. More recently, the same group of researchers has shown that high glucose-induced activation of PKC leading to activation of iPLA2β and up-regulation of RhoA/ROCK via 12/15-lipoxygenases, thereby contributes to diabetes-associated vascular smooth muscle Ca^{2+} sensitization and hypercontractility [19]. Products of the phospholipase A_2 enzymes group include arachidonic acid which can be rapidly metabolized to a variety of mediators by lipoxygenases and other oxygenases to a number of bioactive eicosanoids [40]. However, it remains unclear how the catalytic activity of the 12/15-lipoxygenase may activate RhoA/ROCK/CPI-17. It is possible to assume, that PKC may mediate high glucose-induced activation of RhoA via phosphorylation of RhoGDI or RhoGEF [41] (Figure).

Conclusion

The presented data suggest that ROCK in vascular SMC highly contribute to enhanced vascular tone and arterial hypercontractility in diabetes by mediating SMC Ca^{2}+-sensitization. Our review shows that ROCK are potential therapeutic targets for treating vascular diabetic complications. Developing innovative pharmacological approaches that could modulate ROCK activity is highly important for new strategies that might prove clinical relevancy in preventing the development and/or retarding the progression of diabetes-associated vascular complications.

1. *Unwin N.* The IDF diabetes atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action / N. Unwin, D. Gan, D. Whiting // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2010. – V. 87. – P. 2–3.
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. *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. – P. 1–30.
4. Acute Rho-kinase inhibition improves coronary dysfunction *in vivo*, in the early diabetic microcirculation / J. T. Pearson, M. J. Jenkins, A. J. Edgley [et al.] // Cardiovasc. Diabetol. – 2013. – V. 12. – P. 111.
5. *Geraldes P.* Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Geraldes, G. L. King // Circ. Res. – 2010. – V. 106. – P. 1319–1331.
6. *Schofield A. V.* Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease / A. V. Schofield, O. Bernard// Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – V. 48, № 4. – P.301–316.
7. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho / T. Matsui, M. Amano, T. Yamamoto [et al.] // EMBO J. – 1996. – V. 15. – P. 2208–2216.
8. *Nuno D. W.* Sex-dependent differences in Rho activation contribute to contractile dysfunction in type 2 diabetic mice / D. W. Nuno, J. S. Harrod, K. G. Lamping // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2009. – V. 297, № 4. – P. H1469–H1477.
9. Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells / Z. Xie, W. Su, Z Guo [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2006. – V. 69. – P. 491–501.
10. *Loirand G.* Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology / G. Loirand, P. Guerin, P. Pacaud // Circ. Res. – 2006. – V. 98. – P. 322–334.
11. *Burridge K.* Rho and Ractake center stage / K. Burridge, K. Wennerberg // Cell. – 2006. – V. 116. – P. 167–179.
12. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway / Y. Ward, S. F. Yap, V. Ravichandran [et al.] // J. Cell Biol. – 2002. – V. 157. – P. 291–302.
13. Two types of over-contraction are involved in intrarenal artery dysfunction in type II diabetic mouse / K. Nobe, Y. Takenouchi, K. Kasono [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2014. – published online before print.
14. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction / T. J. Bivalacqua, H. C. Champion, M. F. Usta [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – P. 9121–9126.

15. *Cicek F. A.* Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta / F. A. Cicek, H. B. Kandilci, B. Turan // Cardiovasc. Diabetol. – 2013. – V. 12. – P. 51.
16. Activated Rho kinase mediates diabetes-induced elevation of vascular arginase activation and contributes to impaired corpora cavernosa relaxation: Possible involvement of p38 MAPK activation / H. A. Toque, K. P. Nunes, L. Yao [et al.] // J. Sex. Med. – 2013. – V. 10, № 6. – P. 1502–1515.
17. *Sandu O. A.* Diabetes in the Goto-Kakizaki rat is accompanied by impaired insulin- mediated myosinbound phosphatase activation and vascular smooth muscle cell relaxation / O. A. Sandu, L. Ragolia, N. Begum // Diabetes. – 2000. – V. 49, № 12. –P. 2178–2189.
18. *Knock G. A.* Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function / G. A. Knock, J. P.T. Ward //Antioxid. Redox. Signal. – 2011. – V. 15, № 6. – P. 1531–1547.
19. Role of calcium-independent phospholipase A2beta in high glucose-induced activation of RhoA, Rho kinase, and CPI-17 in cultured vascular smooth muscle cells and vascular smooth muscle hypercontractility in diabetic animals / Z. Xie, M. C. Gong, W. Su [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285. – P. 8628–8638.
20. Activation of ErbB2 and downstream signalling via Rho kinases and ERK1/2 contributes to diabetes-induced vascular dysfunction / S. Akhtar, M. H. M. Yousif, G. [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 6. – P. e67813.
21. Novel diacylglycerol kinase inhibitor selectively suppressed an U46619-induced enhancement of mouse portal vein contraction under high glucose conditions / K. Nobe, M. Miyatake, H. Nobe [et al.] // Brit. J. Pharmacol. – 2004. – V. 143. – P. 166–178.
22. *Mueed I*. Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to α-adrenoceptor stimulation / I. Mueed, L. Zhang, K. M. MacLeod // Brit. J. Pharmacol. – 2005. – V. 146. – P. 972–982.
23. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats / I. V. Kizub, O. O. Pavlova, C. D. Johnson [et al.] // Brit. J. Pharmacol. – 2010. – V. 159, № 8. – P.1724–1731.
24. Impaired Ca^{2+} handling in penile arteries from prediabetic Zucker rats: involvement of Rho kinase / N. Villalba, C. Contreras, M. Hernández [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011.– V. 300. – P. H2044–H2053.
25. Evidence for mechanistic alterations of Ca^{2+} homeostasis in type 2 diabetes mellitus / M. Balasubramanyam, R. A. Balaji, B. Subashini, V. Mohan // Int. J. Exp. Diabetes Res.– 2001. – V.1. – P.275–287.
26. Altered l-type Ca^{2+} channel currents in vascular smooth muscle cells from experimental diabetic rats / R. Wang, Y. Wu, G. Tang [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2000. – V. 278. – P.H714–H722.
27. High-glucose enhances a thromboxane A_2-induced aortic contraction mediated by an alteration of phosphatidylinositol turnover / K. Nobe, H. Suzuki, H. Nobe [et al.] // J. Pharmacol. Sci. – 2003. – V. 92. – P. 267–282.
28. *Schubert R.* The emerging role of Ca^{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction / R. Schubert, D. Lidington, S. S. Bolz // Cardiovasc. Res. – 2008. – V. 77. – P. 8–18.
29. Senba S. Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle / S. Senba, M. Eto, M. Yazawa // J. Biochem. (Tokyo). – 1999. – V. 125. – P. 354–362.
30. *Swärd K.* The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction / K. Swärd, M. Mita, D. P. Wilson [et al.] // Curr. Hypertens. Rep. – 2003. – V. 5, № 1. – P. 66–72.
31. Ichikawa K. Phosphorylation of the large regulatory subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity / K. Ichikawa, M. Ito, D. J. Hartshorne // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 4733–4740.
32. *Eto M.* Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors / M. Eto // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – P. 35273–35277.
33. Didion S. P. Cerebral vascular dysfunction in TallyHo mice: a new model of Type II diabetes / S. P. Didion, C. M. Lynch, F. M. Faraci // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2007. – V. 292. – P. H1579–H1583.
34. The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM) / Y. Matsuo, M. Kuwabara, N. Tanaka-Totoribe [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 412. – P. 323–327.
35. Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in Type 2 diabetic db/db mice / W. Su, Z. Guo, D. C. Randall [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – V.2 95. – P. H1634–H1641.
36. *Kizub I. V.* Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus / I. V. Kizub, K. I. Klymenko, A. I. Soloviev // Int. J. Cardiol. – 2014. – V. 174. – P. 230–242.
37. 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 / T. Inoguchi, R. Battan, E. Handler [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 11059–11063.

38. Glucose-dependent enhancement of diabetic bladder contraction is associated with a rho kinase-regulated protein kinase C pathway / K. Nobe, T. Yamazaki, N. Tsumita [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – V. 328. – P. 940–950.
39. Diabetes-induced increased oxidative stress in cardiomyocytes is sustained by a positive feedback loop involving Rho-kinase and PKCβ2 / H. Soliman, A. Gador, Y.-H. Lu [et al.] //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2012. – V. 303, № 8. – P. H989–H1000.
40. *Dennis E. A.* Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2 / E. A. Dennis // J. Biol. Chem. – 1994. –V. 269, № 18. – P. 13057–13060.
41. Protein kinase C alpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement / M. Holinstat, D. Mehta, T. Kozasa [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 28793–28798.

І. В. Кізуб

Rho-кіназа: одна з головних ланок у Ca^{2+}-сенситизації за індукованої діабетом гіперскоротливості судинних гладеньких м'язів

Цукровий діабет є комплексним синдромом, що призводить до чисельних порушень, у тому числі судинних дисфункцій. Rho-залежна кіназа (RhoK) є важливим регуляторним ферментом, що опосередковує передачу сигналів у реалізації багатьох судинних функцій, у тому числі скоротливості судинних гладеньких м'язів. Чисельні дослідження показали, що скоротливі відповіді судинних гладеньких м'язів значною мірою підвищені за умов цукрового діабету. RhoK робить суттєвий внесок у цей процес, опосередковуючи зростання чутливості скоротливих білків до іонів Ca^{2+} (або Ca^{2+}-сенситизацію) у судинних гладеньком'язових клітинах. За умов цукрового діабету опосередковані RhoK внутрішньоклітинні сигнальні шляхи спрямовані на фосфорилювання інгібіторного білка CPI-17, який зв'язуючись із фосфатазою легких ланцюгів міозину (ФЛЛМ) призводить до пригнічення її активності. Окрім того, RhoK викликає пригнічення активності ФЛЛМ за рахунок фосфорилювання її таргетної субодиниці 1 (MYPT1). Наслідком пригнічення ФЛЛМ є зростання фосфорилювання легких ланцюгів міозину незалежно від внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+}та рівня активності кінази легких ланцюгів міозину. Ca^{2+}-сенситизація гладеньких м'язів, таким чином, може суттєво підвищувати скоротливість судинної стінки за умов цукрового діабету. Багато досліджень також показали зв'язок між RhoK- та протеїн кіназа С (ПКС)-опосередкованими сигнальними шляхами за умов діабету. При цьому встановлено, що в стінці діабетичних судин RhoK може бути активована ПКС. Таким чином, проаналізовані дані показують, що RhoK є важливою фармакологічною мішенню для лікування судинних ускладнень, що пов'язані з цукровим діабетом.

Ключові слова: діабет, Rho-кіназа, Ca^{2+}-чутливість, судинні гладенькі м'язи, судинний тонус

И. В. Кизуб

Rho-киназа: одно из главных звеньев в Ca^{2+}-сенситизации при индуцированной диабетом гиперсократимости сосудистых гладких мышц

Сахарный диабет является комплексным синдромом, приводящим к многочисленным нарушениям, включая сосудистые дисфункции. Rho-зависимая киназа (RhoK) – важный регуляторный фермент, опосредующий передачу сигналов в реализации многих сосудистых функций, включая сократимость гладких мышц сосудов. Многочисленные исследования показали, что сократительные ответы гладких мышц сосудов в значительной степени увеличены в условиях сахарного диабета. RhoK вносит значительный вклад в этот процесс, опосредуя повышение чувствительности сократительных белков к ионам Ca^{2+} (или Ca^{2+}-сенситизацию) в гладкомышечных клетках сосудов. При сахарном диабете опосредованные RhoK внутриклеточные сигнальные пути направлены на фосфорилирование ингибиторного белка CPI-17, который, связываясь с фосфатазой легких цепей миозина (ФЛЦМ), приводит к угнетению ее активности. Кроме того, RhoK вызывает угнетение активности ФЛЦМ за счет фосфорилирования ее таргетной субъединицы 1 (MYPT1). Следствием угнетения ФЛЦМ является повышение фосфорилирования легких цепей миозина независимо от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и уровня активности киназы легких цепей миозина. Ca^{2+}-сенситизация гладких мышц, таким образом, может существенно повышать сократимость сосудистой стенки при сахарном диабете. Многие исследования также показали связь между RhoK- и протеин киназа С (ПКС) – опосредованными сигнальными путями при диабете. При этом установлено, что в стенке диабетических сосудов RhoK может быть активирована под действием ПКС. Таким образом, проанализированные данные показывают, что RhoK является важной фармакологической мишенью для лечения сосудистых осложнений, связанных с сахарным диабетом.

Ключевые слова: диабет, Rho-киназа, Ca^{2+}-чувствительность, сосудистые гладкие мышцы, сосудистый тонус

I. V. Kizub

Rho-kinase: one of the main links in Ca^{2+} sensitization in diabetes-induced vascular smooth muscle hypercontractility

Diabetes is a complex syndrome which leads to multiple dysfunctions including vascular disorders. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) is important regulatory enzyme mediating signal transduction in a number of vascular functions, including vascular smooth muscle contractility. Many studies have shown that vascular smooth muscle contractile responses are dramatically enhanced in diabetes. ROCK significantly contributes to this process by mediating elevation in sensitivity of contractile proteins to Ca^{2+}ions (or Ca^{2+} sensitization)in vascular smooth muscle cells. In diabetes mellitus ROCK-mediated pathways converge to phosphorylate the inhibitory protein CPI-17 which binds to myosin light chain phosphatase (MLCP) and inhibits its activity. Besides, ROCK phosphorylates myosin light chain phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) which also inhibits the phosphatase activity. Inhibition of MLCP results in a higher level of myosin light chain phosphorylation for any given intracellular level of Ca^{2+} and activity of the myosin light chain kinase. Ca^{2+} sensitization of smooth muscle, thus, could potentially maintain vascular contraction in diabetes. A link between the ROCK- and protein kinase C (PKC)-mediated pathways in diabetic vascular smooth muscle cells has been shown, assuming that the ROCK is downstream effectors of PKC. The data analyzed suggest that ROCK isan important therapeutic targetfor treating diabetes-related vascular complications.

Key words: diabetes, Rho-kinase, Ca^{2+} sensitization, vascular smooth muscle, vascular tone

Надійшла: 17.11.2014 р.

Контактна особа: Кізуб Ігор Володимирович, старший науковий співробітник, канд. біол. наук, 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

УДК 615.32:615.214(01)

В. Ю. Слесарчук

Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Ключевые слова: кверцетин, липофлавон, корвитин, антиоксиданты, нейропротекторы

Сегодня в литературе появились важные и содержательные обзоры, посвященные последним исследованиям препаратов кверцетина и перспективности их применения для профилактики и лечения многих заболеваний. Из обобщенных литературных данных видно насколько широк спектр биохимических и фармакологических свойств флавоноида кверцетина [1–3].

Известно, что большинство агликонов флавоноидов и их гликозиды обладают мощным антиоксидантным эффектом. Кверцетин способен выполнять функции скавенджера супероксидного радикала, синглетного кислорода и участвовать в процессах ингибирования образования липидных гидропероксидных радикалов [3, 4]. Кверцетин, нейтрализуя агрессивные кислородсодержащие и нитрозильные радикалы, обрывая цепи свободнорадикальных реакций, способен приостанавливать многие патологические процессы в клетке, обеспечивать надежную защиту ее гомеостаза и полноценную жизнедеятельность организма в целом.

Известно, что продукты свободнорадикального окисления являются ключевыми агентами оксидативного стресса в клетке, приводящего к развитию многих патогенных ситуаций, а затем к возникновению заболеваний. Поэтому предупреждение образования радикалсодержащих веществ или их нейтрализация флавоноидами является важным залогом удачной терапии.

Кверцетин – модулятор активности ферментов. В основе биохимического и фармакологического эффектов кверцетина лежит избирательное ингибирующее действие относительно множества важных энзимов клетки, что позволяет ставить его в ряд специфических биорегуляторов многих ферментных процессов [5, 6]. Это уникальное свойство кверцетина необходимо принимать во внимание, поскольку с его помощью возможно регулирование многих патологических нарушений, происходящих в отдельных клеточных структурах или в целом организме.

Ингибирование кверцетином ферментов с АТФ-связывающими сайтами занимает особое место среди биохимических процессов. Такими, в большинстве случаев, являются протеинкиназы, митохондриальные АТФ-азы, миозин, Na^+/K^+ и Ca^{2+} плазматические АТФ-азы, топоизомераза II, АТФ-зависимые транспортные Р-гликопротеины (P-gp – переносчики с высокой клеточной проницаемостью – P-permeability) и Р-гликопротеины подгруппы MRP1 и 2 (multidrug resistant proteins) [7]. В этих случаях ингибирующее действие кверцетина, вероятно, обусловлено селективным связыванием его с активными АТФ-связывающими центрами ферментов, встроенными в мембрану. Высокая степень связывания и последующее ингибирование, по-видимому, предопределяются аффинностью подобного взаимодействия [7].

С другой стороны, кверцетин и, особенно его метаболиты, взаимодействуя с АТФ-зависимыми Р-гликопротеинами, участвуют в трансцеллюлярном переносе [8–10]. Последнее свидетельствует о том, что кверцетин и его метаболиты оказывают модулирующее действие на различные ферментные системы.

Ингибирование кверцетином протеинкиназ является весьма значимым фактором в регуляции клеточного деления и пролиферации. Его участие в

© В. Ю. Слесарчук, 2014

этих жизненно важных процессах клетки, от которых зависит ее развитие, протекание и/или исход многих патологических нарушений, свидетельствует о проявлении им множественных фармакологических свойств.

Особенности химического строения молекулы кверцетина определяют его способность ингибировать ферменты, отвечающие за различные окислительные реакции и процессы. Такими ферментами, в частности, являются липоксигеназы и циклооксигеназы, которые подвергают биотрансформации арахидоновою кислоту в такие биологически активные вещества, как лейкотриены и простагландины [11].

Ингибирование кверцетином липоксигеназ различных подтипов (ЛО-5, ЛО-12 и ЛО-15), участвующих в окислении арахидоновой кислоты, может быть использовано для коррекции многих патологических процессов [12].

Весьма чувствительной к действию кверцетина является ксантиноксидаза, фермент, катализирующий в организме реакцию окисления ксантина до мочевой кислоты. Известно, что ксантиноксидазный путь играет важную роль в окислительном повреждении тканей, так как в процессе работы этого фермента образуется значительное количество активных форм кислорода. Кверцетин ингибирует ксантиноксидазу, уменьшая оксидантное повреждение органов и тканей [13] .

Важным является взаимодействие кверцетина с цитохромом Р450 (в частности с изоформами CYP 1А1, 1Ф2, 1В1, 3А4 и др.), в основе которого лежит высокоселективный механизм ингибирования функциональной активности изоформ цитохрома Р450. Из литературных источников известна направленность путей регуляции кверцетином (через систему изоформ цитохрома Р450) метаболических превращений лекарственных препаратов и ксенобиотиков [3, 13].

Результаты экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, приведенные в научной литературе, свидетельствуют о выраженном ингибирующем действии кверцетина на ряд жизненно важных ферментов клетки. Это позволяет оценить наиболее значимые фармакологические свойства кверцетина и прогнозировать его новые возможности как лекарственного средства.

Нейротропная активность кверцетина. Распространенность церебральных патологий занимает особое место среди причин заболеваемости, смертности, длительной нетрудоспособности человека, снижения его интеллектуального потенциала. Патогенез и клиническая картина церебральных патологий достаточно разнообразная. Однако все эти заболевания объединяет неспецифический стрессорный компонент, который проявляется в интенсификации процессов свободно-радикального окисления (СРО) и гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) биоэнергетическими и нейрохимическими системами головного мозга. АФК в условиях антиоксидантной недостаточности приводят к окислительной модификации липидов, белков и нуклеиновых кислот. Избыток АФК выступает как причина деструкции мембран, нарушения проницаемости барьеров, гибели клеток мозга, расширения зоны некроза. В связи с этим, применение препаратов с антиоксидантными свойствами для церебропротекции является патогенетически обоснованным.

Известно, что одно из самых распространенных заболеваний ЦНС – ишемические расстройства. Во время ишемии усиливается продукция свободных радикалов, что приводит к повреждению клеточных мембран и гибели клеток [14–17]. Пусковым механизмом ишемического каскада является энергетический дефицит, который в нейронах «включает» так называемый глутамат-кальциевый каскад, к стадии «индукции» которого относят деполяризацию мембран, нарушения активного ионного транспорта и компенсаторный избыточный выброс возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата и аспартата) [17]. Нарушение АТФ-зависимого трансмембранного ионного транспорта приводит к уменьшению активности таких ферментов, как Na-K-АТФазы, Ca-Mg-АТФазы, к накоплению внутриклеточного кальция – основного триггера конечных механиз-

мов каскада (оксидантного стресса, дисбаланса цитокинов, локального воспаления, микроциркуляторных клеточных реакций) [14–17]. Таким образом, церебральная ишемия сопровождается активацией патобиохимических и молекулярных механизмов, обусловливающих структурно-морфологические изменения в нейронах, глие. Эффективным стратегическим направлением коррекции острой и хронической ишемии мозга является воздействие на различные звенья ишемического каскада.

В последние годы в терапии церебральных патологий большое внимание уделяется препаратам с мультимодальным действием. К таким препаратам относятся препараты флаваноида кверцетина. Они оказывают антиоксидантное, иммуномодулирующее, мембраностабилизирующее, кардиопротекторное, антигипоксическое и противовоспалительное действие, усиливают репаративные процессы. Многочисленные исследования последних лет подтвердили, что кверцетин обладает нейропротекторным действием при нейродегенеративных заболеваниях, а также в условиях ишемии головного мозга.

На модели экспериментального фототромбоза показано, что у крыс при внутрибрюшинном введении кверцетина (в дозе 7,5 мг/кг через 1 час после повреждения головного мозга, каждые 12 часов в течение 3 дней) снижается образование матриксной металлопротеиназы-9, индуцированное ишемией. Известно, что матриксные металлопротеиназы способны разрушать все типы белков внеклеточного матрикса, опосредуя, таким образом, истончение межклеточного матрикса, лизис тканей, склерозирование. Показано также, что кверцетин снижает постишемическое увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера и отек мозга у крыс [13, 18].

Кверцетин купирует последствия хронической ишемии. В одном из исследований проводили моделирование хронической ишемии мозга у крыс путем окклюзии сонных артерий. Внутрибрюшинное введение кверцетина (5 мг/кг) в течение 14 дней улучшило показатели обучаемости и памяти у крыс в водном лабиринте Морриса. В электрофизиологических экспериментах обнаружено, что у ишемизированных крыс кверцетин уменьшает ингибирование долговременной потенциации (ДП). Известно, что ДП проявляется в усилении синаптической передачи между нейронами и, по мнению многих ученых, ДП в гиппокампе и в других структурах головного мозга является физиологической основой обучения и памяти. Таким образом, кверцетин способен снижать дефицит обучаемости у крыс, вызванных хронической ишемией [18].

Также показано [19], что введение кверцетина уменьшает когнитивный дефицит у недоношенных крысят с перинатальной церебральной ишемией-гипоксией, индуцированной черепно-мозговой травмой, за счет увеличения количества клеток-предшественников олигодендроцитов (OPCs) субвентрикулярной зоны.

На модели экспериментального эквивалента болезни Альцгеймера у мышей продемонстрировано, что кверцетин значительно и дозозависимо увеличивает пролиферацию и синаптогенез в нейронах гиппокампа (снижение этих показателей является одной из основных причин деменции при данной патологии). В данном исследовании было показано, что кверцетин усиливает фосфорилирование фактора транскрипции CREB (cyclic-AMP Response Element Binding Protein) и увеличивает уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF – brain-derived neurotrophic factor), что может являться механизмом, лежащим в основе увеличения нейронной пролиферации и синаптогенеза [18, 20].

Нарушение функционирования холинергической системы лежит в основе патогенеза болезни Альцгеймера, экспериментальное моделирование которой вызывают введением скополамина. Кверцетин (вводимый в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно) предотвращает амнезию у животных, вызванную скополамином. Это еще один факт, подтверждающий терапевтический эффект кверцетина при нейродегенеративных заболеваниях.

В другом исследовании [21] показано, что нейротоксичный тяжелый металл кадмий (2,5 мг/кг) вызывает нарушения памяти и оказывает анксиогенный эффект; снижает активность АХЭ в коре головного мозга и гиппокампе экспериментальных животных, снижает содержание глутатиона и активность глутатионредуктазы, увеличивает содержание основных нейротоксичных продутов ПОЛ, изменяет активность Na^+,K^+- АТФ-азы. Введение кверцетина (внутрижелудочно в дозах 5, 25 или 50 мг/кг на протяжении 45 дней) полностью или частично предотвращает эффекты, индуцированные поступлением кадмия, что подтверждает его нейропротекторную роль [21].

Нейроантиоксидантный профиль препаратов кверцетина (Корвитина и Липофлавона). Существующие лекарственные формы препаратов кверцетин (гранулы, таблетки, порошок) являются достаточно эффективными при разных патологических состояниях. Однако терапевтический эффект от применения растворимых или инъекционных форм, конечно, проявляется значительно быстрее. Учитывая широкий спектр физиологической активности кверцетина, создание именно таких лекарственных форм имеет существенное значение.

Украинскими учеными была разработана и создана новая лекарственная форма – Корвитин – водорастворимый порошок для приготовления инъекций на основе синтетического модулятора растворимости поливинилпирролидона [14–16]. А на основе применения фосфатидилхолиновых липосом (ФЛ) был создан препарат «Липофлавон». Применение ФЛ, как транспортного средства, дало возможность вводить препарат непосредственно в кровь и благодаря проникновению через фосфолипидный бислой мембраны быстро доставлять его к клеткам-мишеням.

В результате проведенных доклинических исследований установлено, что Корвитин имеет достаточно низкие показатели всех видов токсичности, не не обладает аллергенным и раздражающим действием при внутривенном введении. Также было установлено, что для Корвитина характерен мощный антиоксидантный эффект, торможение активности мембранных ферментов, особенно липооксигеназы, активация или сохранение уровня оксида азота в поврежденных тканях и крови, а также протекция мембраносвязанных ферментов, корригирующих ионный, а именно, кальциевый гомеостаз в клетках.

Широкий спектр фармакологических свойств препарата «Корвитин» и, в первую очередь, его антиоксидантное, противовоспалительное, мембраностабилизирующее действие, которое предопределено ингибирующим влиянием на важные ферментные системы клетки, стали инициирующим фактором в дальнейшем изучении препарата [22].

В экспериментальных работах [23, 24] было выявлено, что Липофлавон в дозе 0,1 мг/кг при параневральном введении позитивно влияет на процессы регенерации нервных волокон при травматическом повреждении нерва. Увеличивается количество нервных волокон и активность регенерации. Терапевтический эффект Липофлавона объясняют тем, что липосомальная форма, как продукт нанотехнологических разработок, имеет высокую тропность к клеточным мембранам, а кверцетин, как антиоксидант, защищает нервные клетки от окислительного стресса, активирует эндогенные антиоксидантные системы защиты, снижает развитие воспалительного процесса и повышает рост нейритов. Это способствует процессам регенерации нервных волокон и может предотвратить развитие дегенеративных процессов на поздних этапах восстановления. Липосомальная форма кверцетина ускоряет прорастание и миелинизацию нервных волокон. Даже при коротких сроках введения (10 дней) Липофлавон оказывает выраженный нейропротекторный эффект [23–25].

Клинические исследования препарата «Липофлавон» показали, что он обладает способностью возобновлять сократительную активность миокарда и гладких мышц сосудов, нарушающуюся под действием пероксинитрита. Это позволило использовать его для кор-

рекции нарушений гемодинамики при реперфузионных повреждениях миокарда. Изучение клеточных механизмов действия Липофлавона показало, что мембранопротекторный эффект препарата обусловлен как антиоксидантным действием кверцетина и ФЛ, так и его прямым влиянием на ионную проницаемость плазматической мембраны миокардиальных клеток. Таким образом, Липофлавон имеет способность восстанавливать структуру клеточных мембран, которая делает его использование более эффективным.

В наших экспериментальных работах [2, 25, 26] была изучена церебропротекторная активность препаратов кверцетина (Корвитина и Липофлавона) в условиях острого иммболизационного стресса (ОИС) и острого нарушения мозкового кровообращения (ОНМК). ОНМК моделировали путем билатеральной перевязки общих сонных артерий у крыс. Препараты вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг в пересчете на кверцетин на протяжении 4 суток. В условиях сформированной церебральной ишемии применение Корвитина и Липофлавона оказывает церебропротекторное действие: препараты предупреждали гибель животных, существенно снижали развитие неврологического дефицита, восстанавливали показатели поведенческих реакций, позитивно влияли на память и когнитивные процессы [25, 26].

В условиях моделирования ОНМК к 4 суткам на фоне введения препаратов кверцетина регистрировали нормализацию биоэнергетических процессов в тканях головного мозга (увеличивался уровень АТФ и АДФ на фоне снижения АМФ); наблюдали уменьшение содержания лактата, который уменьшает риск развития лактат-ацидоза. Липофлавон эффективно снижает интенсивность свободнорадикальных процессов и реактивирует антиоксидантную систему энзимов (зарегистрировано достоверное снижение содержания цитотоксичних продуктов ПОЛ на фоне повышения активности основных антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы). Применение Липофлавона вызывало выраженное угнетение процессов окислительной деструкции белка [25].

Сравнительный анализ церебропротекторной активности препаратов кверцетина по показателям структурных нарушений в сенсомоторной зоне фронтальной коры мозга обнаружил явное лидерство липосомальной формы кверцетина. Характер ее протекторного действия выражается в значительном увеличение количества нейронов, а также содержания в них РНК, уменьшении количества апоптотически и деструктивно измененных нейронов, повышении относительного количества выживших нейронов к числу апоптотических [25].

Экспериментальные исследования на модели ОИС показали, что профилактическое четырехдневное применение препаратов кверцетина в дозе 5 мг/кг предупреждало нарушения поведенческо-эмоциональной активности, а также процессов обучения у экспериментальных животных. Профилактическое применение препаратов кверцетина приводило к угнетению активности процессов ПОЛ и окислительной модификации белка (ОМБ) в различных отделах головного мозга (кора, гиппокамп, ствол), которые активировались на фоне ОИС. Экспериментальная терапия препаратами кверцетина вызывала снижение накопления нейротоксичных продуктов ОМБ (альдегид- и кетонфенилгидразонов), продуктов ПОЛ (содержание ТБК-реактантов), увеличивала активность антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы) в структурах головного мозга. Применение Корвитина продемонстрировало наибольшую антиоксидантную активность в условиях моделирования ОИС: угнетение процессов липопероксидации и окислительной модификации белка во всех структурах головного мозга (особенно выраженным эффект был в стволе) [25].

Механизм церебропротекторного действия препаратов кверцетина в условиях острого стресса и нарушения мозгового кровотока, вероятно, обусловлен их способностью ингибировать образование АФК, увеличивать активность антиоксидантных ферментов, положительно влиять на энергетиче-

ские процессы, что увеличивает возможность нейронов к выживанию и способствует сохранению когнитивных функций головного мозга.

В работах [27–30] была изучена сравнительная эффективность и механизмы действия препаратов «Корвитин» и «Липофлавон» (в дозах 10 и 15 мг/кг в пересчете на кверцетин) в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ) различной степени тяжести, а также в комбинации с алкогольной интоксикацией. Показано, что Корвитин (15 мг/кг) способствует скорейшему восстановлению двигательной активности в посттравматическом периоде изолированной ЧМТ средней степени, также минимизирует посттравматические изменения поведения, физической выносливости, координации движений и неврологический дефицит. При травме тяжелой степени наиболее эффективным препаратом по критериям снижения летальности и совокупности выше перечисленных показателей является Липофлавон (10 мг/кг). Липофлавон (в дозе 15 мг/кг) оказался более эффективным при сочетании алкологольной интоксикации с ЧМТ тяжелой степени. Препарат минимизирует посттравматические изменения изученных показателей, способствует максимальному сохранению гистоструктуры головного мозга, целостности сосудов головного мозга, предотвращая нейродеструктивные и нейродегенеративные процессы в ЦНС. Оба препарата кверцетина предотвращают развитие депрессии, тревожности, когнитивных нарушений в посттравматическом периоде; ингибируют образование первичных продуктов ПОЛ, стимулируют энергетический обмен и нормализуют утилизацию глюкозы. Липофлавон более эффективно уменьшает посттравматический эндотоксикоз [28–30].

Таким образом, установленные нейропротекторные свойства препаратов кверцетина – Корвитина и Липофлавона, основанные на мультимодальном спектре фармакологических эффектов, открывают потенциальную возможность их применения в медицинской практике в группах больных с риском развития цереброваскулярных нарушений.

Анализируя большой объем экспериментальных данных о терапевтической эффективности препаратов кверцетина, можем предполагать, что молекулярный механизм действия основывается на их способности блокировать синтез лейкотриенов, простагландинов, простациклинов и тромбоксанов, останавливая многие патологические пути развития ишемических состояний мозга, корректируют множественные патофизиологические поражения глиальных структур. Но достоверный механизм фармакотерапевтического действия предстоит еще установить в дальнейших исследованиях.

Знания о фармакологических и потенциальных терапевтических свойствах кверцетина свидетельствуют о перспективах применения различных лекарственных форм этого флавоноида в медицинской практике.

1. Історія розробки препарату «Корвітин» – розчинної форми кверцетину / Н. Максютіна, Л. Пилипчук, Л. Безпалько, А. Шаламай // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 5. – С. 31–38.
2. *Слєсарчук В. Ю.* Церебропротекторні властивості водорозчинної та ліпосомальної форм кверцетину / В. Ю. Слєсарчук, В. Й. Мамчур // Вісник фармакології та фармації. – 2010. – № 3. – С. 36–44.
3. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов, Е. Н. Музафаров. – Пущино : Synchrobook, 2013. – 310 с.
4. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes / Saija A., Scalese M., Lanza M [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – V. 19. – P. 481–486.
5. *Кудринская В. А.* Сорбционное концентрирование кверцетина и других флавоноидов и их определение различными методами: автореф. дис. на соискание научн. степени канд. хим. наук / В. А. Кудринская. – М., 2010. – 22 с.
6. *Левицкий А. П.* Роль полифенолов пищи в формировании местной неспецифической резистентности ротовой полости / А. П. Левицкий, О. Н. Воскресенский, С. В. Носийчук // Вісник стоматології. – 2005. – № 3. – С. 2–8.

7. Chow pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites / Xiao Chen, Ophelia Q. P. Yin, Zhong Zuo, Moses S. S. // Pharmac. Res. – 2005. – V. 22, № 6. – P. 892–901.
8. *Murata K.* Antioxidative flavonoid quercetin: implification of intestinal absorption and metabolism / Murata K., Terao J. // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. –V. 417. – P. 12–17.
9. *Youdim K. A*. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system / K. A. Youdim, B. Shukitt-Hale, J. A. Joseph // Free Radical Biol. Med. – 2004. – V. 37, № 11. – P. 1683–1693.
10. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models / Yuan Z., Chen L., Fan L. [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2006. – V. 12. – P. 3193–3199.
11. *Барабой В. А.* Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс. – 2006. – 461 с.
12. *Sadik C. D*. Inhibition of 15-lipoxydenase by flavonoids: structure-activity relations and mode action / C. D. Sadik, H. Sies, T. Schewe // Biochem Pharmacol. – 2003. – V. 65. – P.773–781.
13. *Роговский В. С.* Антиоксидантная и противовоспалительная активность производных дигидрокверцетина и их водорастворимых форм: дис. канд. мед. наук / В. С. Роговский. – М., 2013. – 137 с.
14. *Виничук С. М*. Поиск новых подходов к лечению острого ишемического инсульта / Виничук С. М., Прокопив М. М., Черенько Т. М. // Український неврологічний журнал. – 2010. – № 1. – С. 8–19.
15. *Виничук С. М*. Применение нового отечественного препарата «Корвитин в лечении острого ишемического инсульта / Виничук С. М. // Практична ангіологія. – 2010. – № 4 (33). – С. 12–19.
16. *Вірстюк О. А*. Клінічна ефективність комплексної терапії гострого ішемічного інсульту на тлі метаболічного синдрому із застосуванням препарату кверцетину «Корвітин» / Вірстюк О. А., Герасимчук Р. Д. // Український неврологічний журнал. – 2011. – № 3. – С. 18–29.
17. *Кузнецова С. М.* Клинические аспекты применения кверцетина у больных, перенесших ишемический инсульт / Кузнецова С. М., Егорова М. С., Скрипченко А. Г. // Журн. неврологии им. Манковского. – 2014. – Т. 2, № 3. – С. 34–40.
18. *Роговский В. С*. Антигипертензивная и нейропротекторная активность кверцетина и его производных / Роговский В. С., Шимановский Н. Л., Матюшин А. И. // Журн. Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012.– Т. 75. – № 9. – С. 37–41.
19. Quercetin improves hypoxia-ischemia induced cognitive deficits via promoting remyelination in neonatal rat / Qu X., Qi D., Dong F. [et al.] // Brain Res. – 2014. – № 1553. – P. 31–40.
20. Quercetin in hypoxia-induced oxidative stress: novel target for neuroprotection / A. K. Pandey, R. Patnaik , D. F. Muresanu [et al.] // Int Rev Neurobiol. – 2012.–V. 102. – P. 107–146.
21. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities / F. H. Abdalla, R. Schmatz, A. M. Cardoso [et all.] // Physiol Behav. – 2014. – № 135. – P. 152–167.
22. *Никонов В. В.* Нейропротективные возможности Корвитина для лечения острого ишемического инсульта (по материалам открытого рандомизированного исследования) [Электронный ресурс] / В. В. Никонов, И. Б. Савицкая // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 6. – Режим доступа: http://urgent.mif-ua.com/archive/issue-15105/article-15123/
23. *Храпай Е. В*. Липофлавон повышает регенерацию нервных волокон в условиях экспериментальной модели травмы периферического нерва / Е. В. Храпай // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2010. – Т. 10, № 1 (29). – С. 116–120.
24. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats / A. Ghosh, S. Sarkar, A. K. Mandal [et all.] // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 4. – P. e57735.
25. *Слєсарчук В. Ю.* Церебропротекторні ефекти препаратів кверцетина: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / В. Ю. Слєсарчук. – К., 2009. – 23 с.
26. *Слєсарчук В. Ю.* Нейропротекторні ефекти препаратів кверцетину при гострому порушенні мозкового кровообігу в експерименті / В. Ю. Слєсарчук, В. Й. Мамчур // Одеський медичний журнал. – 2008. – № 4. – С. 3–6.
27. *Садовник О. В*. Фармакотерапевтична ефективність корвітину при травматичному пошкодженні головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук / О. В. Садовник. – Харків, 2011. – 20 с.
28. *Жиляев С. О.* Экспериментальное исследование влияния корвитина и липофлавона на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и эндогенной интоксикации при черепно-мозговой травме / С. А. Жиляев, С. Ю. Штрыголь // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2013. – № 18 (161). – С. 146–151.
29. *Жиляєв С. О.* Церебропротективна активність корвітину та ліпофлавону при комбінації гострої алкогольної інтоксикації та черепно-мозкової травми в експерименті / С. О. Жиляєв, С. Ю. Штриголь // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2013. – Т. 1, Вип. 17. – С. 93–103.
30. *Жиляєв, С. Ю.* Психотропні ефекти корвітину та ліпофлавону у щурів із тяжкою черпно-мозковою травмою / С. О. Жиляєв, С. Ю. Штриголь // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 1 (24). – С. 34–38.

В. Ю. Слесарчук

Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина

В обзоре проведен анализ данных литературы и результатов собственных экспериментальных исследований, касающихся изучения нейропротекторных свойств кверцетина и его препаратов в разных лекарственных формах (водорастворимой и липосомальной). Знания о фармакологических и потенциальных терапевтических свойствах препаратов кверцетина свидетельствуют о перспективах применения его в медицинской практике.

Механизм действия препаратов кверцетина еще до конца не изучен. Но, учитывая принадлежность кверцетина к биофлавоноидам, можно предположить, что в основе действия лежит способность кверцетина тормозить гиперпродукцию АФК в нейрохимических и иммунных реакциях нейронов (экспрессия провоспалительных цитокинов, активность МАР-киназного каскада), увеличивать активность антиоксидантных ферментов, положительно влиять на энергетические процессы, что приводит к увеличению выживаемости нейронов и сохранению когнитивных функций головного мозга. Препараты кверцетина имеют множественные эффекты на клетку и могут одновременно влиять на несколько звеньев патобиохимического каскада, который возникает при ишемических и стрессовых повреждениях головного мозга.

Ключевые слова: кверцетин, липофлавон, корвитин, антиоксиданты, нейропротекторы

В. Ю. Слєсарчук

Нейропротекторні властивості препаратів кверцетину

У даній роботі проведено аналіз даних літератури та результатів власних експериментальних досліджень, що стосуються вивчення нейропротекторних властивостей кверцетину та його препаратів у різних лікарських формах (водорозчинної та ліпосомальної). Знання про фармакологічні та потенційні терапевтичні властивості кверцетину свідчать про перспективи застосування різних лікарських форм цього біофлавоноїду в медичній практиці.

Механізм дії препаратів кверцетину ще не повністю вивчено. Але, враховуючи приналежність кверцетину до біофлавоноїдів, можна припустити, що в основі дії препаратів кверцетину лежить їхня здатність гальмувати гіперпродукцію АФК нейрохімічними й імунними реакціями нейронів (експресія прозапальних цитокінів, активність МАР-кіназного каскаду), збільшувати активність антиоксидантних ферментів, позитивно впливати на енергетичні процеси, що збільшує можливість нейронів до виживання та сприяє збереженню когнітивних функцій головного мозку. Препарати кверцетину мають численні ефекти на клітину та можуть одночасно впливати на декілька ланок патобіохіміческого каскаду, який виникає при ішемічних і стресових пошкодженнях головного мозку.

Ключові слова: кверцетин, ліпофлавон, корвітин, антиоксиданти, нейропротектори

V.Yu. Slesarchuk

The neuroprotective properties of Quercetin containing preparations

In this review we have attempted to analyze the data of literature as well own experimental studies related to the research of neuroprotective effects of quercetin and its products in different officinal forms (soluble and liposomal). Well known data of the pharmacological properties and therapeutic potential of quercetin allow to suggest the perspectives of its use in medical practice.

Mechanism of action of quercetin have not yet been fully understood. But taking info account belonging quercetin to the bioflavonoids it can be assumed that the basis of its action due to its ability to inhibit the overproduction of ROS in the neurochemical and immune responses of neurons (the expression of pro-inflammatory cytokines, the activity of MAP - kinase cascade), to increase the activity of antioxidant enzymes, to affect on the energy processes positively which leads to increased in neuronal survival and save of brain`s cognitive functions. Quercetin and its formulations have multiple effects on cell and may simultaneously affect on several parts of pathobiochemical cascade that occurs in stress and ischemic brain damage.

Key words: Quercetin, Lipoflavon, Corvitin, antioxidants, neuroprotective drugs

Надійшла: 24.10.2014 р.

Контактна особа: Слєсарчук Владлена Юріївна, кандидат біологічних наук, викладач, кафедра загальної та клінічної фармації, ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України», буд. 9, вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49044. Тел.: +38 0 67 132 34 57.
Електронна пошта: vladaslesarchuk@rambler.ru

УДК 615.2+616.006

Н. І. Шарикіна[1], Н. О. Мєшкова[1], О. В. Міщенко[1], О. О. Хавич[1], І. Г. Кудрявцева[2], С. І. Пенделюк[3]

Трансдукція мітогенних сигналів як основа створення протипухлинних таргетних препаратів (частина II)

[1]ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ
[2]Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ
[3]Київська міська онкологічна лікарня

Без молекулярної біології онкологія
може розглядатися як дескриптивна
наука, що описує різні біологічні феномени
без пояснення механізмів їхньої появи
та біологічної сутності.

R. A. Weinberg, 2007 р.

Ключові слова: трансдукція мітогенних сигналів , таргетні препарати, механізми дії

У попередньому повідомленні (частина I цього огляду) зазначені шляхи пошуку таргетних протипухлинних засобів, серед яких провідне місце займають інгібітори рецепторів епідермальних факторів росту (EGF).

Блокатори рецепторів EGF становлять велику групу лікарських засобів, здатних гальмувати різні форми пухлинного росту.

Рецептор сімейства EGF HER2 (ERBB2) не має, як вважають, свого власного ліганду. Діючи разом з ERBB1, ERBB2 підвищує його зв'язуючу активність, потенціює передачу сигналів, опосередковану через ERBB1 [1]. Цей процес блокує трастузумаб (Герцептин) – гуманізоване моноклональне антитіло до позаклітинного домену ERBB2 за рахунок універсальної імунної цитотоксичності [2–4]. Трастузумаб є першим препаратом, розробленим на базі фундаментальних досліджень онкогенів у 1970–1980 роках. Вивчення механізмів дії трастузумабу продовжується поряд з подальшим конструюванням антитіл проти рецепторів сімейства EGF [5]: гуманізоване антитіло цетуксимаб та повністю людське антитіло – панітумумаб [6]; гуманізоване антитіло до іншого епітопу молекули ERBB2 – пертузумаб як інгібітор димеризації та ін. [7].

Другий підхід до блокади активності рецептора EGF – створення низькомолекулярних інгібіторів. Натепер впроваджено значну кількість таких сполук, першими серед яких були похідні хіназоліну: гефітиніб (Іреса), ерлотиніб (Тарцева) [8, 9].

Препарати зворотно блокують АТФ-звязуючу ділянку в гідрофобній частині молекули і, як наслідок, інгібують автофосфорилювання рецептора, порушують фосфорилювання нижче розташованих сигнальних молекул у каскаді реакцій трансдукції сигналу [10–12]. Поява Іреси та Тарцеви дозволила збільшити загальну тривалість життя хворих з метастатичним раком легенів більше ніж у 2 рази [13]. При цьому у хворих з позитивним ефектом відмічені мутації гена, що кодує EGFR [14, 15]. Найбільші переваги від призначення ерлотинібу та гефітинібу були у хворих жіночої статі, які ніколи не палили табачні вироби, в осіб азіатської раси з аденокарциномою чи бронхоальвеолярним раком [16, 17].

У подальших дослідженнях були знайдені та впроваджені подвійні тирозинкіназні інгібітори – лапатиніб, канертиніб, нератиніб (ERBB1 та ERBB 2) [18–20], які незворотно блокують EGFR 1

© Колектив авторів, 2014

та EGFR 2. Розробка цього підходу, у тому числі пошуку «мультитаргетних» інгібіторів кіназ, продовжується [21]. Створений та досліджується сорафеніб – інгібітор усього сімейства тирозинкіназ EGFR [22]. Здатність інгібувати різні протеїнкінази притаманна антибіотику стауроспорину та його похідному бензостауроспорину. Особливо відмічена його здатність інгібувати активність протеїнкінази С.

До низькомолекулярних інгібіторів тирозинкіназ відноситься препарат іматиніб (Глівек), що блокує тирозинкінази низки рецепторів факторів росту, у тому числі C-KIT, BCR/ABL, активність химерного білка P210, який утворюється при дислокації гена abl з 9 на 22 хромосому з утворенням «філадельфійської хромосоми» (Ph) [23]. Клітини, у яких утворюється білок P210, витісняють нормальні стовбурові клітини з формуванням хронічного мієлолейкозу. Глівек сьогодні – провідний препарат при цій патології.

Блокування автофосфорилювання та кіназної активності ERBB-рецепторів показано також при інгібуванні шаперона HSP90 (білок теплового шоку), а саме при використанні гельданаміцина та його похідного танеспіміцина [24, 25]. Становить інтерес інгібіція транскрипції генів, що кодують ERBB-рецептори за допомогою шедаз-ферментів, які зрізають ектодомен ERBB-рецептора з поверхні ракових клітин [27, 28].

Заслуговує уваги дослідження рекомбінантних білків, що включають α-ТФР та EGF. За допомогою генної інженерії одержано ряд гібридних молекул. Перша з них включає α-ТФР (виступає як направлений переносник) та екзотоксин А з Pseudomonas (TP-40, TP-38). Показано, що для цитотоксичного ефекту необхідна взаємодія сполуки з РЕФР. Ці сполуки активні щодо лінії плоскоклітинного раку голови та шиї, раку головного мозку [29, 30]. Модифікована структура PE35/TGF alpha-KDEL у 10–700 разів більш активна, ніж TP 40 на лінії раку сечового міхура людини.

Висока протипухлинна активність відмічена в рекомбінантного химерного білка DAB389EGF, у якому зв'язуючий домен дифтерійного токсину заміщений на EGF. Білок виявляє цитотоксичну дію щодо ліній раку підшлункової залози, карциноми легенів, пухлин головного мозку [31, 32].

Клітинні сигнальні шляхи можуть бути активованими не тільки при гіперекспресії чи мутації відповідних рецепторів, а й внаслідок їхньої стимуляції на різних рівнях у результаті мутації онкогенів, що кодують відповідні елементи кіназних каскадів [21]. Такі сигнальні шляхи не піддаються впливу тирозинкіназних рецепторів і потребують використання інгібіторів відповідних сигнальних білків. Це, перш за все, система гена ras (каскад мітогенактивуємих протеїнкіназ, МАРК) та метаболізм фосфатидилінозитолу [33, 34].

Сімейство RAS включає H-RAS, K-RAS, N-RAS гомологічні білки, які прикріплені до внутрішньої сторони клітинної мембрани. Це перші члени каскаду кіназ, які призводять до активації тирозинкіназних сигнальних шляхів з наступною транскрипцією генів шляхом фосфорилювання активованим EGFR [31]. Зв'язок з автофосфорильованим рецептором відбувається через два цитозольних білка GRB2 та SOS. Активований SOS переводить RAS в активовану форму. Активований RAS зв'язується з кінцевим доменом білка RAF [35]. Процес активації RAS відбувається на клітинній мембрані. Продукт гена ras – білок P21 є безпосередньою мішенню протеїнкінази RAF, яка активує МЕК, каскад внутрішньоклітинних МАП-кіназ з подальшим фосфорилюванням транскрипційного фактора c-jun, індукцією транскрипції онкогенів c-fos, c-myc та ін. з ініціюванням мітозу [35, 36].

Слід відмітити, що RAS-білок набуває здатності переходити з цитоплазми до мембрани та брати участь у передачі сигналу тільки після фарнезилювання (приєднання фарнезильної групи) за допомогою ферменту фарнезилтрансферази.

Декілька досліджень цієї спрямованості доведені до етапу клінічного використання. Створені інгібітори активності фарнезилтрансферази здатні впливати на процес активації RAS – типіфарніб (Зарнестра), лонафарніб (Сарасар) та ін. [36].

Гальмування активності RAS відмічено в статинів; шляху RAF/MEK – у сорафенібу (Нексавар); активності PI3K/AKT – у антибіотика вортманіну. Шлях від рецепторних тирозинкіназ до транскрипційного фактора NF-kB чутливий до дитіокарбаматів та партеноліду. Проводяться дослідження цієї спрямованості різного рівня наближення до клінічних випробувань та використання в онкологічних хворих.

До інгібіторів RAF-кінази відноситься сорафеніб (Нексавар), що блокує передачу проліферативного сигналу після зв'язування з білком-месенджером [37].

Білок BRAF є наступним після KRAS учасником сигналу ланцюга до проліферації [20]. Одержано два специфічних інгібітори BRAF – кіназ, які активні при меланомі, з мутаціями BRAF (V600E вемурафеніб (Зелбораф) та дабрафеніб (Тафінлар) [38].

До одного з перших процесів, для яких була доказана регуляторна дія EGFR-рецепторної системи, поряд з системою RAS відноситься метаболізм фосфатидилінозитолу. Найсуттєвішою частиною метаболізму фосфоінозитолу є фосфорилювання та дефосфорилювання різних ділянок інозитольного кільця. Ключовою реакцією, у якій бере участь активований EGFR – рецепторний комплекс, є перетворення одного з проміжних продуктів метаболізму – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату (PIP2) під дією фосфоліпази С в інозитол – 1,4,5 – трифосфат (IP3) та діацилгліцерол (DAG). Кожна з цих речовин є вторинним месенджером: IP3 мобілізує вільний внутрішньоклітинний Ca^{2+}, DAG активує протеїнкіназу С – ключовий фермент регуляції проліферації [39, 40].

Активація PI3K (фосфатидилінозитол-3-кінази) під дією фосфорильованого EGFR є пусковим механізмом, що забезпечує RAS – незалежну стимуляцію регуляторних кіназ AKT/RAC, JNK.

Одним з основних ефекторів PI3K є протеїнкіназа B (PKB), чи AKT (PKB/AKT). AKT діє шляхом фосфорилювання чисельних субстратів, транскрипційних факторів та ін. [41]. Ключова роль у регуляції AKT–каскаду належить антагоністу PI3K, пухлинному супресору PTEN (phosphatase and tensin homolog), який фосфорилює надлишковий фосфоінозитол-3-фосфат, інгібує фосфорилювання AKT та зупиняє передачу сигналу [40].

На I–II стадії клінічних досліджень знаходяться інгібітори PI3K, AKT, зокрема інгібітори PI3K – іделасиліб, бупарлісиб, що призводять до уповільнення проліферації клітин, вортманнін – фураностероїдний метаболіт грибів *Penicillium funiculosum* та *Talaromyces wortmannii* [42].

Дослідження показали, що, не дивлячись на численність мітогенних сигналів, у клітинах існує єдиний універсальний механізм передачі проліферативного сигналу. Цю роль виконує сигнальний шлях PI3K/Akt/ mTOR, відповідальний за інтеграцію проліферативних стимулів і одночасну активацію трансляції, у якому ключовим сигнальним білком є mTOR. Це висококонсервативна серин-треонінова протеїнкіназа (mechanic target of rapamycin, раніше – mammalian target of rapamycin, з тим самим скороченням).

Відкриття mTOR сталося в результаті вивчення протигрибкового агента – рапаміцину з бактерій *Streptomyces higroscopicus*, знайдених у ґрунті острова Рапа Нуї з архіпелагу островів Пасхи [43].

Як субодиниця mTOR входить до складу двох функціонально різних гетероолігомерних комплексів mTORC1 та mTORC2, що мають різний склад і регулюють різні процеси клітинної життєдіяльності [44]. Активація кінази mTOR спостерігається при пухлинному рості. Під контролем mTORC1 знаходяться процеси трансляції, транскрипції, біогенезу рибосом і автофагії [44]. Комплекс mTORC2 модулює клітинну проліферацію та виживання [44]. Під контролем mTOR знаходиться фосфорилювання основних факторів трансляції. На mTOR замикаються багато сигнальних шляхів у пухлинній клітині, у тому числі мітогенні.

Ураховуючи виключне значення PI3K/ AKT /mTOR сигнального шляху в регуляції основних функцій пухлинної клітини, розробка підходів до пригнічення його активності є одним з пріоритетних напрямів сучасної онкології. Активація PI3K/ AKT – шляху

призводить до активації mTORC1 шляхом фосфорилювання білків туберозного склерозу (TSC1-TSC2) – головного репресора mTORC1.

Комплекс mTORC2 здатний фосфорилювати кіназу AKT. Каскад mTOR детально вивчається з метою розробки стратегій терапії раку.

Розроблено велику кількість похідних рапаміцину: еверолімус, ридафоролімус, темсиролімус та ін. Препарат темсиролімус впроваджений в клінічну практику для лікування нирково-клітинної карциноми (2007 р.). Сам рапаміцин має невелику протипухлинну дію. Його комбінації з інгібітором аутофагії – хлорохіном призводить до підсилення протипухлинного ефекту [45].

У цей час розроблено інгібітори каталітичного сайта кінази mTOR (PP242, PP30, Torin1, Torin2), які інгібують mTORC1 та mTORC2 і мають виражений антипроліферативний ефект. Одержані декілька подвійних інгібіторів проти mTOR та PI3K (NVP-BEZ 235, NVP-BBD130 (Exelixis)) [46].

Слід відмітити здатність інгібувати активність mTOR протидіабетичних препаратів Метформіну та Фенформіну, які призводять до зниження респіраторної активності мітохондрій на рівні АТФ [47]. Препарати в експерименті подовжують тривалість життя, вірогідно знижують ризик розвитку пухлинних захворювань у людей. Аналогіча активність відмічена в Кофеїну та Аспірину [48].

Надані відомості свідчать, що рецептори ERBB як ключові елементи передачі сигналу із зовнішнього середовища всередину клітини пов'язані з подальшою сигнальною трансдукцією і активацією транскрипції у відповідь на сигнал чи транспорт ліганду в ядро.

NF-κB – гетеродимерний комплекс білків, який у нормальних клітинах неактивний та знаходиться в цитоплазмі в комплексі з інгібіторами IκB. NF-κB активується при надходженні регуляторного стимулу. Має місце фосфорилювання інгібіторного білка IκB специфічними кіназами, умбіквитинація його та повна деградація в протеосомах з вивільненням NF-κB та входом в ядро [49].

Показано, що регуляція транскрипційного фактора NF-κB у багатьох пухлинах людини порушена. При цьому NF-κB постійно активований і знаходиться в ядрі з гіперактивацією сигнального шляху PI3K/Akt/NF-κB [50]. Уважають, що створення протипухлинних агентів, які блокують NF-κB-шлях, дозволить підвищити чутливість клітин до існуючих видів терапії, а також може мати самостійне терапевтичне значення.

Натепер відомо декілька десятків екзогенних та ендогенних агентів, здатних пригнічувати активність NF-κB. До найперспективніших препаратів відноситься інгібітор протеосом Бортезоміб, який використовується для лікування множинної мієломи, та інгібітор IκB – активуючої кінази Партенолід [51].

Важливими терапевтичними мішенями вважають гени сімейства myc, які кодують транскрипційні фактори та білки сімейства MYC за допомогою мутантних білків, пептидів та низькомолекулярних сполук [52].

Сьогодні існують стратегії, які спрямовані на блокування функцій myc у пухлинних клітинах, а саме на інгібування експресії генів myc на рівні транскрипції, трансляції чи на білок-білкові взаємодії, необхідні для виконання функцій myc як транскрипційного фактора [53].

Одним з підходів до блокування транскрипції c-myc є використання катіонних порфіринів, здатних зв'язуватися з ДНК і стабілізувати утворення G-тетраплексних структур промотора гена c-myc [54].

Широке використання в генній терапії знаходять антизмістові олігонуклеотиди, їхні похідні та аналоги завдяки універсальній здатності зв'язуватися з нуклеїновими кислотами та впливати на їхні функції в клітинах. Такий вплив може здійснюватися шляхом блокування транскрипції (антигенний підхід) чи трансляції (антизмістовий підхід) [55, 56].

Ефективність комплексу олігомери-мРНК залежить, головним чином, від вторинної структури мРНК, що враховується при виборі антисенсового нуклеотиду. Одержано антисенсові інгібітори до сигнальних білків H-RAS (ISIS 2503), RAF-1 (ISIS 5132), протеїнкінази C_α (ISIS 3521), які проходять клінічну

апробацію. При цьому ISIS 3521 (Афінітан) одержав від FDA статус «швидкий трек» – найшвидший маршрут для затвердження при лікуванні раку легенів. Проходять клінічну апробацію Облімерсен (Генасенс) при лімфомах та MY-98 – олігонуклеотид, комплементарний ДНК – метилтрансферазній іРНК.

Декілька анти-c-myc препаратів успішно пройшли першу фазу клінічних випробувань, показали свою безпечність [56, 57].

Ще одним підходом, що широко розвивається, є вплив на пухлинний ріст та процеси передачі мітогенних сигналів антизмістових РНК до різних компонентів цієї системи, які мають пригнічувати біосинтез відповідних білків. У цей час вже сконструйовані такі РНК для рецептора EGF, α-ТФР та інших регуляторних молекул.

Оцінено перспективність сучасного підходу, спрямованого на специфічне РНК-залежне інгібування експресії генів-мішеней, РНК-інтерференція [58]. Процес РНК-інтерференції притаманний клітинам усіх багатоклітинних організмів і є природним механізмом клітинного захисту від вірусної інфекції, активності транспозонів та ретротранспозонів. В еукаріотичних клітинах присутні гени, які кодують особливий тип нетранслюємих РНК (малі інтерферуючі та мікро-РНК). При цьому РНК-залежний інгібуючий комплекс (PI3K) зв'язується з комплементарною РНК-мішенню та призводить до її спрямованої деградації. Короткі синтетичні дуплекси, які імітують фрагменти РНК, одержують у ході її фрагментації ферментом дайсер-міРНК. Ефективність міРНК суттєво вища за ефективність дії антисенсових олігонуклеотидів чи рибозидів. Так, міРНК у 10–100 разів більше інгібує експресію гена-мішені, ніж антисенсовий нуклеотид [59]. Мікро-РНК приєднуються до 3'-HTR (3'-кінцевої ділянки, що не транслюється) міРНК і викликають видалення полі(А)-хвоста або пригнічення трансляції іншим шляхом [60].

Здійснено інгібування експресії генів сімейства myc за допомогою інтерферуючих РНК карциноми легенів людини A549, гепатоми Hep 92, аденокарциноми молочної залози MCF-7, у яких суттєво знижений рівень білка c-MYC.

Декілька препаратів міРНК уже знаходяться на II стадії клінічних досліджень. Вирішується спектр питань для переходу міРНК із категорії ефективного інструмента біомедичних досліджень у категорію лікарських засобів: забезпечення спрямованої та ефективної доставки в органи та тканини, безпечного дозування та ін.

Загалом, підсумовуючи викладене, можна констатувати, що з розвитком фундаментальної науки відкриваються нові перспективи використання ліків при злоякісних новоутвореннях.

Таргетна терапія знаходиться на самому початку свого розвитку в напрямі розробки нового покоління протипухлинних сполук, які успішно впроваджуються в клінічну практику.

Продовжується пошук нових перспективних мішеней, рецепторного статусу пухлин, нових лікарських субстанцій та їхніх комбінацій з класичними хіміотерапевтичними режимами. Усе це дозволяє сподіватися на суттєве підвищення ефективності лікування онкологічних хворих.

1. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology / De Laurentiis M., Cancello G., Zinno L. [et al.] // Ann. Oncol. – 2005. – V. 16, Suppl 4. – P. 7–13.
2. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fa / Cho H. S., Mason K., Ramyar K. X. [et al.] // Nature. – 2003. – V. 421, № 6924. – P. 756–760.
3. *Clifford A.* Hudis Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice / Clifford A. // N Engl J. Med. – 2007. – V. 1, № 357. – P. 39–51.
4. Herceptin / Shepard H. M., Jin P., Slamon D. J. [et al.] // Handb. Exp. Pharmacol. – 2008. – V. 181 – P. 183–219.
5. Human monoclonal antibodies in cancer therapy: a review of recent developments / Xin L., Cao J., Cheng H. [et al.] // Front Biosci (Landmark Ed). – 2013. – № 18. – P. 765–772.
6. *Hocking C. M.* Panitumumab in metastatic colorectal cancer / Hocking C. M., Townsend A. R., Price T. J. // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2013. – V. 13, № 7. – P. 781–793.
7. Pertuzumab: development beyond breast cancer / Barthélémy P., Leblanc J., Goldbarg V. [et al.] // Anticancer Res. – 2014. – V. 34, № 4. – P. 1483–1491.
8. *Steins M.* Erlotinib / Steins M., Thomas M., Geißler M. // Recent Results Cancer Res. – 2014. – № 201. – P. 109–123.

9. *Rahman A. F.* Gefitinib / Rahman A. F., Korashy H. M., Kassem M. G. // Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol. –2014. – № 39. – P. 239–264.
10. *Harari P. M*. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology / Harari P. M. // Endocr Relat Cancer. – 2004. – V. 11, № 4. – P. 689–708.
11. *Takeuchi K*. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics / Takeuchi K., Ito F. // Biol Pharm Bull. – 2011. – V. 34, № 12. – P. 1774–1780.
12. Tyrosine kinase inhibitors / Natoli C., Perrucci B., Perrotti F.[et al.] // Curr. Cancer Drug Targets. – 2010. – V. 10, № 5. – P. 462–483.
13. *Имянитов Е. Н*. Молекулярная патология рака легкого: клинические аспекты / Имянитов Е. Н. // Практическая онкология. – 2006. – Т. 7. № 3 (27). – С. 131–137.
14. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R. [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2004. – V. 350, № 21. – P. 2129–2139.
15. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy / Paez J. G., Jänne P. A., Lee J. C. [et al.] // Science. – 2004. – V. 304, № 5676. – P. 1497–1500.
16. Smoking history and epidermal growth factor receptor expression as predictors of survival benefit from erlotinib for patients with non-small-cell lung cancer in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21 / Clark G. M., Zborowski D. M., Santabarbara P. [et al.] // Clin. Lung Cancer. – 2004. – V. 7, № 6. – P. 389–394.
17. Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study / Chang A., Parikh P., Thongprasert S. [et al.] // J. Thorac. Oncol. – 2006. – V. 1, № 8. – P. 847–855.
18. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy / Pytel D., Sliwinski T., Poplawski T. [et al.] // Anticancer Agents Med.Chem. – 2009. – V. 9, № 1. – P. 66–76.
19. *Nolting M.* Lapatinib / Nolting M., Schneider-Merck T., Trepel M. // Recent Results Cancer Res. – 2014. – № 201. – P. 125–143.
20. Neratinib (HKI-272) in the treatment of breast cancer / López-Tarruella S., Jerez Y., Márquez-Rodas I. [et al] // Future Oncol. – 2012. – V. 8, № 6. – P. 671–681.
21. *Поляновский О. Л*. ERBB-онкогены – мишени моноклональных антител / Поляновский О. Л., Лебеденко Е. Н., Деев С. М. // Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 3. – С. 289–311.
22. *Hasskar J.* Sorafenib: targeting multiple tyrosine kinases in cancer / Hasskar J. // Recent Results Cancer Res. – 2014. – № 201. – P. 145–164.
23. *Al-Hadiya B. M*. Imatinib mesylate / Al-Hadiya B. M., Bakheit A. H., Abd-Elgalil A. A. // Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol. – 2014. – № 39. – P. 265–297.
24. *Yayoi Fukuyo, Clayton R. Hunt, Nobuo Horikoshi* Geldanamycin and its anti-cancer activities // Cancer Letters – 2010. – № 290, №1. – P. 24–35.
25. *Soga S*. Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development / Soga S, Akinaga S, Shiotsu Y. // Curr. Pharm. Des. – 2013. – V. 19, № 3. – P. 366–376.
26. *Weber S*. Ectodomain shedding and ADAMs in development / Weber S., Saftig P. // Development. – 2012. –V. 139, № 20. – P. 3693–3709.
27. *Carl P*. Blobel ADAMs: key components in EGFR signalling and development / Carl P. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2005. –V. 6. – P. 32–43.
28. ADAM10 as a target for anti-cancer therapy /Moss M. L., Stoeck A., Yan W. [et al.] // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2008. – V. 9, № 1. – P. 2–8.
29. Inhibitory effect of recombinant transforming growth factor alpha-pseudomonas exotoxin 40 on human bladder cancer cell proliferation / Yan X., Ding Q., Zhang Y. F. [et al.] // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. – 2004. – V. 42, № 23. – P. 1457–1459.
30. *Weldon J. E*. A guide to taming a toxin-recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer / Weldon J. E., Pastan I. // FEBS J. – 2011. – V. 278, № 23. – P. 4683–4700.
31. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein DAB389EGF for the treatment of bladder cancer / Yang X., Kessler E., Su L.J. [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2013. – V. 19, № 1. – P. 148–157.
32. *Mishra G*. Recombinant toxin DAB389EGF is cytotoxic to human pancreatic cancer cells / Mishra G., Liu T. F., Frankel A. E.// Expert Opin. Biol. Ther. – 2003. – V. 3, № 7. – P. 1173–1180.
33. Der Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues / Antonio T. Baines, Dapeng Xu, Channing J. // Future Med Chem. – 2011. – V. 3, № 14. – P. 1787–1808.
34. *Shujuan Liu* The structural basis of PI3K cancer mutations: from mechanism to therapy / Shujuan Liu, Stefan Knapp, Ahmed Ashour Ahmed // Cancer Res. – 2014. – V. 74, № 3. – P. 641–646.
35. RAS: target for cancer therapy / Saxena N., Lahiri S. S., Hambarde S. [et al.] // Cancer Invest. – 2008. – V. 26, № 9. – P. 948–955.
36. *Roberts P. J*. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer / Roberts P. J., Der C. J. // Oncogene. – 2007. – V. 26, № 22. – P. 3291–3310.
37. *Hasskarl J*. Sorafenib: targeting multiple tyrosine kinases in cancer / Hasskarl J. // Recent Results Cancer Res. – 2014. – № 201. – P. 145–164.
38. *Wang A. X*. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma / Wang A. X., Qi X. Y. // IUBMB Life. – 2013. – V. 65, № 9. – P. 748–758.
39. *Porta C*. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer / Porta C., Paglino C., Mosca A. // Front. Oncol. – 2014. – V. 4. – P. 1–11.
40. *Jiri Polivka Jr*. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway / Jiri Polivka Jr., Filip Janku // Pharmacology & Therapeutics – 2014. – V. 142, № 2. – P. 164–175.

41. *Brendan D*. Manning. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream / Brendan D. Manning, Lewis C. Cantley // Cell. – 2007. – V. 129, № 7. – P. 1261–1274.
42. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics / Akintunde Akinleye, Parthu Avvaru, Muhammad Furqan [et al.] // J. Hematol. Oncol. – 2013. – V. 6. – P. 1–17.
43. *Зубова С. Г*. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке / Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. // Цитология. – 2012. – Т. 54. № 8. – С. 589–602.
44. *Helena Pópulo* The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer / Helena Pópulo, José Manuel Lopes, Paula Soares // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – V. 13. – P. 1886–1918.
45. Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery / Liu B., Bao J. K., Yang J. M. [et al.] // Chin J. Cancer. – 2013. – V. 32, № 3. – P. 113–120.
46. *Colleen R McNamara*. Small-molecule inhibitors of the PI3K signaling network / Colleen R McNamara, Alexei Degterev // Future Med. Chem. – 2011. – V. 3, № 5. – P. 549–565.
47. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 In a Rag GTPase-Dependent Manner / Adem Kalender, Anand Selvaraj, So Young Kim [et al.] //Cell Metab. – 2010. – V. 11, № 5. – P. 390–401.
48. Aspirin Inhibits mTOR Signaling, Activates AMP-Activated Protein Kinase, and Induces Autophagy in Colorectal Cancer Cells / Farhat V. N. Din, Asta Valanciute, Vanessa P. Houde [et al.. // Gastroenterology. – 2012. – V. 142, № 7. – P. 1504–1515.
49. *Erstad D. J., Cusack J. C. Jr.* Targeting the NF-κB pathway in cancer therapy// Surg. Oncol. Clin. N. Am. – 2013. – V. 22, № 4. – P. 705–746.
50. NF-kB in development and progression of human cancer / Dolcet X., Llobet D., Pallares J. [et al.] // Virchows Arch. – 2005. – V. 446, № 5. – P. 475–482.
51. *Gilmore T. D*. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting / Gilmore T. D., Herscovitch M. // Oncogene. – 2006. – V. 25, № 51. – P. 6887–6899.
52. *Dang C. V.* MYC on the path to cancer / Dang C. V. // Cell. – 2012. – V. 149, № 1. – P. 22–35.
53. *Albihn A.* MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies / Albihn A., Johnsen J. I., Henriksson M. A. // Adv Cancer Res. – 2010. – V. 107. – P. 163–224.
54. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription / Siddiqui-Jain A., Grand C. L., Bearss D. J. [et al.] // Proc Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – V. 99, № 18. – P. 11593–11598.
55. *Wacheck V.* Antisense molecules for targeted cancer therapy / Wacheck V., Zangemeister-Wittke U. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2006. – V. 59, № 1. – P. 65–73.
56. *Gleave M. E*. Antisense therapy for cancer / Gleave M. E., Monia B. P. // Nat Rev Cancer. – 2005. – V. 5, № 6. – P. 468–479.
57. *Orr R. M.* Clinical studies of antisense oligonucleotides for cancer therapy / Orr R. M., Dorr F. A. // Methods Mol. Med. – 2005. – V. 106. – P. 85–111.
58. RNA interference and personalized cancer therapy / Rao D. D., Wang Z., Senzer N. [et al.] // Discov. Med. – 2013. – V. 15, № 81. – P. 101–110.
59. *Dykxhoorn D. M*. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic / Dykxhoorn D. M., Lieberman J. // Ann. Rev. Med. – 2005. – V. 56. – P. 401–423.
60. *Pillai R. S*. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? / Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Filipowicz W. // Trends Cell Biol. – 2007. – V. 17, № 3. – P. 118–126.

Н. І. Шарикіна, Н. О. Мєшкова, О. В. Міщенко, О. О. Хавич, І. Г. Кудрявцева, С. І. Пенделюк

Трансдукція мітогенних сигналів як основа створення протипухлинних таргетних препаратів (частина II)

У частині II огляду означено підходи та наведено результати досліджень щодо створення блокаторів рецепторів епідермального фактора росту з використанням моноклональних антитіл (трастузумаб, цетуксимаб, панітумумаб, пертузумаб). Означено основні механізми, які пов'язані з блокадою ділянки в гідрофобній частині молекули та інгібуванням автофосфорилювання рецепторів, порушенням активності нижче розташованих сигнальних молекул у каскадах реакцій трансдукції сигналів (гефітиніб, ерлотиніб, лапатиніб, канертиніб, нератиніб, сорафеніб – інгібітор усього сімейства EGFR). Дія препаратів спрямована на значну кількість форм злоякісного росту.

До низькомолекулярних інгібіторів тирозинкіназ відноситься іматиніб, активний при хронічному мієлолейкозі.

Становлять інтерес інгібування шаперона HSP90 (гельданаміцин, танеспіміцин), гальмування транскрипції генів за допомогою шедаз-ферментів.

Створюються гібридні молекули з використанням факторів росту та бактеріальних токсинів (TP-40, TP-38 та ін.).

Проводиться пошук інгібіторів елементів кіназних каскадів (RAS – білок – інгібітори фарнезилювання – типіфарніб; RAF – кіназа – сорафеніб). Вивчаються інгібітори PI3K, сигнального шляху PI3K/ Akt/ mTOR – похідні рапаміцину – еверолімус, ридафоролімус, темсиролімус та ін.

Триває пошук регуляторів транскрипційних факторів: NF-κB (бортезоміб), антисенсові олігонуклеотиди до сигнальних білків H-RAS (ISIS 2503), RAF-1 (ISIS 5132), протеїнкінази C_α (ISIS 3521), анти-c-myc препаратів.

Сучасним підходом є використання РНК-інтерференції. Декілька препаратів міРНК знаходяться на стадії клінічних випробувань.

Вважають, що таргетна терапія знаходиться на самому початку свого розвитку. Інтенсивність досліджень передбачає її значний вплив на лікування онкологічних хворих.

Ключові слова: трансдукція мітогенних сигналів, таргетні препарати, механізми дії

Н. И. Шарыкина, Н. А. Мешкова, О. В. Мищенко, О. А. Хавич, И. Г. Кудрявцева, С. И. Пенделюк

Трансдукция митогенных сигналов как основа создания противоопухолевых таргетных препаратов (часть II)

В части II обзора опредены подходы и приведены результаты исследований по созданию блокаторов рецепторов эпидермального фактора роста с использованием моноклональных антител (трастузумаб, цетуксимаб, панитумумаб, пертузумаб). Указаны основные механизмы, связанные с блокадой участка в гидрофобной части молекулы и ингибированием аутофосфорилирования рецепторов, нарушением активности нижележащих сигнальных молекул в каскадах реакций трансдукции сигналов (гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, канертиниб, нератиниб, сорафениб – ингибитор всего семейства EGFR). Действие препаратов направлено на значительное количество форм злокачественного роста.

К низкомолекулярным ингибиторам тирозинкиназ относится иматиниб, активный при хроническом миелолейкозе.

Представляет интерес ингибирование шаперона HSP90 (гельданамицин, танеспимицин), торможение транскрипции генов с помощью шедаз-ферментов.

Создаются гибридные молекулы с использованием факторов роста и бактериальных токсинов (TP-40, TP-38 и др.).

Проводится поиск ингибиторов элементов киназных каскадов (RAS – белок – ингибиторы фарнезилирования – типифарниб; RAF – киназа – сорафениб). Изучается ряд ингибиторов PI3K, сигнального пути PI3K / Akt / mTOR – производные рапамицина – эверолимус, ридафоролимус, темсиролимус и др.

Продолжается поиск регуляторов транскрипционных факторов: NF-κB (бортезомиб), антисмысловые олигонуклеотиды к сигнальным белкам H-RAS (ISIS 2503), RAF-1 (ISIS 5132), протеинкиназы C_α (ISIS 3521), анти-c-myc препаратов.

Современным подходом является использование РНК-интерференции. Несколько препаратов миРНК находятся на стадии клинических испытаний.

Считают, что таргетная терапия находится в самом начале своего развития, а интенсивность исследований будет иметь огромное влияние на лечение онкологических больных.

Ключевые слова: трансдукция митогенных сигналов, таргетные препараты, механизмы действия

N. I. Sharykina, N. A. Meshkova, O. V. Mischenko, O. A. Khavich, I. G. Kudryavtzeva, S. I. Pendeluk

Transduction of mitogenic signals as a basis for the creation of anticancer targeted agents (part II)

The second part of the review defines approaches and their results on creation of epidermal growth factor receptor blockers using a monoclonal antibodies (trastuzumab, cetuximab, panitumumab, pertuzumab). The basic mechanisms of these compounds related to the blockade of the site in the hydrophobic part of the molecule and the inhibition of receptor autophosphorylation, aberrant activity of the underlying signal molecules in the signal transduction pathways (gefitinib, erlotinib, lapatinib, kanertinib, neratinib, sorafenib – an inhibitor of the entire EGFR family). Drugs are affected a significant number of tumors.

Small molecular inhibitors of tyrosine kinase include such compound as imatinib which, is effective at chronic myeloid leukemia.

Novel approaches in cancer therapy is the inhibition of the chaperone HSP90 (geldanamycin, tanespimitsin), inhibition of gene transcription by sheddasse enzymes.

The new fused molecules consisted of growth factors and bacterial toxins (TR-40, TR-38, etc.) are creating.

It is continuing the search for inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade (RAS – protein – inhibitor of farnesylation – tipifarnib; RAF – kinase – sorafenib). It is studied a number of PI3K inhibitors, PI3K / Akt / mTOR signaling pathway – rapamycin derivatives – everolimus, ridaforolimus, temsirolimus.

The search of transcription regulators: NF-kB (bortezomib), antisense oligonucleotides to the signal proteins H-RAS (ISIS 2503), RAF-1 (ISIS 5132), protein kinase C_α (ISIS 3521), anti-c-myc drugs is conducted.

Modern approach is using of RNA interference technique. Several siRNA-related drugs are undergoing clinical trials.

It is concluded that the targeted therapy is at the beginning of its development. The intensity of the research in this field induces is due to its huge influence on the treatment of cancer patients.

Key words: signal transduction, targeted drugs and biologically active substances, the mechanisms of action

Надійшла: 23.09.2014 р.

Контактна особа: Шарикіна Надія Іванівна, доктор медичних наук, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456-42-56.

УДК 615.224.22

О. О. Котов, Л. О. Громов, О. К. Ярош

Формування резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму за тривалого введення мишам

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

Ключові слова: транквілізатори, анксіолітики, феназепам, резистентність, толерантність

Соціально-економічна напруженість сьогодення створює передумови для розвитку різних варіантів психогенної патології, що відносяться до групи невротичних розладів (неврозів), тобто до психогенно зумовлених хворобливих станів. Однією з найпоширеніших форм є тривожні (тривожно-фобічні) розлади (ТФР), які характеризуються великим різноманіттям клінічних проявів. Кожен четвертий житель планети хоча б раз у житті переніс той чи інший ТФР, а приріст захворюваності на нього становить 17,7 % на один рік [1, 2]. Поширеність ТФР у популяції сягає 6,5 %, а в загальномедичній мережі – до 15 % [3–5]. За таких умов часто виникає необхідність використання нейротропних фармакологічних засобів. Однією з таких груп лікарських засобів (ЛЗ) є транквілізатори з властивою їм анксіолітичною дією.

Сьогодні перелік транквілізаторів налічує понад 100 сполук, і зростання їхньої кількості не вирішує проблему лікування ТФР у з'вязку з тим, що в процесі лікування більшістю препаратів цієї групи виникає резистентність, тобто зменшення чутливості до їхнього впливу, а згодом відсутність їхньої дії на пацієнтів (толерантність). Однак терміни та механізми розвитку резистентності, а в подальшому толерантності сьогодні вивчені мало, а неефективність препарату із групи анксіолітиків небезпечна поглибленням нейропсихічної патології та розвитком генералізованого тривожного розладу (ГТР), лікування якого в рази складніше і загрожує переходом у хронічну форму [6].

© Колектив авторів, 2014

Мета дослідження – визначення послідовності та термінів формування резистентності до анксіолітичної дії одного з базових транквілізаторів із групи бензодіазепінів – феназепаму.

Матеріали та методи. Досліди проведено на 16 (8 – контрольних і 8 – піддослідних) статевозрілих білих мишах у хронічному експерименті. Утримували тварин у стандартних умовах експериментальної клініки, а всі експерименти виконували відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших цілей» [7].

Дослідження проведено з використанням методики «припіднятого хрестоподібного лабіринту (elevated cross-maze test)» [8] – найвизнанішого натепер методичного тесту для оцінки в гризунів рівня тривожності, що часто використовується при вивченні анксіолітиків [9–15]. У вихідному стані (контроль) та впродовж дослідження реєстрували тривалість латентного періоду (с), тривалість знаходження тварини в світлому рукаві лабіринту (с), час перебування в темному рукаві лабіринту (с), кількість звішувань зі світлого рукава лабіринту, кількість виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав. Дослідній групі тварин феназепам вводили перорально в дозі 2 мг/кг щоденно протягом 17 днів, контрольна група одержувала щоденно по 0,2 мл води. Контроль за поведінкою та фіксацію результатів вищенаведених показників здійснювали в кожної тварини протягом 5 хв на першу добу, 10 та 17 добу.

Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали за різницею середніх значень, яку оцінювали з викорис-

танням t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності кількісних параметрів порівнюваних показників при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Отримані результати дослідження (таблиця) свідчать, що феназепам після одноразового введення викликав типову реакцію поведінки в припіднятому хрестоподібному лабіринті (ПХЛ), добре описану в медичній літературі [15–17]. Після введення феназепаму подовжувався латентний період з 10,4 ± 1,71 с у контролі до 231,6 ± 28,1 с ($p \leq 0,05$), а тривалість перебування в темному рукаві лабіринту зменшувалася майже в 15 разів. Навпаки, час перебування в світлому рукаві лабіринту подовжувався в 13 разів. Кількість звішувань з світлого рукава лабіринту також збільшувалася, хоча й не так виразно, як попередні показники з 4,4 ± 0,6 у контролі до 6,8 ± 1,2 у дослідній групі ($p \leq 0,05$). Кількість виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав залишалася майже без змін (3,88 ± 1,2 у контролі та 3,38 ± 1,67 у дослідній групі).

Отже, антифобічний, антитривожний ефект феназепаму добре проявлявся в мишей після одноразового введення препарату, і реакція на препарат у тварин повністю відповідала його загальновідомій дії.

При повторних введеннях препарату змінювалася його ефективність, що проявлялося значним зменшенням проявів антитривожної дії феназепаму. Уже на 10 добу введення феназепаму його вплив ставав недостовірним за більшістю досліджуваних показників. Зокрема, латентний період зменшувався та становив 43,1 ± 25,6 с у дослідній групі та 35,8 ± 12,9 с у контрольній. Аналогічну тенденцію спостерігали й за іншими показниками: тривалість перебування в темному рукаві лабіринту подовжувалося з 18,6 ± 8,0 с на 1 добу експерименту до 243,4 ± 23,8 відповідно, тобто практично наближалася до показників у мишей контрольної групи 212,6 ± 24,5 с. Показник часу перебування в світлому рукаві лабіринту скоротився з 281,4 ± 8,0 с до 56,6 ± 23,8 с і достовірно не відрізнявся від тривалості перебування в ньому контрольних тварин (51,6 ± 12,2 с).

Ознаки резистентності та формування повної нечутливості (толерантності) до феназепаму наростали та досягали свого максимального значення на 17 добу після щоденного введення препарату. Це проявлялося значним скороченням латентного періоду, часу перебування в світлому рукаві лабіринту та максимальним подовженням тривалості находження в темному рукаві ПХЛ. Як видно з даних, наведених у таблиці, тривалість перебування мишей у темному рукаві ПХЛ, не дивлячись на постійне продовження введення феназепаму, збільшилася з 18,60 ± 8,04 с на першу добу експерименту до 277,3 ± 6,99 с відповідно, тобто підвищилася майже в 15 разів та достовірно не відрізнялася від показника контрольної групи на 17 добу досліду – 271,10 ± 5,69 с. Латентний період і термін перебування в світлому рукаві лабіринту зменшилися до 17,30 ± 6,75 с та 21,60 ± 7,16 с відповідно, що також достовірно не відрізняється від показників контрольної групи тварин. Також дещо зменшувалися та достовірно не відрізнялися показники кількості виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав 3,25 ± 1,75 с та звішувань зі світлого рукава лабіринту 1,75 ± 0,65 с порівняно з контрольними тваринами.

Отже, якщо оцінювати поведінку мишей після одноразового введення феназепаму, то можна зробити висновок, що препарат викликає суттєву антитривожну, антифобічну дію за всіма досліджуваними показниками: подовжувався латентний період, час перебування в світлому рукаві лабіринту, скорочувався час знаходження в темному рукаві припіднятого хрестоподібного лабіринту; збільшувалася кількість звішувань зі світлого рукава лабіринту. Проте кількість виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав упродовж дослідження достовірно не змінилася порівняно з контролем, що теж має суттєве значення, але в цій статті не буде висвітлено.

Таблиця

Показники поведінки мишей у припіднятому хрестоподібному лабіринті після тривалого перорального введення феназепаму
(M ± m, n = 8)

Група тварин	Показник	Латентний період, с			Час перебування в темному рукаві лабіринту, с			Час перебування в світлому рукаві лабіринту, с			Кількість виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав			Кількість звішувань зі світлого рукава лабіринту		
		Термін дослідження, доба														
		1	10	17	1	10	17	1	10	17	1	10	17	1	10	17
Контроль	M ± m	10,40 ± 1,71	35,80 ± 12,90	26,90 ± 5,08	278,70 ± 3,30	212,60 ± 24,50	271,10 ± 5,69	21,30 ± 3,30	51,60 ± 12,20	28,90 ± 5,69	3,90 ± 1,20	3,60 ± 0,94	0,80 ± 0,49	4,38 ± 0,63	4,00 ± 0,63	0,75 ± 0,37
Феназепам, 2 мг/кг	M ± m	231,60 ± 28,00*	43,10 ± 25,60	17,30 ± 6,75	18,60 ± 8,04*	243,40 ± 23,80	277,30 ± 6,99	281,40 ± 8,04*	56,60 ± 23,80	21,40 ± 7,16	3,38 ± 1,67	3,38 ± 1,28	3,25 ± 1,75	6,75 ± 1,19*	3,75 ± 1,39	1,75 ± 0,65

*Примітка.*Достовірно до показника контрольної групи тварин $p \leq 0,05$, n – кількість тварин у групі.*

Тобто феназепам після першого введення викликав типовий анксіолітичний ефект.

Однак тривале щоденне введення феназепаму в тій самій дозі викликало вже на 10 добу початкові ознаки резистентності, а на 17 день – майже повне зникнення анксіолітичного ефекту препарату, коли показники поведінки тварин у припіднятому хрестоподібному лабіринті достовірно не відрізнялися від таких у контрольної групи мишей, яким лікарський засіб не вводили.

Таким чином, введення феназепаму мишам протягом 10 діб призводило до появи ознак резистентності, а на 17 добу – до майже повної толерантності до анксіолітичної дії феназепаму.

У подальшому доцільно провести дослідження механізмів формування резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму та пошуку шляхів її подолання з використанням інших препаратів бензодіазепінового ряду.

Висновки

1. Феназепам у дозі 2 мг/кг після одноразового перорального введення мишам викликає анксіолітичний ефект, що підтверджено характерною зміною показників поведінки тварин у припіднятому хрестоподібному лабіринті.

2. Тривале щоденне введення феназепаму призводило до статистично вірогідного зменшення специфічного (анксіолітичного) ефекту препарату, визначеного за параметрами поведінки мишей у припіднятому хрестоподібному лабіринті вже на 10 добу, що свідчить про розвиток у цей термін резистентності до дії препарату та формування повної толерантності через 17 діб.

3. Встановлення послідовності та термінів розвитку резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму дають можливість використовувати тривале введення препарату з оцінкою показників поведінки тварин у припіднятому хрестоподібному лабіринті як експериментальну модель для пошуку шляхів і засобів її подолання.

1. *Балукова Е. В.* Тревожные расстройства у больных терапевтического профиля / Е. В. Балукова, Ю. П. Успенский, Е. И. Ткаченко // Терапевт. арх. – 2007. – №6.– С.85–88.
2. *Hoyer J.* Psychotherapy for Generalized Anxiety Disorder / J. Hoyer, C. Van der Heiden, M. E. Portman // Psychiatric Annals. – 2011. – V. 41 (2). – P. 87–94.
3. *Чабан О. С.* Терапія пацієнтів із тривожними розладами, коморбідними з серцево-судинною патологією / О. С. Чабан, О. О. Хаустова // Межд. невролог. журнал. – 2008. – № 5 (21). – С. 22–27.
4. *Пінчук І. Я.* Проблема депресії в аспекті охорони психічного здоров'я осіб похилого віку / І. Я. Пінчук, О. О. Хаустова // Вестн. Ассоц. психиатров Украины. – 2013. – № 3. – С. 12–17.
5. *Романчук О. І.* Когнітивно-поведінкова терапія тривожних розладів: модель розуміння, терапії та емпіричні докази ефективності / О. І. Романчук // Вестн. Ассоц. психиатров Украины. – 2013. – № 4. – С. 3–7.
6. Молекулярные основы действия психотропных средств / Андронати С. А., Воронина Т. А., Хвостенко В. И. [и др.] // – К. : Наукова думка, 1980. – С. 66–76.
7. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
8. *Handley S. L.* Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior / S. L. Handley, S. Mithani // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 1984. – V. 327(1). – P. 1–5.
9. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, M. Briley // J. Neurosci Methods. – 1985. – V. 14 (3). – P. 149–167.
10. *Holmes A.* Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice / A. Holmes // Neurosci Biobehav Rev. – 2001. – V. 25. – P. 261–273.
11. Short-term and long-term effects of postnatal exposure to an adult male in C57BL/6J mice / K. Hefner, H. A. Cameron, R.-M. Karlsson, A. Holmes // Behavioural Brain Research. – 2007. – V. 182, № 2. – P. 344–348.
12. *Дыгало Н. Н.* Методология анализа молекулярно-генетических основ физиологии мозга – функциональная нейрогеномика / Н. Н. Дыгало // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38, № 1. – С. 3–13.
13. *Carobrez A. P.* Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on / A. P. Carobrez, L. J. Bertoglio // Neurosci Biobehav Rev. – 2005. – V. 29. – P. 1193–2005.
14. *Lalonde R*. Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice / R. Lalonde, C. Strazielle // Journal of Neuroscience Methods. – 2008. – V. 171(1). – P. 48–52.
15. *Леушкина Н. Ф.* Характеристика поведения у предпочитающих алкоголь крыс в установке «приподнятый крестообразный лабиринт» и содержания катехоламинов после действия стрессора / Н. Ф. Леушкина, А. М. Федорова, А. В. Ахмадеев // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 23–28.
16. *Takao K.* Impact of brain-behavior phenotyping of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders / K. Takao, N. Yamasaki, T. Miyakawa // Neurosci Res. – 2007. – V. 58. – P. 124–1232.
17. *Komada M.* Elevated Plus Maze for Mice / M. Komada, K. Takao, T. Miyakawa // J. Vis. Exp. – 2008. – V. 22. – P. 1088–1112.

О. О. Котов, Л. О. Громов, О. К. Ярош

Формування резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму за тривалого введення мишам

Мета дослідження – визначення послідовності та термінів формування резистентності до анксіолітичної дії одного з базових транквілізаторів із групи бензодіазепінів – феназепаму.

Специфічну анксіолітичну дію оцінювали за показниками поведінки білих мишей у «припіднятому хрестоподібному лабіринті (elevated cross-maze test)» після одноразового та багаторазового введення феназепаму в дозі 2 мг/кг на 1, 10 та 17 добу експерименту.

Феназепам у дозі 2 мг/кг після одноразового перорального введення мишам викликає анксіолітичний ефект, що підтверджено характерною зміною показників поведінки тварин у припіднятому хрестоподібному лабіринті: зокрема, латентний період подовжувався з 10,40 ± 1,71 с у контролі до 231,60 ± 28,1 с ($p \leq 0,05$), час перебування в світлому рукаві лабіринту збільшувався в 13 разів, а тривалість перебування в темному рукаві лабіринту зменшувалася майже в 15 разів. Кількість звішувань зі світлого рукава лабіринту також збільшувалася з 4,40 ± 0,63 у контролі до 6,80 ± 1,19 у дослідній групі ($p \leq 0,05$), а кількість виходів з темного рукава лабіринту в світлий рукав достовірно не змінювалася.

Тривале щоденне введення феназепаму призводило до статистично вірогідного зменшення специфічного ефекту препарату, що свідчить про розвиток резистентності до анксіолітичної дії препарату вже на 10 добу, та формування повної толерантності – через 17 діб.

Встановлення послідовності та термінів розвитку резистентності (толерантності) до анксіолітичної дії феназепаму дають можливість використовувати тривале введення препарату з оцінкою показників поведінки тварин у припіднятому хрестоподібному лабіринті як експериментальну модель для пошуку шляхів і засобів її подолання.

Ключові слова: транквілізатори, анксіолітики, феназепам, резистентність, толерантність

А. А. Котов, Л. А. Громов, А. К. Ярош

Формирование резистентности (толерантности) к анксиолитическому действию феназепама при продолжительном введении мышам

Цель исследования – определение последовательности и сроков формирования резистентности к анксиолитическому действию одного из базовых транквилизаторов из группы бензодиазепинов – феназепама.

Специфическое анксиолитическое действие оценивали по показателям поведения белых мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте (elevated cross-maze test)» после однократного и многократного введения феназепама в дозе 2 мг/кг на 1, 10 и 17 сутки эксперимента.

Феназепам в дозе 2 мг/кг после однократного перорального применения вызывает у мышей анксиолитический эффект, что подтверждено характерным изменением показателей поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте: в частности, латентный период продлевался с 10,40 ± 1,71 с в контроле до 231,60 ± 28,10 с ($p \leq 0, 05$), время пребывания в светлом рукаве лабиринта увеличивалось в 13 раз, а продолжительность пребывания в темном рукаве лабиринта уменьшалась почти в 15 раз. Количество свисаний со светлого рукава лабиринта также увеличивалось с 4,40 ± 0,63 в контроле до 6,80 ± 1,19 в опытной группе ($p \leq 0,05$), а количество выходов из темного рукава лабиринта в светлый рукав достоверно не менялось.

Длительное ежедневное введение феназепама приводило к статистически достоверному уменьшению специфического эффекта препарата, что свидетельствует о развитии резистентности к анксиолитическому действию препарата уже на 10 сутки, и формированию полной толерантности – через 17 суток.

Установление последовательности и сроков развития резистентности (толерантности) к анксиолитическому действию феназепама дают возможность использовать длительное введение препарата с оценкой показателей поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте как экспериментальную модель для поиска путей и средств ее преодоления.

Ключевые слова: транквилизаторы, анксиолитики, феназепам, резистентность, толерантность

O. O. Kotov, L. O. Gromov, O. K. Yarosh

Development of resistance (tolerance) to anxiolytic action of phenazepam in prolonged administration to mice

The aim of the study was determination of the sequence and terms the resistance development to the anxiolytic effects of one of the basic benzodiazepine tranquilizers-phenazepam.

Specific anxiolytic effect was evaluated in terms of the behaviour of white mice in the elevated cross-maze test after single and repeated phenazepam administration (per os) at dose of 2 mg/kg for 1, 10 and 17 days of the experiment.

Phenazepam at a dose of 2 mg / kg after a single administration to mice caused anxiolytic effect, which is confirmed by characteristic changes in indicators of animal behaviour in the elevated cross-shaped maze: in particular, the latent period was extended from 10,4 s ± 1,7 s in the control up to 231,6 s ± 28,1 s ($p \leq 0, 05$), while the residence time in the bright arms of the maze increased 13-fold, and the residence time in the dark arms decreased almost 15 times. Number of overhangs from the light arms of the maze also increased from 4,40 ± 0,63 in the control group to 6,80 ± 1,20 in the experimental group ($p \leq 0,05$), and the number of outputs from the dark labyrinth arms to bright arms was not significantly changed.

Long-term daily phenazepam administration resulted in a statistically significant decrease in the specific effect of the drug, indicating the development of resistance to the anxiolytic action of the drug already on the 10-th day, and the formation of complete tolerance – within 17 days.

The sequencing and terms of the resistance (tolerance) development to the anxiolytic action of phenazepam enable the use of long-term administration of the drug with the evaluation indicators of animal behaviour in the elevated plus-maze as an experimental model to find ways and means to overcome it.

Key words: tranquilizers, anxiolytics, phenazepam, resistance, tolerance

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Котов Олександр Олександрович, молодший науковий співробітник, відділ нейрофармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 92 27.

УДК 616.858-092.9:615.214:615.217.3:615.036

О. В. Макаренко, Т. М. Криворучко

Експериментальна оцінка антипаркінсонічної активності цитиколіну сумісно з амантадином

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: паркінсонічний синдром, амантадин, цитиколін, каталепсія, тремор

Хвороба Паркінсона (ХП) є одним з найрозповсюдженіших нейродегенеративних захворювань, частота реєстрації якого росте зі збільшенням віку населення. Окрім класичних рухових порушень, ХП проявляється широким спектром психічних розладів з порушенням когнітивних функцій. Когнітивні розлади виявляють не менше ніж у 96 % пацієнтів з ХП. Когнитівні порушення посилюються по мірі прогресування захворювання, а на пізній стадії в 80 % пацієнтів досягають ступеня деменції [1]. Збільшення тривалості життя пацієнтів з ХП, досягнуте завдяки успіхам у терапії моторних розладів, призводить до збільшення числа пацієнтів, які страждають на когнітивні розлади. Деменція та пов'язані з нею поведінкові порушення на пізній стадії захворювання затруднюють догляд за хворим, тому раннє виявлення та лікування когнітивних порушень при ХП мають велике значення [2].

Безпосередньо для корекції когнітивних порушень нині використовують лікарські засоби, які впливають на дофамінергічну, норадрененргічну, холінергічну та глутаматергічну передачу. Серед засобів нейропротекторної дії при когнітивному дефіциті частіше лікарі неврологи призначають пірацетам, фенібут, гліцин, аміналон, актовегін, нейромідин, церебролізин та цитиколін. Нашу увагу привернув цитиколін, що має спрямовану дію завдяки взаємодії з рецептором-мішенню. Сьогодні визначені основні механізми реалізації нейропротекторного ефекту цитиколіну, насамперед, це пряма репарація нейрональних мембран. Так, екзогенно введений цитиколін посилює швидку регенерацію поверхні пошкодженої клітини та мітохондріальних мембран, що сприяє підтримці клітинної цілісності. Цитиколін знижує вміст фосфоліпідів, що призупиняє апоптичну та некротичну загибель клітин [3].

З іншого боку, серед засобів вибору лікування ХП на початковій стадії є засоби групи амантадину. Амантадин проявляє м'яку антихолінергічну дію, пригнічує зворотний захват дофаміну та характеризується амфетаміноподібним ефектом, що сприяє вивільненню дофаміна з пресинаптичних терміналей. Амантадин достатньо ефективний при ригідних та акінетичних формах ХП, менше впливає на прояви тремору [4]. Проте можливість використання цитиколіну за умов ХП з урахуванням базової терапії амантадином раніше не вивчалась, також не визначений вплив цитиколіну на прояви ХП.

Мета дослідження – експериментальна оцінка можливої антипаркінсонічної дії цитиколіну за умов експериментальних еквівалентів паркінсонізму (акінетико-ригідної та треморної форми) на тлі антипаркінсонічної корекції амантадином.

Матеріали та методи. Досліди проведені на 60 білих безпородних щурах масою 180–230 г та на 60 білих мишах масою 21–23 г, які методом випадкової вибірки поділені на 6 груп (n = 10): група контролю (0,9 % р-н NaCl) (I) та 5 дослідних. Нами вивчені прояви каталепсії (пригнічення дофамінергічної передачі, еквівалентній стану гіпокінезії та ригідності) та тремору (активація ацетилхолінергічної передачі, що відповідає паркінсонічному тремору) за умов використання амантадину 50 мг/кг (А) (II), цитиколіну 100 мг/кг (Ц100) (III), цитиколіну 500 мг/кг (Ц500) (IV) та сумісного використання А + Ц100 (V) і А+Ц500 (VI) [5, 6]. Каталепсію в щурів викликали введенням трифтазину

© Колектив авторів, 2014

(2 мг/кг). Препарати порівняння та досліджувані речовини вводили перорально разом з трифтазином. Антагонізм з нейролептиком оцінювали за здатністю досліджуваних речовин зменшувати тривалість каталептогенного стану та за кількістю тварин з каталепсією в групі. Тривалість каталепсії реєстрували через 30, 60, 120 хв. Тривалість каталепсії вимірювали в секундах (за часом завмирання тварин у незручній позі на сходинках), її інтенсивність оцінювали у балах за школою Morpurgo [7].

Тварин усаджували на задні кінцівки, дотримуючись наступних вимог. Щур опирається на передню кінцівку, яка знаходиться на сходинці, другу передню кінцівку повинен утримати без опори. Якщо щур зберігає цю позу протягом 10 с при висоті сходинки 3 см, то зараховують 1 бал, а при висоті сходинки 10 см – 2 бали. Праву та ліву лапки почергово поміщають на нижню (3 см) та верхню (10 см) сходинки. Тому на піку розвитку каталепсії одна тварина може отримати максимально 6 балів. Спроба усадити тварину у вимушену позу не повинна перевищувати 1 хв; при цьому ступінь каталепсії оцінюють у балах у всіх тварин групи.

Холінергічна модель паркінсонічного тремору відтворюється різними способами первинної активації холінергічних нейронів хвостатого ядра (інтракаудальне введення АХ з прозеріном), або системним введенням ареколіну чи оксотреморину. Антитреморну дію досліджуваних засобів та їхніх комбінацій оцінювали за бальною шкалою: 0 – відсутність тремору, 1 – локальний дрібноамплітудний тремор голови та кінцівок; 2 – локальний середньоамплітудний тремор; 3 – генералізований тремор. Тремор викликали в мишей підшкірним введенням ареколіну (25 мг/кг), за півгодини вводили досліджувані засоби та їхні комбінації [8].

Усі отримані дані оброблено загальноприйнятими в медико-біологічних дослідженнях методами статистичного аналізу з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм. Математична обробка включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їхніх похибок (± m). Встановлення достовірності міжгрупових відмінностей показників проводили за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента, критерію рангових сум Вілкоксона (Wilcoxon Rank-Sum test), критерію Манна-Уїтні та методу однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Відмінності вважали статистично достовірними при $p \leq 0,05$. Перед застосуванням параметричних критеріїв проводили перевірку гіпотези щодо нормального закону розподілу випадкових величин [9].

Результати та їх обговорення. Аналіз показників каталептогеного стану в щурів протягом 120 хв експерименту, результати якого представлені в таблиці 1, свідчить про те, що на фоні введення А, Ц100 і Ц500 та їхніх комбінацій прояви каталепсії зберігалися в усіх досліджуваних групах. Заслуговують на увагу зміни проявів ригідності та стану каталепсії під впливом Ц та його комбінацій з амантадином: так, під впливом А+Ц500 прояви каталепсії через 30 хв не реєстрували взагалі, а через 120 хв спостерігали лише в 40 % тварин цієї дослідної групи, причому вони характеризувалися низьким показником (0,7 бала при максимально можливих 6 балах).

Зокрема, у щурів групи II наприкінці експерименту прояви олігокінезії спостерігали також у 40 % тварин, проте оціночний критерій дорівнював 1,8 бала. Позитивну динаміку реєстрували на тлі використання Ц100 та Ц500: каталепсію на 90 хв експерименту спостерігали в 90 % та 70 % тварин з оціночним критерієм у 2,8 та 2,6 бала відповідно для зазначених груп. Для порівняння: у групі контролю на цей час каталепсію всіх щурів оцінювали 5 балами.

Таким чином, нами встановлена позитивна антикаталептогенна дія комбінацій амантадину з цитиколіном у дозі 500 мг/кг за умов пригнічення дофамінергічної передачі трифтазином протягом 120 хв.

Відомо, що тремор спокою – тремтливий гіперкінез, виникає в той час, коли м'язи розслаблені та не здійснюються активні рухи, у стані спокою м'язи піддаються впливу лише силі гравітації. Тремор спокою посилюється при збентеженні та мисливій напрузі. Цей вид

Таблиця 1

Показники стану каталепсії в щурів за умов уведення амантадину, цитиколіну та їхнього сумісного застосування

Експериментальна група	Показник	Час спостереження, хв			
		30	60	90	120
Контроль (каталепсія = трифтазин)	% тварин з каталепсією	60	100	100	100
	Інтенсивність каталепсії, бали	1,4	3,6	5,0	5,4
Каталепсія + А (50 мг/кг)	% тварин з каталепсією	30	40	70	40
	Інтенсивність каталепсії, бали	0,5	0,8	1,6	1,8
Каталепсія + Ц100 (100 мг/кг)	% тварин з каталепсією	50	70	90	80
	Інтенсивність каталепсії, бали	0,6	1,4	2,8	2,4
Каталепсія + Ц500 (500 мг/кг)	% тварин з каталепсією	30	60	70	50
	Інтенсивність каталепсії, бали	0,9	2,1	2,6	1,8
Каталепсія + А (50 мг/кг) + Ц100 (100 мг/кг)	% тварин з каталепсією	40	50	60	50
	Інтенсивність каталепсії, бали	0,4	1,1	1,4	1,0
Каталепсія + А (50 мг/кг) + Ц500 (500 мг/кг)	% тварин з каталепсією	–	40	50	40
	Інтенсивність каталепсії, бали	–	0,5	1,0	0,7

тремору найтиповіший для хвороби Паркінсона. Тремор спокою генерується центральним пейсмекером тремору.

У всіх дослідних групах за умов ареколінового тремору на фоні введення амантадину та А сумісно з цитиколіном тремор спостерігали в 100 % тварин. При цьому дещо змінювалася тривалість латентного періоду тремору при введенні амантадину та А сумісно з Ц100 та Ц500: цей показник був у 2,5 разу більшим порівняно з показниками контрольної групи (табл. 2).

Оцінкою феноменології тремору встановлено, що в групі контролю його інтенсивність була максимально вираженою – 2,9 бала (рисунок). Прояви його з оцінкою в 2,3–2,5 бала спостерігали на фоні отримання Ц у дозі 500 та 100 мг/кг відповідно. Проте на фоні введення комбінацій А+Ц100 та А+Ц500 інтесивність тремору була

Таблиця 2

Показники антитреморної дії в мишей за умов введення амантадину, цитиколіну та їхнього сумісного застосування на моделі активації ацетилхолінергічної системи ареколіном

№	Дослідна група	Тривалість латентного періоду, с	Тривалість продовження тремору, хв
1	Контроль (тремор = ареколін, 25 мг/кг, п/к)	48,6 ± 12,9	39,30 ± 7,30
2	Тремор + А (50 мг/кг)	121,8 ± 7,6*	18,70 ± 1,96*
3	Тремор + Ц (100 мг/кг)	87,1 ± 9,9	30,30 ± 5,10
4	Тремор + Ц (500 мг/кг)	61,0 ± 10,3	28,00 ± 5,44
5	Тремор + А (50 мг/кг) + Ц (100 мг/кг)	122,8 ± 9,8*	25,60 ± 5,01*
6	Тремор + А (50 мг/кг) + Ц (500 мг/кг)	132,7 ± 8,9*	18,30 ± 2,90*

*Примітка. *$p \leq 0,05$ відносно показників групи контролю.*

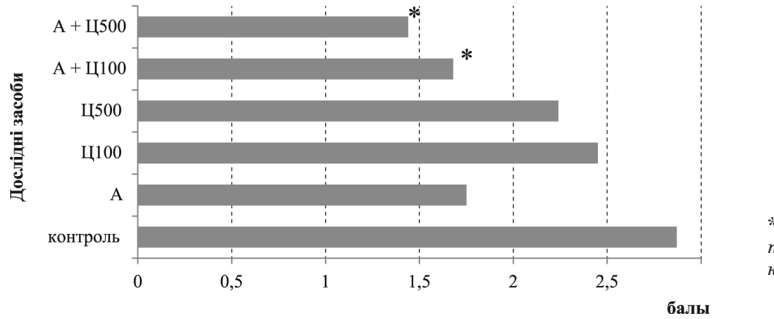

Рисунок. Інтенсивність тремору за умов введення амантадину, цитиколіну та їхнього сумісного застосування на моделі активації ацетилхолінергічної системи ареколіном, бали

меншою в 1,7 разу (p ≤ 0,05) та в 1,9 разу (P ≤ 0,05) відповідно порівняно з показниками групи контролю.

Отже, аналіз змін антитреморної дії за умов активації холінергічної системи на фоні терапії амантадином дозволив встановити, що цитиколін у дозі 100 мг/кг та 500 мг/кг сприяє оптимізації антитреморної дії амантадину, що виражається в збільшенні латентного періоду тремору, зменшенні його тривалості та ослабленні інтенсивності майже в 2 рази.

Висновок

На підставі одержаних даних щодо антипаркінсонічної дії цитиколіну в дозі 100 мг/кг та 500 мг/кг на тлі базової терапії амантадином за умов пригнічення дофамінергічної передачі (каталепсія) та активації холінергічної передачі (ареколіновий тремор) можна зробити висновок, що сумісне використання амантадину та цитиколіну є ефективним, а саме спостерігається зниження проявів експериментального паркінсонізму.

1. Sydney multicenter study of Parkinson's disease / Hely M. A., Morris J. G., Reid W. G. [et al.] // Mov. Disord. – 2008. – V. 23. – P. 837–844.
2. *Левин О. С.* Подходы к терапии когнитивных нарушений при болезни Паркинсона / Левин О. С., Батукаева Л. А. // Болезнь Паркинсона и расстройства движений: Руководство для врачей; под ред. С. Н. Илларионшкина, Н. Н. Яхно. – М., 2008. – С. 170 –173.
3. *Saver J. L.* Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair / Saver J. L. // Rev Neurol Dis. – 2008. – V. 5 (4) – P. 167–177.
4. *Карабань И. Н.* Блокаторы глутаматных рецепторов (Неомидантан) в патогенетической терапии болезни Паркинсона и других неврологических заболеваний. Методические рекомендации / И. Н. Карабань, Н. В. Карабань, Н. В. Карасевич. – К., 2004. – 24 с.
5. *Saver J. L.* Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair / Saver J. L. // Rev. Neurol. Dis. – 2008. – V. 5. – P. 167–177.
6. *Макаренко О. В.* Оценка антиноцицептивной активности комбинаций амантадина с ненаркотическими анальгетиками в условиях нарушения нейросинаптической передачи по типу каталепсии и тремора / Макаренко О. В, Мамчур В. Й. // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2009. – №1 (15). – С. 74–78.
7. *Мамчур В. Й.* Алгоритм доклінічної оцінки (загальна фармакологія, специфічна активність) антипаркінсонічних засобів. Методичні рекомендації / Мамчур В. Й., Макаренко О. В., Дронов С. М. – К., 2009. – 21 с.
8. *Макаренко О. В.* Сучасний погляд на доклінічне вивчення антипаркінсонічних засобів / Макаренко О. В., Мамчур В. Й. // Ліки. – 2007. – № 3–4. – С. 3–11.
9. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. – К. : «Морион», 2001. – 408 с.

О. В. Макаренко, Т. М. Криворучко

Експериментальна оцінка антипаркінсонічної активності цитиколіну сумісно з амантадином

Хворобу Паркінсона (ХП) традиційно розглядають як захворювання, що вражає моторну сферу. Але крім моторних проявів у клінічній картині захворювання присутні й немоторні прояви захворювання, серед яких найчастіше зустрічається деменція. *Мета дослідження* – експериментальна оцінка можливої антипаркінсонічної дії цитиколіну за умов експериментальних еквівалентів паркінсонізму (акінетико-ригідної та треморної форми) на тлі антипаркінсонічної корекції амантадином. Методи дослідження: модель каталепсії (пригнічення дофамінергічної передачі, еквівалентної стану гіпокінезії та ригідності) та модель ареколінового тремору (активація ацетилхолінергічної передачі, що відповідає паркінсонічному тремору) на фоні введення амантадину (50 мг/кг), цитиколіну (100 мг/кг та 500 мг/кг) та їхнього сумісного застосування.

Результатами дослідження встановлена позитивна динаміка сумісного використання амантадину сумісно з цитиколіном у дозі 100 мг/кг та 500 мг/кг, що визначилося низьким процентом тварин з проявами каталепсії (40–60 %) з оціночним критерієм у 0,5–1,4 бала при максимально можливих 6 балах. Схожі результати отримані за умов активації холінергічної системи (ареколіновий тремор): цитиколін у дозі 100 мг/кг та 500 мг/кг сприяє оптимізації антитреморної дії амантадину, що виражається в збільшенні латентного періоду тремору, зменшенні його тривалості та ослабленні інтенсивності майже в 2 рази порівняно з показниками контрольної групи.

Таким чином, досліджені комбінації амантадину сумісно з цитиколіном у дозі 100 мг/кг та 500 мг/кг є перспективними щодо вивчення впливу на дементні порушення за умов експериментальних еквівалентів паркінсонізму з урахуванням базової антипаркінічної терапії амантадином, що й стане метою подальших наукових досліджень.

Ключові слова: паркінсонічний синдром, амантадин, цитиколін, каталепсія, тремор

О. В. Макаренко, Т. Н. Криворучко

Экспериментальная оценка антипаркинсонической активности цитиколина совместно с амантадином

Болезнь Паркинсона (БП) традиционно рассматривают как заболевание, которое поражает двигательную функцию человека. Но помимо двигательных проявлений в клинической картине заболевания присутствуют и немоторные проявления заболевания, среди которых чаще встречается деменция. *Цель исследования* – экспериментальная оценка антипаркинсонического действия цитиколина в условиях экспериментальных эквивалентов паркинсонизма (акинетико-ригидная и треморная формы) на фоне антипаркинсонической коррекции амантадином. Методы исследования: модель каталепсии (угнетение дофаминергической передачи, эквивалент состояния гипокинезии и ригидности) и модель ареколинового тремора (активация ацетилхолинергической передачи, которая соответствует паркинсоническому тремору) на фоне введения амантадина (50 мг/кг), цитиколина (100 мг/кг и 500 мг/кг) и их совместного использования.

Результатами исследования установлена позитивная динамика совместного использования амантадина с цитиколином в дозе 100 мг/кг и 500 мг/кг, что подтверждается низким процентом животных с проявлениями каталепсии (40–60 %) с оценочным критерием в 0,5–1,4 балла при максимально возможных 6 баллах. Похожие результаты получены в условиях активации холинергической системы (ареколиновый тремор): цитиколин в дозе 100 мг/кг и 500 мг/кг способствовал оптимизации антитреморного действия амантадина, что зарегистрировалось в увеличенном латентном периоде тремора, уменьшении его длительности и ослаблении интенсивности почти в 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы.

Таким образом, исследуемые комбинации амантадина совместно с цитиколином в дозе 100 мг/кг и 500 мг/кг являются перспективными в плане изучения их влияния на дементные нарушения в условиях паркинсонического синдрома с учетом базовой антипаркинсонической терапии амантадином, что и станет целью дальнейших научных исследований.

Ключевые слова: паркинсонический синдром, амантадин, цитиколин, каталепсия, тремор

O. V. Makarenko, T. N. Kryvoruchko

Experimental evaluation of antiparkinsonian activity of Citicoline combined with Amantadine

Parkinson's disease is traditionally viewed as a disease affects the humans' locomotor activity. Besides motor manifestations in the clinical picture of the disease are present non-motor manifestations such as dementia. *The purpose of this study* was experimental evaluation of the possible antiparkinsonian action of Citicoline in experimental models of Parkinson's disease (akinetic-rigid and tremulous forms) in the background antiparkinsonian correction by amantadine. Methods: catalepsy model (inhibition of dopaminergic transmission that equivalent hypokinesia and rigidity) and model of tremor by arekolyn (activation cholinergic transmission that corresponds parkinsonian tremor) in the background of Amantadine administration (50 mg/kg), Citicoline (100 mg/kg and 500 mg/kg) and their combined introduction.

The research results show a positive dynamic after Amantadine administration combined with Citicoline at a dose of 100 mg/kg and 500 mg/kg, which is determined by the low percentage of animals with symptoms of catalepsy (40–60 %) with the evaluation criteria in the 0,5–1,4 points at maximum possible 6 points. Similar results were obtained under activation of the cholinergic system (arekolins tremor). Citicoline at a dose of 100 mg/kg and 500 mg/kg promoted to optimization of antitremors action of Amantadine. That is registered in increasing of the latent period of tremor, reducing its duration and intensity attenuation is almost 2 times comparison with indicators of the control group.

Thus, combination of Amantadine with Citicoline at a dose of 100 mg/kg and 500 mg/kg are promising in searching of its influence on dementia in Parkinson's syndrome and we will continue our study.

Key words: Parkinson's syndrome, amantadine, citicoline, catalepsy, tremor

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Макаренко Ольга Володимирівна, доктор медичних наук, професор, кафедра соціальної медицини, організації та управління охороною здоров'я, ДЗ «Дніпропетровська медична академія», буд. 9, вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49044.
Тел.: + 38 056 713 52 66. Електронна пошта: makarenko011@rambler.ru

УДК 616.832-004-092.4-092.9:159.9.019.4

О. О. Нефьодов

Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних аналгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: розсіяний склероз, поведінкові реакції, м'язовий тонус, ненаркотичні аналгетики, ад'ювантні засоби

Проблема лікування розсіяного склерозу (РС) залишається актуальною в сучасній неврології. Одним з клінічних проявів хронічного запального та демієлінізуючого процесу при цьому захворюванні є порушення вищих коркових функцій, яким до недавнього часу приділялася недостатня увага при дослідженні неврологічного статусу та оцінці ефективності лікування. У той самий час більше половини хворих вже на початкових стадіях захворювання пред'являють скарги на стійкі порушення нейропсихологічних функцій, і практично всі мають психологічні проблеми [1, 2].

У хворих на РС відзначається надзвичайний поліморфізм психічних порушень з широким спектром психопатологічних явищ – від невротичних розладів до психотичних станів і епілептоформного синдрому [3–5]. Зазвичай останні не виходять за межі екзогенного типу реагування, хоча частіше коло психопатологічних явищ у хворих даної категорії вичерпується розладами емоційної й інтелектуально-мнестичної сфер та потребують фармакологічної корекції [6].

Важливо зазначити, що хворі на РС знаходяться на лікуванні, яке включає базову гормональну терапію (наприклад, метилпреднізолоном) та корекцію супутніх проблем, таких як нейрогенний больовий синдром, що потребує використання знеболюючих засобів та засобів ад'ювантної терапії [7]. Ад'ювантні засоби в терапії больового синдрому застосовуються для посилення дії аналгетиків, а також з метою корекції небажаних симптомів, які супроводжують основне захворювання.

Мета дослідження – експериментальна оцінка впливу аналгетиків (парацетамол, диклофенак натрію, лорноксикам) та ад'ювантних засобів (габапентин, амітриптилін) на поведінкові реакції щурів в тесті «відкрите поле» та м'язовий тонус на фоні моделювання експериментального еквівалента розсіяного склерозу (ЕЕРС).

Матеріали та методи. До початку виконання робіт комісією з питань біоетики затверджено протокол майбутніх досліджень. Згідно із вимогами GLP та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших цілей, узгоджені всі процедури, що пов'язані з утриманням тварин, гуманним поводженням з ними та використанням їх в експерименті.

Досліди проведено на 60 білих безпородних щурах масою 180–230 г з ЕЕРС, яких методом випадкової вибірки було розподілено на 6 груп (n = 10): I – контроль (ЕЕРС); II – парацетамол, 150 мг/кг (табл., 500 мг, «Глаксо Сміт Клайн», Ірландія); III – диклофенак натрію, 10 мг/кг (табл. 25 мг, «Здоров'я», Україна); IV – лорноксикам 0,3 мг/кг (табл., 4 мг, «Nycomed», Дан./Австр.); V – габапентин, 100 мг/кг (капс. 300 мг, «Фарма Старт», Україна) та VI – амітриптилін, 10 мг/кг (табл., 25 мг, «ГНЦЛС», Україна).

© О. О. Нефьодов , 2014

Для відтворення ЕЕРС було використано метод введення енцефалітогенної емульсії внутрішньошкірно в подушечки кінцівок, у ділянки грудини чи спинки тварин, а також в основу хвоста щурів [8]. Усі лікарські засоби застосовували перорально протягом 5 діб (1 раз на одну добу), починаючи з 12 доби від початку моделювання патологічного стану. Зміни поведінки тварин вивчали в тесті «відкрите поле», рівень рухової активності характеризували за кількістю перетнутих квадратів (горизонтальна активність) та стойок (вертикальна активність). Орієнтувально-дослідницькі реакції оцінювали за кількістю заглядань, емоційний стан – за кількістю актів грумінгу та болюсів [9] Оцінку поведінкових показників реєстрували в вихідному стані, на 12 добу (максимальні прояви патології) та на 17 добу – після 5-денної терапії знеболюючим засобом чи ад'ютантом. Також у цей період проводили оцінку стану м'язового тонусу в щурів (за тривалістю утримування тварин на стрижні, що обертається) на фоні введення досліджуваних засобів за умов модельованої патології [10]. Усі отримані дані оброблено загально прийнятими в медико-біологічних дослідженнях методами статистичного аналізу з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм. Математична обробка включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їхніх похибок (± m). Встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по значеннях показника порога больового реагування проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента, критерію рангових сум Вілкоксона (Wilcoxon Rank-Sum test), критерію Манна-Уїтні та методу однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Відмінності вважали статистично достовірними при рівні $p \leq 0,05$. Перед застосуванням параметричних критеріїв проводили перевірку гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин [11].

Результати та їх обговорення. У вихідному стані тварини всіх дослідних груп були досить активними: показники моторно-дослідницької та емоційної активності коливалися в межах фізіологічної норми для гризунів відповідної вікової групи. Заслуговує на увагу те, що в 100 % тварин усіх дослідних груп зміни рухово-дослідницької активності в тесті «відкрите поле» на 12 добу моделювання ЕЕРС мали однакову спрямованість, а саме: кількість перетнутих квадратів знизилася в 1,8 разу для групи V (габапентин) та в 5,6 разу для групи I (контроль); кількість заглядань у «норки» знизилася в 2,0 разу для групи II (диклофенак) та в 5,5 разу для групи VI (амітриптилін) порівняно з показниками вихідного стану. Кількість вертикальних підйомів у цей час експерименту зменшувалася в 8 разів для групи IV (лорноксикам) та в 2,6 разу для групи VI (амітриптилін) порівняно з показниками вихідного стану. Емоційний стан тварин на 12 добу експерименту оцінювали як тривожний з показниками седації: кількість актів грумінгу та болюсів була значно меншою в усіх дослідних групах порівняно з показниками вихідного стану (табл. 1).

Слід зазначити, що на 17 добу експерименту після 5-денного введення парацетамолу та диклофенаку натрію показники безумовно-рефлекторної активності реєстрували на рівні, зафіксованому в попередній термін – на 12 день експерименту, а деякі параметри стали ще нижчими. Стан тварин характеризувався як гіподинамічний та тривожний, дослідницька поведінка була відсутня.

Показано, що після 5-денного введення лорноксикаму, габапентину та амітриптиліну рухова активність була дещо інтенсивнішою порівняно з показниками 12 доби досліду, проте залишалася нижчою ніж у вихідному стані. Крім того, у цих експериментальних групах спостерігали позитивну динаміку дослідницької активності: кількість вертикальних стойок збільшилася майже в 2 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками 12 доби експерименту. Подібна динаміка зареєстрована також щодо числа заглядань у «норки»: для групи габапентину – збільшення в 1,5 разу ($p \geq 0,05$) та для групи амітриптиліну – у 1,3 разу ($p \geq 0,05$).

Показано, що після введення габапентину емоційний стан тварин покра-

Таблиця 1

Показники поведінки щурів у тесті «відкрите поле» за умов моделювання розсіяного склерозу та введення ненаркотичних аналгетиків та ад'ювантних засобів

Експериментальна група	Критерії оцінки в тесті «відкрите поле»	Показники, M ± m		
		Вихідний стан	Через 12 діб	Через 17 діб
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу	квадрати	25,17 ± 1,75	4,50 ± 0,71	12,33 ± 1,52
	норки	8,33 ± 1,08	2,50 ± 0,22	2,50 ± 0,67
	стійки	7,00 ± 0,73	1,00 ± 0,36	1,66 ± 0,49*
	грумінг	1,50 ± 0,22	0,66 ± 0,21	0,83 ± 0,16
	болюси	0,83 ± 0,30	0,50 ± 0,22	1,16 ± 0,16
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Парацетамол	квадрати	21,16 ± 1,53	6,66 ± 1,08*	2,66 ± 0,33*
	норки	8,83 ± 0,60	4,66 ± 0,55*	3,00 ± 0,25*
	стійки	6,33 ± 0,91	1,50 ± 0,34*	0,33 ± 0,21*
	грумінг	1,33 ± 0,21	1,33 ± 0,21	0,66 ± 0,21*
	болюси	0,83 ± 0,30	0,83 ± 0,16	0,50 ± 0,22
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Диклофенак	квадрати	24,83 ± 2,92	8,66 ± 0,66*	2,33 ± 0,33*
	норки	7,16 ± 0,83	2,00 ± 0,36*	0,83 ± 0,30*
	стійки	6,00 ± 0,85	1,50 ± 0,34*	–
	грумінг	2,33 ± 0,42	0,83 ± 0,30	0,33 ± 0,21*
	болюси	1,16 ± 0,40	0,66 ± 0,21	1,00 ± 0,25
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Лорноксикам	квадрати	24,16 ± 1,64	12,16 ± 0,60*	14,16 ± 1,70*
	норки	7,00 ± 1,21	3,33 ± 0,76*	3,83 ± 0,54*
	стійки	8,83 ± 1,19	1,00 ± 0,25	2,66 ± 0,49
	грумінг	1,00 ± 0,44	0,50 ± 0,22	0,83 ± 0,40
	болюси	1,00 ± 0,36	0,50 ± 0,22	1,33 ± 0,42
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Габапентин	квадрати	19,83 ± 1,47	11,00 ± 1,41*	15,50 ± 1,11*
	норки	6,00 ± 0,68	3,16 ± 0,60*	4,16 ± 0,83*
	стійки	7,33 ± 0,66	2,83 ± 0,30*	1,50 ± 0,56*
	грумінг	1,00 ± 0,36	1,00 ± 0,36	2,16 ± 0,30*
	болюси	0,83 ± 0,40	1,66 ± 0,33	1,16 ± 0,30
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Амітриптилін	квадрати	22,0 ± 1,42	4,83 ± 0,70*	12,33 ± 1,52*
	норки	6,0 ± 0,36	1,33 ± 0,42*	2,50 ± 0,67*
	стійки	5,00 ± 0,51	–	1,66 ± 0,49*
	грумінг	1,16 ± 0,47	0,83 ± 0,16	0,83 ± 0,16
	болюси	1,00 ± 0,25	0,83 ± 0,16	1,16 ± 0,16

*Примітка. Тут і в табл. 2: *P ≤ 0,05 порівняно з показниками вихідного стану, n = 10.*

щався: кількість актів грумінгу та болюсів збільшилася майже в 2 рази (порівняно з показниками вихідного стану), тварини були спокійними, тривожних станів не спостерігали. У тварин з модельованою патологією реєстрували зміни м'язового тонусу у вихідному стані, а також на 12 та 17 добу формування процесів демієлінізації. У вихідному стані час, протягом якого щури утримувалися на стрижні, що обертається, (показник м'язової сили), становив від 10,0 ± 2,3 с (група V) до 12,0 ± 2,2 с (група I). При цьому

вже до 12 доби формування демієлінізації спостерігали зменшення м'язового тонусу в середньому в 1,5–2,5 разу для всіх досліджуваних груп (табл. 2).

Встановлено, що за умов 5-денного введення знеболюючих засобів, а саме, парацетамолу, диклофенаку натрію, м'язовий тонус був знижений, тварини були неспроможні зачепитися за стрижень. Схожі дані реєстрували на фоні введення амітриптиліну (2,2 ± 0,7 с), що відповідало лише 20,75 % ($p \leq 0,5$) порівняно з показниками вихідного стану.

Показано, що більш позитивна динаміка щодо зміцнення м'язового тонусу була зареєстрована на фоні 5-денного введення габапентину: збільшення часу, протягом якого щури утримувалися на стрижні, склало 47,2 % ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками 12 доби експерименту. Порівняно з показниками вихідного стану тонус м'язів передніх кінцівок у щурів даної групи залишався зниженим у 1,88 разу ($p \leq 0,05$), але більше ніж у 9 разів перевищував показник тварин з ЕЕРС у той самий термін експерименту.

При порівнянні показників дослідницької активності між групою ЕЕРС сумісно з диклофенаком та ЕЕРС з лорноксикамом зареєстровано позитивну динаміку щодо кількості заглядань у норки, на фоні отримання лорноксикаму цей показник був збільшений у 4,6 разу ($p \leq 0,05$) на 17 добу експерименту порівняно з показником групи диклофенаку.

Схожі дані були отримані за показником орієнтувально-дослідницької активності на фоні 5-разового введення габапентину, кількість заглядань у норки під його впливом збільшувалася в 1,6 разу ($p \leq 0,05$) порівняно з показником групи тварин без лікування.

Отже, нами відзначені аналгетик (лорноксикам) та ад'ювант (габапентин) як засоби, що сприяли поліпшенню поведінкових показників тварин у тесті «відкрите поле» та покращанню м'язового тонусу передніх кінцівок у щурів за умов модельованої патології ЦНС, а саме, експериментального еквівалента РС.

Висновки

1. В експерименті на тваринах з моделлю РС встановлено, що на 12 та 17 добу формування патологічного стану зменшуються показники рухової активності, орієнтувально-дослідницької реакції та емоційного стану щурів у тесті «відкрите поле», а також м'язового тонусу.

2. Показано, що серед досліджених знеболюючих (парацетамол, диклофенак натрію, лорноксикам) та ад'ювант-

Таблиця 2

М'язовий тонус у щурів за умов моделювання розсіяного склерозу та застосування ненаркотичних аналгетиків і ад'ювантних засобів

Експериментальна група	Тривалість утримування щурів на стрижні, що обертається, с (M ± m)		
	Вихідний стан	Через 12 днів	Через 17 днів
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу	12,0 ± 2,2	4,5 ± 1,4*	0,6 ± 0,7*
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Парацетамол	11,6 ± 2,7	4,0 ± 1,0*	1,0 ± 1,2*
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Диклофенак	10,7 ± 2,7	3,2 ± 0,8*	0,9 ±1,0*
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Лорноксикам	11,9 ± 2,5	3,4 ± 0,9*	2,4±0,7*
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Габапентин	10,0 ± 2,3	3,6 ± 0,7*	5,3±1,2*
Експериментальний еквівалент розсіяного склерозу + Амітриптилін	10,6 ± 1,5	3,4 ± 0,8*	2,2±0,7*

них (габапентин, амітриптилін) засобів найефективнішими щодо корекції поведінкових реакцій та м'язового тонусу в тварин, порушених за умов патологічного стану, є лорноксикам та габапентин.

3. Сукупність отриманих результатів щодо впливу аналгетичних та ад'ювантних засобів на поведінку та м'язовий тонус щурів з моделлю РС обґрунтовує перспективність подальших досліджень лорноксикаму та габапентину на тлі базової гормональної терапії як засобів фармакологічної корекції відповідних порушень при РС та оптимізації лікування цього патологічного стану.

1. Immunologic response to acute psychological stress in MS patients and controls / Ackerman K. D., Martino M., Heyman R. [et al.] // J. Neu-roimmunol. – 1996. – V. 68. – P. 85–94.
2. *Гусев Е. И.* Рассеянный склероз / Гусев Е. И., Демина Т. Л., Бойко А. Н. – М. : Нефть-газ 1997. – Р. 190–230.
3. *Вейн А. М.* Течение рассеянного склероза у мужчин и женщин / Вейн А. М. // Журн. невропатол. и психиатр. – 1995. – № 4 – С. 43–44.
4. Оценка уровня стресса по шкале Ридера у женщин с рассеянным склерозом / Виноградов А. А. [и др.] // Болезни и дисфункции нервной системы у женщин репродуктивного возраста: Сб. научных трудов. – Рязань, 1995. – С.11–12.
5. *Сергеев В. В.* Психические расстройства у больных с демиелинизирующими заболеваниями / Н. С. Сергеев В. В., Скударнова З. А. // Неврозоподобные состояния: сб. научных трудов. – Смоленск, 1988. – С.43–46.
6. Алгоритми клінічного використання болетамуючих засобів (наркотичних та ненаркотичних аналгетиків) при гострому та хронічному синдромі. Методичні рекомендації / О. П. Вікторов, О. В. Макаренко, В. Й. Мамчур, С. М. Дронов. – К. : ДЕЦ України, 2011. – 56 с.
7. *Siniscalchi A*. Effects of topiramate on dysaesthetic pain in a patient with multiple sclerosis / Siniscalchi A.., Gallelli L., De Sarro G. // Clin Drug Investig. – 2013. – V. 33 (2). – P. 151–4.
8. *Нефьодов О. О*. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, Ю. В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 2 (114). – С. 205–208.
9. Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс / Мельников А. В., Куликов М. А., Новикова М. Р., Шарова Е. В. / Журнал высшей нервной деятельности. – 2004. – Т. 54, № 5. – С. 712–717.
10. *Калуев А. В.* Стресс, тревожность и поведение. Актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных. – К., 1998. – 95 с.
11. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCE / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. – К. : Морион, 2001. – 408 с.

О. О. Нефьодов

Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних аналгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу

Мета дослідження – експериментальна оцінка впливу аналгетиків (парацетамол, диклофенак натрію, лорноксикам) та ад'ювантних засобів (габапентин, амітриптилін) на поведінкові реакції щурів в тесті «відкрите поле» та м'язовий тонус на фоні моделювання розсіяного склерозу.

Розсіяний склероз у щурів моделювали шляхом внутрішньошкірного введення енцефалітогенної емульсії. Лікарські препарати вводили з 12 доби від початку моделювання патологічного стану 1 раз на одну добу протягом 5 діб. Поведінку тварин у тесті «відкрите поле» оцінювали за показниками рухової (кількість перетнутих квадратів – горизонтальний компонент та стойок – вертикальний компонент), дослідницько-орієнтувальної активності (кількість заглядань у «норки») та емоційного стану (кількість актів грумінгу та болюсів). Оцінювали також м'язовий тонус за показником часу утримування тварини на стрижні, що обертається.

Результати проведених досліджень на тваринах з моделлю розсіяного склерозу свідчать про позитивну динаміку показників поведінки щурів у тесті «відкрите поле» після 5-разового щоденного застосування знеболюючого засобу лорноксикаму в дозі 0,3 мг/кг та ад'юванту габапентину в дозі 100 мг/кг. Так на 17 добу експерименту після 5-разового застосування габапентину збільшувалася рухова активність тварин: кількість перетнутих квадратів у тесті «відкрите поле» збільшилася на 40,9 % порівняно з показниками 12 доби експерименту, а також значно посилювалася дослідницько-орієнтувальна поведінка. За цим показником габапентин перевершував усі досліджені препарати. Емоційний стан тварин за оціночним критерієм кількості актів грумінгу та болюсів відповідав показникам вихідного стану, щури були спокійні, без проявів тривожності. За цих умов також значно покращувався м'язовий тонус: тривалість утримування щурів на стрижні, що обертається, збільшувалася майже в 1,5 разу порівняно з попереднім терміном дослідження та майже в 9 разів порівняно з показником тварин без лікування.

Подібні показники були зареєстровані на фоні 5-разового щоденного введення лорноксикаму щурам з моделлю розсіяного склерозу, який перевищував ефекти інших аналгетиків (парацетамолу, диклофенаку) на поведінку тварин у тесті «відкрите поле», зокрема, за показником орієнтувально-дослідницької реакції лорноксикам був у 4,6 разу ефективніший за диклофенак. Відзначено також позитивний вплив лорноксикаму на м'язовий тонус, за цим показником препарат поступався лише габапентину.

Сукупність отриманих результатів щодо впливу аналгетичних та ад'ювантних засобів на поведінку та м'язовий тонус щурів з моделлю розсіяного склерозу обґрунтовує перспективність подальших досліджень лорноксикаму та габапентину на тлі базової гормональної терапії як засобів фармакологічної корекції відповідних порушень при розсіяному склерозі та оптимізації лікування цього патологічного стану.

Ключові слова: розсіяний склероз, поведінкові реакції, м'язовий тонус, ненаркотичні аналгетики, ад'ювантні засоби

А. А. Нефедов

Сравнительная оценка влияния ненаркотических анальгетиков и средств адъювантной терапии на поведенческие реакции крыс в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза

Цель исследования – экспериментальная оценка влияния анальгетиков (парацетамол, диклофенак натрия, лорноксикам) и адъювантных средств (габапентин, амитриптилин) на поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле» и мышечный тонус на фоне моделирования рассеянного склероза.

Рассеянный склероз у крыс моделировали внутрикожным введением энцефалитогенной эмульсии. Лекарственные препараты вводили, начиная с 12 суток моделирования патологического состояния 1 раз в 1 сутки на протяжении 5 суток. Поведение животных в тесте «открытое поле» оценивали по показателям двигательной активности (количество пересеченных квадратов – горизонтальный компонент и стоек – вертикальный компонент), ориентировочно-исследовательской реакции (количество заглядываний в «норки») и эмоционального состояния (количество актов груминга и болюсов). Оценивали также мышечный тонус по показателю времени удерживания животных на вращающемся стержне.

Результатами исследования на животных с моделью рассеянного склероза установлена положительная динамика показателей поведения крыс в тесте «открытое поле» после 5-кратного применения анальгетика лорноксикама в дозе 0,3 мг/кг и адъюванта габапентина в дозе 100 мг/кг. Так на 17 сутки эксперимента после 5-кратного применения габапентина увеличивались показатели двигательной активности животных (количество пересеченных квадратов в тесте «открытое поле» увеличилось на 40,9% по сравнению с показателями 12 дня эксперимента), а также ориентировочно-исследовательской реакции. По этому показателю габапентин превосходил все исследованные препараты. Эмоциональное состояние животных по оценочным критериям количества актов груминга и болюсов соответствовало исходному состоянию, крысы были спокойны, без проявлений тревожности. В этих условиях также значительно улучшался мышечный тонус: время удерживания крыс на вращающемся стержне увеличивалось почти в 1,5 раза по сравнению с предыдущим сроком эксперимента и почти в 9 раз по сравнению с показателем животных без лечения.

Похожие показатели были зарегистрированы на фоне 5-дневного введения лорноксикама, который превосходил эффекты других анальгетиков (парацетамола, диклофенака) на поведение животных в тесте «открытое поле», в частности, по показателю ориентировочно-исследовательской реакции лорноксикам был в 4,6 раза эффективнее диклофенака. Отмечено также положительное влияние лорноксикама на мышечный тонус, по этому показателю препарат уступал только габапентину.

Совокупность полученных результатов о влиянии анальгетических и аъювантных средств на поведение и мышечный тонус животных с моделью рассеянного склероза обосновывает перспективность дальнейших исследований лорноксикама и габапентина на фоне базисной гормональной терапии как средств фармакологической коррекции соответствующих нарушений при рассеянном склерозе и оптимизации лечения этого патологического состояния.

Ключевые слова: рассеянный склероз, поведенческие реакции, мышечный тонус, ненаркотические анальгетики, адъювантные средства

O. O. Nefedov

Comparative evaluation of the impact of non-narcotic analgesics and adjuvant drugs on the behavioural responses of rats under the experimental equivalent of multiple sclerosis

The goal of the study was an experimental evaluation of the effects of analgesics (paracetamol, diclofenac sodium, lornoxicam) and adjuvant drugs (gabapentin, amitriptyline) on the behavioural responses of rats in the test "open field" and muscle tone under modeling of multiple sclerosis.

Multiple sclerosis in rats was modelled by intradermal administration of encephalitogenic emulsion. The drugs were administered starting from 12 days of modelling pathological condition 1 times a day for 5 days. The behaviour of animals in the test "open field" was assessed by locomotor activity (number of squares crossed – the horizontal component and racks – vertical component), orienting-investigative reaction (number of peeping in "mink") and emotional reactions (number of acts of grooming and boluses). Also was evaluated muscle tone in terms of the retention time of the animals on a rotating rod.

As to the results of studies on animal model of multiple sclerosis it was established positive dynamics of rats behaviour in the test "open field" after 5-day administration of an analgesic lornoxicam at dose of 0.3 mg / kg and an adjuvant gabapentin in a dose of 100 mg / kg. Thus on 17 days of the experiment after a 5-time gabapentin administration there were increased motor activity indicators of the animals (number of squares traversed in the test "open field" increased by 40.9% as compared with the day 12 of the experiment), and orienting-investigative reaction. For the latter indicator, gabapentin was superior to all the studied drugs.

The emotional state of the animals by the evaluation criteria such as the number of acts of grooming and boluses corresponded to the initial state, rats were calm, with no manifestations of anxiety. Under these conditions, significantly improved muscle tone: the retention time of rats on the rotating rod was increased about 1.5 times in comparison with the previous experiment period and almost 9-fold compared to the untreated animals.

Similar parameters have been reported after 5 - day administrations of lornoxicam, which exceeded the effects of other analgesics (paracetamol, diclofenac) on the animals behaviour in the test "open field", in particular in terms of orienting-investigative reaction lornoxicam was 4.6 times more effective than diclofenac. Also noted a positive effect of lornoxicam on muscle tone, this indicator was second only to the drug gabapentin.

Set of the results on the effects of analgesics and adjuvant drugs on the behaviour and muscle tone of animals under modelling of multiple sclerosis substantiates the prospects of the further studies lornoxicam and gabapentin with basic hormonal therapy as a means of pharmacological correction corresponding disorders in multiple sclerosis and to optimize the treatment of this pathological condition.

Keywords: multiple sclerosis, behavioural reactions, muscle tone, non-narcotic analgesics, adjuvant drugs

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Нефьодов Олександр Олександрович, доцент кафедри фармакології і клінічної фармакології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», буд. 9,
вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49044.
Тел.: + 38 093 779 32 79. Електронна пошта: nefedov911@mail.ru

УДК 615.275_616.37

Н. В. Добреля, Є. В. Стрєлков, О. С. Хромов, К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, А. І. Соловйов

Роль дельта-ізоформи протеїнкінази С у розвитку порушень коронарного кровотоку, що викликані цукровим діабетом

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

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, дельта-ізоформа протеїнкінази С, малі інтерферуючі РНК, коронарний кровотік, скоротливість міокарда

Перебіг цукрового діабету (ЦД) може призводити до численних різноманітних ускладнень. Особливе місце серед них, у зв'язку з підвищеним ризиком для життя пацієнтів, займають діабетична кардіоміопатія та коронарна недостатність.

Діабетична кардіопатія є наслідком дії гіперглікемії на міокард, що призводить до гіпертрофії лівого шлуночка, оксидативного стресу, апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, фіброзу. Усі ці фактори викликають суттєві порушення скоротливої та насосної функції серця та виражаються в розвитку серцевої недостатності [1, 2].

За сучасними уявленнями коронарна недостатність, яка розвивається у хворих на ЦД як 1, так і 2 типу, головним чином пов'язана з порушенням ендотелійзалежного розслаблення коронарних артерій, імовірно, унаслідок субендотеліального та ендотеліального фіброзу. При такому ускладненні спостерігається суттєве зниження коронарного кровотоку та виникає ризик розвитку інфаркту міокарда [3–5].

Відомо, що важливу роль у реалізації негативних впливів гіперглікемії на серцево-судинну систему відіграє протеїнкіназа С (ПКС). За різними даними її активація може бути ключовим фактором порушень коронарного кровообігу, розвитку фіброзу, підвищеної проникності судин, кардіоміопатії та ін. [6]. Показано, що за умов ЦД експресія дельта-ізоформи ПКС (ПКС-δ) у серці суттєво посилюється. Водночас її роль у розвитку означених патологічних процесів не з'ясована [7, 8].

Мета дослідження – визначення залученості ПКС-δ в розвиток порушень скорочувальної функції міокарда та дилатації коронарних артерій при цукровому діабеті.

Матеріали та методи. *Моделювання цукрового діабету в щурів.* Дослідження проводили на 18 самцях білих щурів (276 г ± 15 г). Усіх тварин методом випадкової вибірки було розподілено на три групи по 6 тварин у кожній. Перша група – контрольна, а у тварин другої та третьої груп викликали розвиток цукрового діабету одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину (СТЗ) у дозі 60–65 мг/кг. СТЗ розчиняли в буферному розчині, який містив 0,9 % NaCl та 10 ммоль/л цитрату, pH = 4,6. Щурам третьої групи вводили міРНК, яка пригнічує експресію δ ізоформи ПКС (PRKCD-міРНК). Щурам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили цитратний буфер, що використовували для розведення СТЗ.

У дослід із застосуванням технології РНК-інтерференції тварин брали через 2 місяці після уведення СТЗ.

Визначення вмісту цукру в крові щурів. Концентрацію глюкози в плазмі крові вимірювали безпосередньо перед уведенням міРНК та в день проведення досліджень на ізольованому серці за допомогою глюкозометра Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

Блокування експресії генів ПКС за допомогою міРНК за умов in vivo. Малі інтерферуючі РНК (міРНК), які використовували в дослідах для «заглушен-

© Колектив авторів, 2014

ня» гена ПКС-δ (PRKCD), були синтезовані на замовлення фірмою «Metabion» (Німеччина).

міРНК для гена ПКС-δ PRKCD мали наступну послідовність: PRKCD-S-5'- GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU -3'; PRKCD-A-5'- AGA UCU UUU GUU UCU GAG UUU – 3'.

Перед дослідом з одноланцюгових РНК отримували дволанцюгові за допомогою анелінгу (відпалу). Для цього розчини відповідних сенсових та антисенсових олігонуклеотидів розчиняли в буфері для анелінгу наступного складу (у ммоль/л): 30 HEPES-KOH pH 7,4, 100 KCl, 2 $MgCl_2$, 50 $NH_4C_2H_3O_2$. В окремі пробірки вносили рівні об'єми кожного з розчинів олігонуклеотидів та додавали до них рівні об'єми буфера для анелінгу. Після змішування розчинів сенсових та антисенсових олігонуклеотидів в одній пробірці до суміші додавали в 4 рази менший об'єм буфера для анелінгу. Отриману суміш інкубували протягом 1 хв при 90 °С, а потім протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури. Анелінг проводили за допомогою термоциклера «GeneAmp System 2700».

Дволанцюгові міРНК вводили дослідним щурам внутрішньовенно в хвостову вену в кількості 400 мкг/кг двічі з 24-годинним інтервалом. У дослід тварин брали через один тиждень після введення міРНК.

Неінвазивне вимірювання артеріального тиску. Неінвазивне вимірювання артеріального тиску у хвостовій артерії здійснювали за допомогою сфігмоманометра S-2 (Hugo-Sachs Elektronik, Німеччина).

Визначення функціональної активності ізольованого серця (за Лангендорффом. Досліди проводили на восьмий день після введення міРНК.

Процедура виділення та підключення серця до апарата для перфузії з постійним протоком, реєстрація тиску в системі коронарних артерій (КПТ), у порожнині лівого шлуночка (ТЛШ) і кардіограми, розрахунок максимальної та мінімальної швидкості зміни тиску в порожнині шлуночка (dP/dt) та індексу скоротливості міокарда (ІС) були описані [9]. Оксигенація розчину для перфузії підтримувалася за рахунок пропускання карбогену (95 % кисню та 5 % двоокису вуглецю).

Функціональну активність міокарда оцінювали за реакцією на різні концентрації бета-адреностимулятора ізопротеренола.

Аналіз та статистична обробка отриманих даних. Сигнали оцифровували аналого-цифровим перетворювачем PowerLab 4/30 (ADInstruments, Австралія), розрахунок параметрів, збереження та аналіз проводили за допомогою програми Chart 5 (ADInstruments, Австралія).

Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка; нормально розподілені дані обчислювали за критерієм Стьюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Дані представлено у вигляді середнього ± похибка середнього (M ± m). Статистично значущими вважали зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95 % або $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Початкова концентрація глюкози в крові щурів складала (6,9 ± 0,2) ммоль/л (n = 18). Через 2 міс після ін'єкції СТЗ у тварин другої та третьої груп розвивалася виражена гіперглікемія: рівень глюкози підвищувався до (30,0 ± 0,5) ммоль/л (n = 12; $p < 0,05$). Слід відзначити, що введення PRKCD-міРНК суттєво не впливало на концентрацію глюкози в крові щурів з експериментальним ЦД (28,7 ± 0,9) ммоль/л; n = 6; $p > 0,05$).

Перед уведенням СТЗ артеріальний тиск у щурів складав (112,7 ± 1,6) мм рт. ст. Розвиток гіперглікемії в таких тварин супроводжувався підвищенням тиску: він був на 12 % вище початкової величини (126,5 ± 3,9) мм рт. ст.; $p < 0,05$). Уведення PRKCD-міРНК при цьому на артеріальний тиск практично не впливало (123,7 ± 3,9) мм рт. ст.; $p > 0,05$).

Тиск у порожнині лівого шлуночка серця ($T_{ЛШ}$) щурів з цукровим діабетом (сЩЦД) був нижчим на 25 % за такий, що реєструвався в сердець нормальних щурів (сНЩ), але величини індексу скоротливості (ІС) при цьому практично не відрізнялися. У той самий час

$T_{ЛШ}$ у тварин з експериментальним ЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, був вищим майже на 60 % порівнянно з тваринами з ЦД другої групи ($p < 0,01$), скоротливість міокарда була нижчою приблизно на 30 % ($p < 0,05$; табл. 1).

Перфузія ізольованих сердець агоністом бета-адренорецепторів ізопротеренолом у концентраціях 10^{-8}, 10^{-7} та 10^{-6} моль/л протягом 5 хв викликала транзиторне підвищення $T_{ЛШ}$ та ІС у тварин усіх груп. За умов дії всіх трьох концентрацій ізопротеренолу $T_{ЛШ}$ у сЩЦД був значно зниженим ($p < 0,05$; табл. 1) порівняно з контрольною групою, а в сЩЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, суттєво не відрізнявся від такого в сНЩ ($p > 0,05$). Крім того, ІС сердець із пригніченням експресії гена ПКС-δ був знижений на 40 % ($p < 0,05$).

Вихідні величини тиску в коронарних судинах та опору коронарних судин практично не відрізнялися в групах сНЩ та сЩЦД (табл. 2). Перфузія сердець розчином зі зростаючими концентраціями ізопротеренолу призводила до зниження тиску в коронарних судинах та опору коронарних судин у тварин усіх груп. Але слід відзначити, що такі зміни опору коронарних судин у сЩЦД були менш виразними та статистично недостовірними. У серцях тварин із ЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, спостерігали найнижчі величини опору коронарних судин, які не тільки достовірно відрізнялися від початкових величин, але й були нижчими за такі в сЩДЦ без пригнічення експресії ПКС-δ (табл. 2).

Величини частоти серцевих скорочень і тривалості інтервалу QTC у сНЩ та сЩЦД суттєво не відрізнялися як на початковому етапі експерименту, так і за умов дії ізопротеренолу. Вихідна тривалість інтервалу QTC у сЩЦД, яким вводили PRKCD-міРНК, була вищою на 32 %, ніж у сНЩ ($p < 0,05$). За умов пригнічення експресії гена ПКС-δ спостерігали суттєве зменшення

Таблиця 1

Насосна та скорочувальна функції лівого шлуночка ізольованого серця щура за умов цукрового діабету та блокади дельта-ізоформи протеїнкінази С

		Показник	Контроль (n = 6)	Діабет (n = 6)	Діабет + PRKCD-міРНК (n = 6)
Вихідні величини		$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	70,8 ± 6,7	52,6 ± 4,9	84,8 ± 5,9*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	2282 ± 237	1578 ± 134	1908 ± 224*
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	-1134 ± 109	-842 ± 79	-1136 ± 118
		ІСВ, $с^{-1}$	32,5 ± 2,3	31,1 ± 2,4	21,8 ± 2,3&*
Дози ізопротеренолу, моль/л	10^{-8}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	136,7 ± 15,7	77,2 ± 4,8&	168,8 ± 18,0*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	5665 ± 396	3477 ± 271&	4794 ± 412
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	-3173 ± 289	-1616 ± 150&	-2760 ± 315
		ІСВ, $с^{-1}$	41,6 ± 2,2	45,8 ± 1,4	31,2 ± 3,3&*
	10^{-7}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	173,0 ± 16,8	79,3 ± 6,8&	211,2 ± 25,3*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	9843 ± 647	3928 ± 241&	7061 ± 680
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	4112 ± 209	1899 ± 139&	3592 ± 420*
		ІСВ, $с^{-1}$	53,9 ± 4,0	49,0 ± 2,0	31,2 ± 3,9&*
	10^{-6}	$T_{ЛШ}$, мм рт. ст	202,7 ± 20,8	89,5 ± 6,0&	206,0 ± 21,8*
		$dP/dt_{макс}$, мм рт. ст./с	12659 ± 1065	5285 ± 486&	7051 ± 665&
		$dP/dt_{мін}$, мм рт. ст./с	5035 ± 464	2422 ± 212&	3673 ± 265
		ІСВ, $с^{-1}$	61,9 ± 3,1	59,2 ± 2,0	32,4 ± 3,5&*

*Примітка. Тут і в табл. 2: &p < 0,05 порівняно з відповідними величинами в контрольній групі, *p < 0,05 порівняно з відповідними величинами в групі щурів з діабетом.*

Таблиця 2

Показники функціонального стану ізольованих сердець щурів за умов цукрового діабету та блокади дельта-ізоформи протеїнкінази С

		Показник	Контроль (n = 6)	Діабет (n = 6)	Діабет + PRKCD-міРНК (n = 6)
Вихідні величини		КПТ, мм рт. ст	77,9 ± 7,5	71,5 ± 5,4	94,4 ± 11,3
		ОКС, у.о.	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,5	5,9 ± 0,2
		ЧСС, уд/хв	215 ± 18	196 ± 7	197 ± 12
		QT_C, мс	137 ± 6	162 ± 14	180 ± 12[&]
Дози ізопротеренолу, моль/л	10^{-8}	КПТ, мм рт. ст	59,5 ± 3,2	70,6 ± 7,5	64,7 ± 9,4
		ОКС, у.о.	4,4 ± 0,9	5,6 ± 0,4[&]	3,9 ± 0,6*
		ЧСС, уд/хв	325 ± 27	263 ± 13	228 ± 10[&]
		QT_C, с	246 ± 36	251 ± 42	202 ± 10
	10^{-7}	КПТ, мм рт. ст	60,6 ± 3,9	65,2 ± 6,1	54,9 ± 6,7
		ОКС, у.о.	4,5 ± 0,2	5,2 ± 0,3[&]	3,5 ± 0,6*
		ЧСС, уд/хв	321 ± 15	297 ± 16	248 ± 22[&]
		QT_C, с	186 ± 26	214 ± 29	232 ± 24
	10^{-6}	КПТ, мм рт. ст	56,4 ± 3,6	59,6 ± 4,6	55,2 ± 4,7
		ОКС, у.о.	4,2 ± 0,2	4,8 ± 0,2	3,5 ± 0,5*
		ЧСС, уд/хв	370 ± 45	329 ± 20	258 ± 17[&]*
		QT_C, с	204 ± 39	196 ± 41	313 ± 42

частоти серцевих скорочень, викликаного ізопротеренолом, та тенденцію до подовження інтервалу QTC (табл. 2).

Отримані дані свідчать про суттєве зниження чутливості міокарда у відповідь на бета-адреностимуляцію в сЩЦД. Це, зокрема, проявлялося в суттєвому зменшенні величини позитивного інотропного та коронародилататорного ефекту ізопротеренолу. Такі зміни підтверджуються результатами й інших досліджень [10], і, імовірно, указують на розвиток діабетичної кардіоміопатії в дослідних тварин. Раніше було показано, що зміни чутливості міокарда до бета-адреностимуляції за умов ЦД пов'язані із порушенням механізмів вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму кардіоміоцитів [11].

Пригнічення експресії гена ПКС-δ за допомогою міРНК призводило до суттєвих змін у реакціях сЩЦД, а саме: відбувалася нормалізація величини $T_{ЛШ}$ у відповідь на ізопротеренол; максимальні величини тиску на піку реакції статистично не відрізнялися від таких у сНЩ; водночас, ІС був суттєво нижчим порівняно з іншими групами. Останнє, імовірно, пояснюється тим, що ПКС-δ відіграє важливу роль у регуляції скоротливості міокарда, опосередковуючи позитивні ізотропні ефекти [12]. Це може відбуватися внаслідок активуючого впливу ПКС-δ на Ca^{2+}-АТФазу саркоплазматичного ретикулума кардіоміоцитів [13, 14]. Крім того, показано, що активність ПКС-δ значною мірою регулює активність утилізації глюкози та ліпідів кардіоміоцитами [15], тому пригнічення її експресії, теоретично, може мати позитивний вплив на їхній метаболізм за умов ЦД.

Відомо, що ЦД призводить до суттєвих змін у механізмі регуляції тонусу коронарних артерій. Головним чином це проявляється в порушеннях ендотелійзалежної релаксації та посиленні ефекту вазоконстрикторів. Зокрема показано, що в пацієнтів з ЦД виявляється протилежна реакція на ацетилхолін – коронарні артерії відповідають скороченням [16, 17]. Здатність коронарних артерій до розслаблення оцінювали за реакцією на бета-адреноміметик ізопротеренол. Як зазначено в літе-

ратурі, вазодилатація у відповідь на ізопротеренол значною мірою опосередковується ендотелієм [18]. У нашому дослідженні в сЩЦД спостерігали суттєве пригнічення розслаблення коронарних артерій у відповідь на стимуляцію бета-адреноміметиком (табл. 2). Так, зменшення опору коронарних судин під впливом ізопротеренолу в концентрації 10^{-8} моль/л у сЩЦД було лише 0,1 у. о., у той час як у сНЩ воно складало 1,4 у. о. Такі зміни можуть призводити до розвитку ішемії міокарда за умов підвищеної потреби міокарда в кисні за ЦД [19].

Пригнічення експресії гена ПКС-δ за введення міРНК у щурів з ЦД призводило до відновлення реакцій коронарних артерій у відповідь на бета-адреностимуляцію, що проявлялось дозозалежними змінами тиску в коронарних судинах. При цьому опір судин за умов дії ізопротеренолу був у середньому на 30 % нижчим, ніж у сЩЦД, яким не вводили PRKCD-міРНК (табл. 2).

Значно нижчі величини частоти серцевих скорочень, які досягалися при стимуляції сердець ізопротеренолом, а також подовження інтервалу QTC за цих умов, на наш погляд, можуть бути пов'язані з вищезгаданим зниженням скоротливості міокарда, викликаним пригніченням експресії ПКС-δ [20].

Таким чином, отримані дані свідчать: перебіг експериментального ЦД 1 типу у щурів супроводжується зменшенням дилататорного потенціалу коронарних судин у відповідь на дію агоніста бета-адренорецепторів ізопротеренолу, а також розвитком компенсованих змін скоротливої активності міокарда. Пригнічення експресії гена ПКС-δ у щурів з ЦД сприяє нормалізації дилататорної реакції коронарних судин у відповідь на дію ізопротеренолу, але водночас призводить до зниження скоротливості міокарда. Іншими словами, роль ПКС-δ двояка: з одного боку, її експресія при ЦД є одним з механізмів адаптації міокарда до гіперглікемії, з іншого боку – причиною порушень функціональної активності коронарних судин.

На наш погляд, існує перспектива використання ПКС-δ як фармакологічної мішені для корекції порушень коронарного кровотоку (коронарної недостатності), що розвинулися внаслідок ЦД, за умов, якщо буде виявлена можливість усунути негативний вплив пригнічення активності ПКС-δ на скоротливу здатність міокарда.

1. *Boudina S.* Diabetic cardiomyopathy, causes and effects / S. Boudina, and E. Abel // Rev. Endocr. Metab. Disord. – 2010. – V. 11 (1). – P. 31–39.
2. *Falcão-Pires I.* Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment / I. Falc o-Pires, A. F. Leite-Moreira // Heart Fail. Rev. – 2012. – V. 17. – P. 325–344.
3. Role of Chronic Hyperglycemia in the Pathogenesis of Coronary Microvascular Dysfunction in Diabetes / M. F. Di Carli, J. Janisse, G. Grunberger, J. Ager // Journal of the American College of Cardiology. – 2003. – V. 41 (8). – P. 1387–1393.
4. Correlation of functional and structural alterations of the coronary arterioles during development of type II diabetes mellitus in rats. / Y. Yu [et al.] // J. Cardiovasc. Res. – 2002. – V. 56. – P. 303–311.
5. Diabetes Mellitus, Prediabetes, and Incidence of Subclinical Myocardial Damage / E. Selvin [et al.] // Circulation. – 2014. – V. 130. – P. 1374–1382.
6. *Way K. J.* Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications / K. J. Way, N. Katai, G. L. King // Diabet. Med. – 2001. – V. 18. – P. 945–959.
7. Changes in protein kinase C in early cardiomyopathy and in gracilis muscle in the BB/Wor diabetic rat / T.D. Giles [et al.] // Am. J. Physiol. – 1998. – V. 274. – P. H295–H307.
8. Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy / Y. Hiramatsu [et al.] // Diabetes. – 2002. – V. 51 (9). – P. 2804–2810.
9. Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium / M. Skrzypiec-Spring, B. Grotthus, A. Szeląg, R. Schulz // J. Pharmacological and Toxicological Methods. – 2007. – V. 55. – P. 113–126.
10. Effect of hypoglycemia on beta-adrenergic sensitivity in normal and type 1 diabetic subjects / A. Fritsche [et al.] // Diabetes Care. – 1998. – V. 21 (9). – P. 1505–1519.
11. beta-Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes / J. op den Buijs [et al.] // Life Sci. – 2005. – V. 76, №. 10. – P. 1083–1098.
12. *Kang M.* Protein kinase C delta and epsilon mediate positive inotropy in adult ventricular myocytes / M. Kang, J. W. Walker // J. Mol. Cell Cardiol. – 2005. – V. 38, № 5. – P. 753–764.

13. *Qu Y.* Protein kinase C mediated activation and phosphorylation of $Ca^{(2+)}$-pump in cardiac sarcolemma / Y. Qu, J. Torchia, A. K. Sen // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1992. – V. 70 (9). – P. 1230–1235.
14. *Periasamy M.* SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+) homeostasis and cardiac contractility / M. Periasamy, S. Huke// J. Mol Cell Cardiol. – 2001. – V. 33 (6). – P. 1053–1063.
15. Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism / M. Mayr [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V. 287 (2). – H937–H945.
16. Maximal Coronary Flow Reserve and Metabolic Coronary Vasodilation in Patients With Diabetes Mellitus / P. J. Nahser [et al.] // Circulation. – 1995. – V. 91. – P. 635–640.
17. Decreased Vasodilator Response to Isoproterenol During Nitric Oxide Inhibition in Humans / C. Cardillo [et al.] // Hypertension. – 1997. – V. 30. – P. 918–921.
18. Endothelial defect mediates attenuated vasorelaxant response to isoproterenol after lung transplantation / K. Yoshida // Am. J. Physiol. – 1999. – V. 276 (1 Pt 2). – P. H159–H166.
19. Association Between Coronary Vascular Dysfunction and Cardiac Mortality in Patients With and Without Diabetes Mellitus / V. L. Murthy [et al.] // Circulation. – 2012. – V. 126. – P. 1858–1868.
20. *Howarth F. C.* Heart Rate and QT Interval in Streptozotocin-induced Diabetic Rat / F. C. Howarth, E. Adeghate, M. Jacobson // J. Med. Sci. – 2009. – V. 2 (3). – P. 108–118.

Н. В. Добреля, Є. В. Стрєлков, О. С. Хромов, К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, А. І. Соловйов

Роль дельта-ізоформи протеїнкінази С у розвитку порушень коронарного кровотоку, що викликані цукровим діабетом

Мета дослідження – визначення залученості ПКС-δ у розвиток порушень функції міокарда та дилатації коронарних артерій за цукрового діабету.

Дослідження, проведені на білих щурах зі стрептозотоциновою моделлю цукрового діабету, показали, що в тварин експериментальних груп на тлі вираженої гіперглікемії спостерігалося збільшення артеріального тиску. Пригнічення експресії дельта-ізоформи ПКС за допомогою малих інтерферуючих РНК практично не впливало на вміст глюкози та величину тиску крові.

Розвиток експериментального ЦД 1 типу в щурів супроводжується зменшенням дилататорного потенціалу коронарних судин у відповідь на дію ізопротеренолу й розвитком компенсаторних змін скорочувальної активності міокарда. Пригнічення експресії гена ПКС-δ у щурів з ЦД сприяє нормалізації дилататорної реакції коронарних судин ізольованого серця, але водночас призводить до зниження скоротливості міокарда.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, дельта-ізоформа протеїнкінази С, малі інтерферуючі РНК, коронарний кровотік, скоротливість міокарда

Н. В. Добреля, Е. В. Стрелков, А. С. Хромов, Е. И. Клименко, Т. В. Новохацкая, А. И. Соловьев

Роль дельта-изоформы протеинкиназы С в развитии нарушений коронарного кровотока, обусловленных сахарным диабетом

Согласно современным представлениям коронарная недостаточность, которая развивается у пациентов с сахарным диабетом (СД) как 1, так и 2 типа, главным образом, связана с нарушением эндотелий-зависимого расслабления коронарных артерий, что приводит к существенному снижению коронарного кровотока и обусловливает риск развития инфаркта миокарда. Важную роль в реализации воздействия гипергликемии на сердечно-сосудистую систему играет протеинкиназа С (ПКС). Ее активация может быть ключевым фактором нарушений коронарного кровообращения, развития фиброза, повышенной проницаемости сосудов, кардиомиопатии. Показано, что при СД экспрессия дельта-изоформы ПКС (ПКС-δ) в сердце существенно усиливается, но ее роль в развитии указанных патологических процессов остается не выясненной.

Цель исследования – определение вовлеченности ПКС-δ в развитие нарушений сократительной функции миокарда и дилатации коронарных артерий при сахарном диабете.

Исследования проводили на 18 самцах белых крыс. Сахарный диабет вызывали одноразовым внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 60–65 мг/кг. Экспрессию δ изоформы ПКС подавляли введением малых интерферирующих РНК (PRKCD-миРНК). Для оценки функциональной активности использовали возрастающие концентрации изопротеренола (10^{-8}–10^{-6} моль/л) при постоянной скорости перфузии изолированного сердца.

Через 2 месяца после введения СТЗ у животных экспериментальных групп выявляли выраженную гипергликемию (30,0 ± 0,5 vs 6,9 ± 0,2 ммоль/л, $p < 0,05$) и увеличение артериального давления (126,5 ± 3,9 vs 112,7 ± 1,6 мм рт. ст., $p < 0,05$). Введение PRKCD-миРНК (400 мкг/кг дважды с 24-часовым интервалом) на содержание глюкозы и величину давления крови практически не влияло.

Давление в полости левого желудочка ($P_{лж}$) изолированного сердца крыс с сахарным диабетом (сКСД) было на 25 % ниже, чем в сердце нормальных крыс (сНК), а величины индекса сократимости (ИС) при этом практически не отличались. Введение PRKCD-миРНК приводило к увеличению (на 60 %)

РЛЖ и уменьшению (на 30 %) ИС по сравнению с аналогичными величинами в сКСД ($p < 0,01$). В условиях действия всех концентраций изопротеренола $P_{ЛЖ}$ сКСД было снижено по сравнению с контрольной группой, а при введении PRKCD-миРНК, существенно не отличалось от такового в сНК. ИС сердец с угнетением экспрессии гена ПКС-δ был снижен на 40 % ($p <0,05$).

Перфузия сердец раствором с возрастающими концентрациями изопротеренола приводила к снижению сопротивления коронарных сосудов ($C_{КС}$) сердец животных контрольной группы и его увеличению в сКСД. Введение PRKCD-миРНК предотвращало рост $C_{КС}$, а его величины были меньшими, как по сравнению с наблюдаемыми в сКСД, так и с исходными.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют: течение экспериментального СД 1 типа у крыс сопровождается уменьшением дилататорного потенциала коронарных сосудов в ответ на действие изопротеренола и развитием компенсированных изменений сократительной активности миокарда. Подавление экспрессии гена ПКС-δ у крыс с СД способствует нормализации дилататорной реакции коронарных сосудов, но в то же время приводит к снижению сократимости миокарда.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоцин, дельта-изоформа протеинкиназы С, малые интерферирующие РНК, коронарный кровоток, сократимость миокарда

N. V. Dobrelya, E. V. Strelkov, A. S. Khromov, K. I. Klimenko, T. V. Novokhatskaya, A. I. Soloviev

Role of protein kinase C delta-isoform in the development of coronary blood flow disturbances due to diabetes mellitus

According to modern concepts, the coronary insufficiency in patients with both I and II type of diabetes mellitus (DM) is mainly associated with impaired endothelium-dependent relaxation of the coronary arteries, which leads to significant decrease in coronary blood flow and raises the risk of myocardial infarction. Protein kinase C (PKC) plays an important role in the realization of hyperglycemia effects on the cardiovascular system. Its activation may be a key factor in disturbances of the coronary circulation, development of fibrosis, increase in vascular permeability, cardiomyopathy. It is shown that expression of delta-isoform of PKC (PKC-δ) in the heart is significantly enhanced in DM, but its role in the development of these pathological processes remains unknown.

The aim of the study was to determine an involvement of PKC-δ in the development of disorders in myocardial contractile function and coronary artery dilatation in DM.

The studies were conducted on 18 male albino rats. Diabetes was induced by single intraperitoneal administration of Streptozotocin (STZ) at a dose of 60–65 mg/kg. Expression of PKC-δ was suppressed by injection of small interfering RNA (PRKCD-siRNA). To assess the functional activity, Isoproterenol in increasing concentrations (10^{-8}–10^{-6} mol/L) was used at constant perfusion rate of the isolated heart.

Two months after STZ injection, severe hyperglycemia (30,0 ± 0,5 vs 6,9 ± 0,2 mmol/L, $p < 0,05$) and increased blood pressure (126,5 ± 3,9 vs 112,7 ± 1,6 mm Hg, $p < 0,05$) have been revealed in animals of the experimental groups. Injection of PRKCD-siRNA (400 μg/kg twice with a 24-hour interval) had virtually no effect on glucose levels and blood pressure.

The left ventricle pressure (Plv) in the isolated hearts of the rats with induced diabetes (hDR) was lower by 25 % compared to the hearts of normal rats (hNR), but the values of the contractility index (CI) were hardly differed. Injection of PRKCD-siRNA resulted in increase in Plv (by 60 %) and decrease in CI (by 30 %) compared with the observed respective values in hDR ($p < 0,01$). Under the influence of Isoproterenol in all concentrations, Plv in hDR was decreased versus the control group, but after injection of PRKCD-siRNA, Plv did not significantly differ from values in hNR. In the hearts with suppressed expression of PKC-δ gene, CI was reduced by 40 % ($p < 0.05$).

Perfusion of hearts with isoproterenol solution in increasing concentrations resulted in both decrease in resistance of coronary vessels (Rcv) in the hearts of animals in the control group, and its increase in hDR. Injection of PRKCD-siRNA prevented rise in Rcv, and its values were lower as compared with both those observed in hDR and baseline values.

Thus, the data obtained evidence that the course of type 1 experimental diabetes in rats is accompanied by decrease in dilatation capacity of the coronary vessels in response to Isoproterenol and by development of the compensated changes of the myocardium contractile activity. Suppression of gene PKC-δ expression in diabetic rats favours the normalization of dilatatory reaction of the coronary vessels, but at the same time leads to decrease in myocardial contractility.

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, protein kinase C delta-isoform, siRNA, coronary flow, myocardial contractility

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Добреля Наталія Володимирівна, молодший науковий співробітник,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680.
Тел. + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: ndobrelya@gmail.com

УДК 616-008.82:546.72]:[615:549.731.14]:616-005.1

Є. В. Мокляк[1], О. М. Важнича[1], І. М. Андрусишина[2]

Вплив композитних наночастинок магнетиту на вміст заліза в органах та плазмі крові щурів за умов гострої крововтрати

[1]ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава
[2]ДУ«Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ

Ключові слова: наночастинки магнетиту, 3-гідроксипіридин, полівінілпіролідон, уміст заліза, кістковий мозок, печінка, селезінка, плазма крові, крововтрата

Магнітні наночастинки, зокрема, наночастинки магнетиту, або оксиду заліза II, III (НЧМ), мають великі перспективи медичного застосування у зв'язку з їхніми своєрідними фармакологічними властивостями [1, 2]. Відзначають, що поряд з контрастуванням при магнітно-резонансних дослідженнях, здатністю до гіпертермії, активним і пасивним таргетингом такі наночастинки можуть справляти антианемічну дію, поповнюючи пул заліза в організмі [3–5]. В окремих випадках ця дія має переваги над ефектами традиційних препаратів заліза, що доведено при лікуванні залізодефіцитної анемії у хворих з нирковою недостатністю та гемодіалізом [6]. Створення лікарських форм нанооксидів заліза стимулює пошук таких способів їх покриття, які б найбільш адекватно відповідали конкретному призначенню [7]. Використовуючи для стабілізації НЧМ у гідрофільному середовищі 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину (3-ГП) сукцинат разом з полівінілпірролідоном (ПВП), ми одержали композитні наночастинки, придатні для фармакологічної корекції гематологічних порушень, викликаних гострою постгеморагічною анемією [8], однак їхній вплив на метаболізм заліза в організмі раніше не досліджувався. *Мета дослідження* – вивчити вплив рідини, яка містить НЧМ, стабілізовані похідним 3-ГП та ПВП, та її окремих складових на вміст заліза в кровотворних і депонуючих органах та плазмі крові за умов гострої крововтрати в білих щурів.

Матеріали та методи. Експерименти виконано на 45 білих щурах-самцях лінії Wistar масою 210–225 г. Утримання тварин і проведення експериментів проводили згідно із принципами Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) [9]. Воно не викликало заперечень комісії з питань біоетики ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія».

Тварин було розподілено на 9 груп: інтактні щури (контроль), тварини з крововтратою та введенням розчинника (контрольна патологія), щури з крововтратою та введенням рідини з НЧМ, стабілізованими похідним 3-ГП і ПВП (далі за текстом «нанорідина»), або її окремих компонентів чи їхніх сполучень (НЧМ, мексидол, НЧМ+мексидол, ПВП, НЧМ+ПВП, ПВП+мексидол), а також тварини з введенням референс-препарату.

Крововтрату відтворювали шляхом забирання з серця 25 % циркулюючої крові під загальною анестезією ефіром [10]. Розчинник, препарат порівняння та досліджувані тест-зразки вводили тваринам в об'ємі 1 мл внутрішньоочеревинно відразу після крововтрати. Щурів виводили з експерименту через 3 год після крововтрати шляхом забирання крові з серця до його зупинки під наркозом. Цей термін було обрано з огляду на дані літератури щодо фармакокінетики стабілізованих НЧМ, менших за 50 нм [11].

Нанорідину готували перед застосуванням, використовуючи порошкоподібний конденсат НЧМ, осаджених на

© Колектив авторів, 2014

кристали натрію хлориду направленим паровим струменем у вакуумі [12]. Він містив НЧМ розмірами 5–8 нм, мав уміст заліза 26,9 мас% і був люб'язно наданий старшим науковим співробітником кандидатом технічних наук Ю. А. Кураповим (Інститут електрозварювання імені Є. О. Патона, м. Київ). Для стабілізації НЧМ використовували субстанції 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату (мексидол) та ПВП (8000 ± 2000 Дальтон), одержані від виробників (ООО «Бион», РФ та ООО «АК Синтвита», РФ). Як розчинник застосовували рідину, яка містить 2,75 г натрію хлориду, 0,21 г калію хлориду, 0,25 г кальцію хлориду, 0,00025 г магнію хлориду, 0,115 г натрію бікарбонату та дистильовану воду до 1 л. На ньому готували 3 % (маса/об'єм) розчин ПВП, який додавали до суміші порошків НЧМ та мексидолу, ретельно перемішували струшуванням, витримували 2 год при + 60 °С і охолоджували до кімнатної температури. Співвідношення компонентів при виготовленні нанорідини було 1 мг конденсату НЧМ / 20 мг мексидолу / 30 мг ПВП в 1 мл. У складі одержаної стабільної в часі рідкої дисперсної системи 99,9 % частинок мали гідродинамічний розмір 30–40 нм [8]. Доза композитних НЧМ становила 1,35 мг Fe/кг. Окремі складові нанорідини вводили тваринам у дозах, що відповідали кількості цих інгредієнтів, які вводили з 1 мл. Вибір дози композитних наночастинок ґрунтувався на попередніх даних про її ефективність у відновленні гематологічних показників, порушених гострою крововтратою [8, 13], а також на даних літератури про дозування антианемічного нанопрепарату «Ферумокситол» (Feraheme™, AMAG Pharmaceuticals, USA), що містить НЧМ [14]. Як препарат порівняння застосовували Феррум Лек (Лек, Словенія) у дозі 1,25 мг Fe/кг.

У тварин, підданих евтаназії, вилучали кістковий мозок стегнової кістки, печінку й селезінку, які зважували та використовували для визначення вмісту заліза методом атомно-оптико-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою на спектрометрі Optima-2100DV (Perkin-Elmer, США) [15]. З крові, стабілізованої гепарином, одержували плазму, у якій визначали вміст заліза та загальну залізо-зв'язувальну здатність плазми в реакції з ференом-S за допомогою наборів реактивів «Диакон-ДС» (ЗАТ «Диакон-ДС», РФ) [16].

Одержаний матеріал статистично обробляли за допомогою стандартних комп'ютерних програм пакета Statistica for Windows 8.0. При цьому обчислювали середню M, її помилку m, оцінювали вірогідність різниці між групами за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з апостеріорним тестом Fisher LSD [17].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що через 3 год після крововтрати вміст заліза в кістковому мозку зменшувався в 2,4 разу порівняно з контролем ($p < 0,001$) (таблиця). Застосування композитних НЧМ, які містять похідне 3-ГП та ПВП, підвищувало цей показник у 2 рази ($p < 0,001$) порівняно з крововтратою без фармакологічної корекції. Аналогічні зміни спостерігали також після введення НЧМ, мексидолу та НЧМ+мексидол. У цих випадках збільшення концентрації заліза в кістковому мозку дорівнювало відповідно в 1,6 разу ($p < 0,001$), 1,7 разу ($p < 0,001$) та 2,9 разу ($p < 0,001$). Застосування ПВП не викликало вірогідних змін даного показника. Препарат порівняння Феррум Лек за цих умов діяв слабше за інші речовини й не змінював концентрацію заліза в кістковому мозку, причому спостерігалася вірогідна різниця між вмістом заліза в мієлоїдній тканині при застосуванні референс-препарату та НЧМ, мексидолу, НЧМ з похідним 3-ГП або нанорідини на користь тест-зразків.

Показано, що через 3 год після вилучення крові вміст заліза в печінці не відрізнявся від показників інтактного контролю (таблиця). Застосування композитних НЧМ, що містять похідне 3-ГП та ПВП, підвищувало цей показник у 1,4 разу ($p < 0,02$) порівняно з крововтратою без фармакологічної корекції. Аналогічні зміни спостерігали після введення референс-препарату Феррум Лек, який підвищував концентрацію заліза в печінці щурів у 1,7 разу ($p < 0,001$). НЧМ, мексидол, НЧМ + мексидол, а також ПВП суттєво не

впливали на концентрацію заліза в печінці тварин. Водночас НЧМ + ПВП та ПВП + мексидол вірогідно знижували цей показник у 2,2 та 1,6 разу відповідно порівняно з контрольною патологією. За цих умов уміст заліза в печінці при застосуванні референс-препарату був вірогідно вищий за такий при введенні всіх речовин та їхніх поєднань, крім композитних наночастинок.

Через 3 год після вилучення крові вміст заліза в селезінці тварин знаходився на рівні інтактного контролю (таблиця). Референс-препарат не викликав вірогідних змін цього показника відносно контрольної патології. Водночас застосування НЧМ викликало збільшення концентрації заліза в селезінці в 2,6 разу ($p < 0,001$) порівняно з крововтратою без фармакокорекції. За цих умов введення мексидолу не впливало на вміст заліза в селезінці, а поєднана дія НЧМ з похідним 3-ГП характеризувалася збільшенням концентрації досліджуваного елементу в 2,3 разу ($p < 0,001$) порівняно з контрольною патологією. Уведення тваринам ПВП або ПВП з мексидолом не впливало на вміст заліза в селезінці порівняно з крововтратою без фармакокорекції. У цей термін спостережень нанорідина з композитними наночастинками також не викликала змін концентрації заліза в селезінці. Через 3 год після вилучення крові вміст заліза в селезінці на фоні дії НЧМ ($p < 0,001$), НЧМ + мексидол ($p < 0,005$) або НЧМ + ПВП ($p < 0,05$) був вищий за такий при застосуванні еталонного антианемічного препарату.

Гостра крововтрата через 3 год характеризувалася зниженням рівня заліза в плазмі в 1,3 разу ($p < 0,005$) порівняно з інтактним контролем (таблиця). Застосування Феррум Лек, НЧМ, мексидолу, НЧМ + мексидол, НЧМ + ПВП та нанорідини в цей термін спостережень не змінювало вміст заліза в плазмі крові порівняно з контрольною патологією. Водночас композиція складу «ПВП + мексидол» викликала подальше зниження цього показника ($p < 0,05$) відносно крововтрати без фармакокорекції.

Таблиця

Концентрація заліза в кровотворних і залізодепонуючих органах та плазмі крові щурів через 3 год після гострої крововтрати та застосування композитних наночастинок магнетиту та їхніх складових, M ± m

Група тварин	Уміст заліза			
	кістковий мозок, мкг/г	печінка, мкг/г	селезінка, мкг/г	плазма крові, мкмоль/л
Інтактні (n = 9)	62,6 ± 2,6	51,2 ± 6,7	66,9 ± 6,9	25,3 ± 1,7
Крововтрата (n = 5)	25,8 ± 2,91	71,4 ± 6,2	51,8 ± 8,4	19,5 ± 2,1[1]
Крововтрата + Феррум Лек (n = 5)	28,1 ± 2,91	122,9 ± 10,7[1,2]	71,9 ± 9,1	17,4 ± 0,6[1]
Крововтрата + НЧМ (n = 5)	40,9 ± 5,7[1,2,3]	89,6 ± 10,3[1,3]	135,2 ± 10,6[1,2,3]	17,2 ± 0,7[1]
Крововтрата + 3-ГП (n = 5)	44,4 ± 3,6[1,2,3]	58,2 ± 5,03	44,9 ± 5,5	19,0 ± 2,1[1]
Крововтрата + НЧМ + 3-ГП (n = 5)	74,8 ± 3,7[1,2,3]	81,7 ± 10,8[1,3]	120,9 ± 14,8[1,2,3]	23,3 ± 1,3[1,3]
Крововтрата + ПВП (n = 5)	35,7 ± 3,6[1]	75,8 ± 9,93	42,8 ± 10,4	15,3 ± 0,6
Крововтрата + НЧМ + ПВП (n = 5)	30,2 ± 3,1[1]	33,0 ± 6,5[2,3]	107,6 ± 17,1[1,2,3]	21,7 ± 1,0[2]
Крововтрата + 3-ГП + ПВП (n = 5)	29,2 ± 2,3[1]	44,2 ± 4,02,3	27,8 ± 4,6[1,3]	15,4 ± 0,6[1,2,3]
Крововтрата + НЧМ + 3-ГП + ПВП (n = 5)	50,5 ± 4,2[1,2,3]	103,4 ± 12,4[1,2]	78,0 ± 11,6	20,2 ± 1,4[1]

Примітка. [1]p < 0,05 порівняно з інтактними тваринами (контроль), [2]p < 0,05 порівняно з крововтратою з введенням розчинника (контрольна патологія), [3]p < 0,05 порівняно з референс-препаратом Феррум Лек, n – кількість спостережень.

Лише у випадках застосування НЧМ, стабілізованих мексидолом, мала місце вірогідна різниця між дією цих засобів та ефектом референс-препарату на користь тест-зразка.

Через 3 год від початку моделювання гострої постгеморагічної анемії загальна залізо-зв'язувальна здатність плазми знаходилася на рівні контролю (рисунок). Застосування препарату порівняння та НЧМ не викликало змін даного показника відносно контрольної патології. Водночас під впливом рідин, що містили мексидол, НЧМ, стабілізовані мексидолом, ПВП та ПВП + мексидол, відбувалося зниження загальної залізо-зв'язувальної здатності плазми ($p < 0,005$). Нанорідина з композитними НЧМ діяла аналогічно ($p < 0,02$), зменшуючи цей показник у 1,2 разу порівняно з контрольною патологією.

Як бачимо, характер змін умісту заліза через 3 год після крововтрати без фармакологічної корекції свідчить, що в цей період компенсації крововтрати вже відчутні зрушення в метаболізмі даного елементу. Зниження вмісту заліза в плазмі крові, вочевидь, пояснюється його втратою з вилученою кров'ю та гемодилюцією, яка має місце в фазі гідремічної компенсації крововтрати [18]. Одночасне з цим зменшення вмісту заліза в кістковому мозку може бути наслідком прискореного дозрівання та викиду в циркуляцію молодих форм еритроцитів за умов напруженого еритропоезу. Відсутність змін концентрації заліза в печінці та селезінці щурів з контрольною патологією, імовірно, свідчить про те, що на момент дослідження мобілізація заліза з депонуючих органів ще не набуває повного масштабу.

Застосування після гострої крововтрати Феррум Лек як еталонного парентерального препарату заліза підвищувало вміст досліджуваного елементу лише в печінці щурів, що можна пояснити першочерговим накопиченням цього високомолекулярного комплексу в ретикуло-ендотеліальних клітинах даного органа [19].

На відміну від препарату порівняння НЧМ, стабілізовані мексидолом та ПВП, викликали збільшення концентрації заліза не тільки в печінці, а й у кістковому мозку, що супроводжувалося зниженням залізо-зв'язувальної здатності плазми. Зазначений розвиток процесів, вочевидь, свідчить про вищу біодоступність таких наночастинок та їх ширший розподіл в організмі порівняно з традиційним препаратом заліза, що узгоджується з даними літератури про особливості фармакокінетики нанооксидів заліза, покритих стабілізуючими агентами [20, 21]. Проте й дисперсія з самими НЧМ розподілялася аналогічно в кістковому мозку й печінці, викликаючи також підвищення вмісту

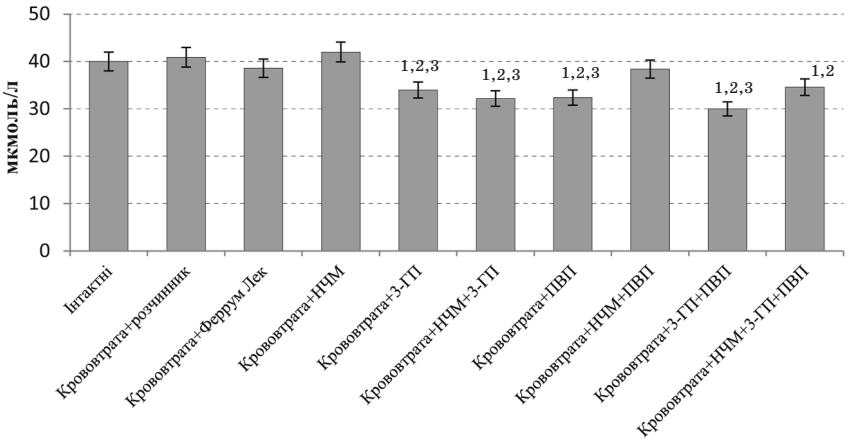

Рисунок. Залізо-зв'язувальна здатність плазми крові через 3 год після гострої крововтрати та її корекції композитними наночастинками або їхніми складовими

[1]p < 0,05 порівняно з інтактними тваринами (контроль)
[2]p < 0,05 порівняно з крововтратою з введенням розчинника (контрольна патологія)
[3]p < 0,05 порівняно з референс-препаратом Феррум Лек

заліза в селезінці. Це може свідчити, що поповнення пулу заліза в кровотворних і депонуючих органах при гострій крововтраті, здебільшого, визначається дозою та розмірами НЧМ, а стабілізуючі агенти привносять певну специфіку в цей процес. Зокрема, при диспергуванні НЧМ разом з мексидолом і застосуванні цієї рідини для корекції гострої крововтрати, крім описаних зрушень, також мало місце зростання вмісту заліза в плазмі крові та зменшення її здатності зв'язувати цей елемент. Водночас стабілізація НЧМ за допомогою ПВП супроводжувалася збільшенням умісту заліза в селезінці, підвищенням його концентрації в плазмі крові на фоні незмінного вмісту цього елементу в кістковому мозку та зниження концентрації в печінці. Така різниця може визначатися розмірами та поверхневими характеристиками стабілізованих наночастинок, що зумовлює особливості часу їх знаходження в плазмі крові та презентації клітинам ретикуло-ендотеліальної системи. Слід також відмітити, що розчин ПВП, введений після крововтрати, не впливав на вміст заліза в кровотворних і депонуючих органах та плазмі крові, тоді як введення мексидолу збільшувало концентрацію заліза в кістковому мозку, що може відображати описану раніше властивість цього препарату стимулювати еритропоез [22].

Таким чином, при гострій крововтраті композитні наночастинки на основі магнетиту, стабілізованого 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинатом (мексидолом) та ПВП, сприяють підвищенню вмісту заліза в кістковому мозку, збільшують його запаси в печінці та модифікують транспорт плазмою крові, що в мієлоїдній тканині виражене сильніше за ефекти традиційного парентерального препарату заліза Феррум Лек. Встановлені особливості можуть пояснити швидкий позитивний вплив зазначених наночастинок на відновлення гематологічних показників при гострій постгеморагічній анемії в експерименті [8].

Висновки

1. Гостра крововтрата в білих щурів з вилученням 25 % циркулюючої крові через 3 год після її відтворення характеризується зменшенням вмісту заліза в плазмі крові та кістковому мозку.

2. Референс-препарат Феррум Лек (1,25 мг Fe/кг) через 3 год після його введення для корекції гострої крововтрати викликає збільшення депо заліза в печінці і не впливає на його вміст в інших органах та плазмі крові.

3. Композитні наночастинки (1,35 мг Fe/кг), що містять магнетит, 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат (мексидол) та ПВП сприяють підвищенню вмісту заліза як в кровотворній тканині, так і в депонуючих органах (печінці), а також знижують залізозв'язувальну здатність плазми крові.

4. Зміни вмісту заліза в кістковому мозку та депонуючих органах тварин при корекції гострої крововтрати окремими складовими композитних наночастинок свідчать, що визначальну роль у цих процесах відіграє нанооксид заліза, а стабілізуючі речовини, особливо мексидол, модифікують зазначені процеси.

1. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація : монографія / [І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук та ін.]. – К. : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
2. *Никифоров В. Н.* Биомедицинские применения магнитных наночастиц / В. Н. Никифоров // Наука и технологии в промышлености. – 2011. – № 1. – С. 90–99.
3. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent / X. Zhao, H. Zhao, Z. Chen [et al.] // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2014. – V. 14, № 1. – P. 210–220.
4. *Wang S. Y.* Magnetic nanoparticles and thermally responsive polymer for targeted hyperthermia and sustained anti-cancer drug delivery / S. Y. Wang, M. C. Liu, K. A. Kang // Adv. Exp. Med. Biol. – 2013. – V. 765. – P. 315–321.
5. Протианемічна активність субстанції наночастинок заліза за умов перорального введення щурам / А. М. Дорошенко, Л. С. Рєзніченко, С. М. Дибкова [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 3 (39). – С. 12–19.
6. *Kowalczyk M.* Ferumoxytol: a new era of iron deficiency anemia treatment for patients with chronic kidney disease / M. Kowalczyk, M. Banach, J. Rysz // J. Nephrol. – 2011. – V.2 4, № 6. – P. 717–722.

7. *Veiseh O.* Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging / O. Veiseh, J. Gunn, M. Zhang // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2010. – V. 62, № 3. – P. 284–304.
8. Пат. № 2493857 C1 РФ, МПК A61K 33/26; B82Y 5/00; B82Y 40/00. Способ получения биологически активной наножидкости на основе наночастиц оксида железа (II, III) и производного 3-гидроксипиридина / Важничая Е. М. (UA); Мокляк Е. В. (UA); Мовчан Б. А. (UA); Курапов Ю. А. (UA); Забозлаев А. А. (RU); заявитель и патентообладатель ООО «НПК «ФАРМАСОФТ» (RU). – № 2012142117/15; заявл. 03.10.2012; опубл. 27.09.2013.
9. Науково-практичні рекомендації з утримування лабораторних тварин та роботи з ними / Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А. [та ін.]. – К. : ВД «Авіцена», 2002. – 156 с.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / [за ред. О. В. Стефанова]. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
11. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles / F. Roohi, J. Lohrke, A. Ide [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 4447–4458.
12. Пат. 92556 Україна, МПК B82B 3/00, C23C 14/24, C23C 14/54. Спосіб одержання наночастинок системи метал-кисень із заданим складом, електронно-променевим випаровуванням і конденсацією у вакуумі / Б. Є. Патон, Б. О. Мовчан, Ю. А. Курапов, К. Ю. Яковчук. Опубл. 10.11.10, бюл. № 21.
13. *Мокляк Є. В.* Ефекти наночастинок магнетиту при гострій постгеморагічній анемії за їх введення в різних дозах / Є. В. Мокляк // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 4, Т. 2 (105). – С. 133–136.
14. Pharmacokinetic study of ferumoxytol: a new iron replacement therapy in normal subjects and hemodialysis patients / R. Landry, P. M. Jacobs, R. Davis [et al.] // Am. J. Nephrol. – 2005. – V. 25, № 4. – P. 400–410.
15. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой: 4.1.1482-03. – М. : Минздрав России, 2003. – 16 с.
16. *David R. M.* Serum determination with Ferene-S without deproteinization: application to the RA-1000 Analyser / R. M. David, Z. K. Schihabi // Clin. Chem. – 1984. – V. 30. – P. 974.
17. *Боровиков В. П.* Statistica: искусство анализа данных на компьютере / В. П. Боровиков. – СПб. : ПИТЕР, 2003. – 688 с.
18. Патофизиология: [учебник] / [ред. В. В. Новицкого, Е. Д. Гольдберга, О. И. Уразовой]. – Т. 2. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 640 с.
19. Инструкция по применению препарата Феррум Лек / Компендиум. Лекарственные препараты. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://compendium.com.ua/info/12236/sandoz/ferrum-lek.
20. Clearance of iron oxide particles in rat liver: effect of hydrated particle size and coating material on liver metabolism / K. C. Briley-Saebo, L. O. Johansson, S. O. Hustvedt [et al.] // Invest. Radiol. – 2006. – V. 41, № 7. – P. 560–571.
21. Evaluation of the tolerance and distribution of intravenously applied ferrofluid particles of 250 and 500 nm size in an animal model / S. Wiegand, T. Heinen, A. Ramaswamy [et al.] // J. Drug. Target. – 2009. – V. 17, № 3. – P. 194–199.
22. Профілактична дія мексидолу при гострій крововтраті / Є. В. Мокляк, Н. О. Олійник, О. М. Важнича [та ін.] // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2008. – № 1–2. – С. 18–21.

Є. В. Мокляк, О. М. Важнича, І. М. Андрусишина

Вплив композитних наночастинок магнетиту на вміст заліза в органах та плазмі крові щурів за умов гострої крововтрати

Створення лікарських форм нанооксидів заліза стимулює пошук таких способів їх покриття, які б найбільш адекватно відповідали конкретному призначенню. Використовуючи для стабілізації наночастинок магнетиту (НЧМ) у гідрофільному середовищі 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину (3-ГП) сукцинат (мексидол) разом з полівінілпірролідоном (ПВП), одержали композитні наночастинки, придатні для фармакологічної корекції гематологічних порушень, викликаних гострою постгеморагічною анемією. Їхній вплив на метаболізм заліза в організмі раніше не досліджувався.

Мета дослідження – вивчити вплив рідини, яка містить НЧМ, стабілізовані похідним 3-ГП та ПВП, та її окремих складових на вміст заліза в кровотворних і депонуючих органах та плазмі крові за умов гострої крововтрати.

В експериментах на 45 білих щурах-самцях лінії Wistar моделювали гостру крововтрату. Для її корекції тваринам вводили НЧМ, стабілізовані похідним 3-ГП та ПВП, у дозі 1,35 мг Fe/кг, окремі складові цієї композиції або референс-препарат Феррум Лек у відповідних дозах. Уміст заліза в кістковому мозку, печінці та селезінці тварин визначали методом атомно-оптико-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою; уміст заліза в плазмі крові та її загальну залізозв'язувальну здатність – у реакції з Ференом-S.

Показано, що гостра крововтрата через 3 год після її відтворення характеризується зменшенням вмісту заліза в плазмі крові та кістковому мозку. Референс-препарат Феррум Лек викликає збільшення депо заліза в печінці й не впливає на його вміст в інших органах та плазмі крові. Композитні наночастинки, що містять магнетит, 2-етил-6-метил-3-ГП сукцинат та ПВП, сприяють підвищенню вмісту заліза як в кровотворній тканині, так і в депонуючих органах (печінці), знижуючи при цьому залізозв'язувальну здатність плазми. Зміни вмісту заліза в кістковому мозку та депонуючих органах тварин при корекції гострої крововтрати окремими складовими композитних наночастинок свідчать, що визначальну роль в цих процесах відіграє нанооксид заліза, а стабілізуючі речовини, особливо мексидол, модифікують цей процес.

Встановлені особливості можуть пояснити швидкий позитивний вплив НЧМ, стабілізованих мексидолом та ПВП, на відновлення гематологічних показників при гострій постгеморагічній анемії в експерименті.

Ключові слова: наночастинки магнетиту, 3-гідроксипіридин, полівінілпіролідон, уміст заліза, кістковий мозок, печінка, селезінка, плазма крові, крововтрата

Е. В. Мокляк, Е. М. Важничая, И. Н. Андрусишина

Влияние композитных наночастиц магнетита на содержание железа в органах и плазме крови крыс в условиях острой кровопотери

Создание лекарственных форм нанооксидов железа стимулирует поиск таких способов их покрытия, которые бы наиболее адекватно отвечали конкретному назначению. Используя для стабилизации наночастиц магнетита (НЧМ) в гидрофильной среде 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ГП) сукцинат вместе с поливинилпирролидоном (ПВП), получили композитные наночастицы, пригодные для фармакологической коррекции гематологических нарушений, вызванных острой постгеморрагической анемией. Их влияние на метаболизм железа в организме раньше не исследовалось.

Цель исследования – изучить влияние жидкости, содержащей НЧМ, стабилизированные производным 3-ГП и ПВП, и ее отдельных составляющих на содержание железа в кроветворных и депонирующих органах и плазме крови в условиях острой кровопотери. В экспериментах на 45 белых крысах-самцах линии Wistar моделировали острую кровопотерю. Для ее коррекции животным вводили НЧМ, стабилизированные производным 3-ГП и ПВП, в дозе 1,35 мг Fe/кг, отдельные составляющие этой композиции или референс-препарат Феррум Лек в соответствующих дозах. Содержание железа в костном мозге, печени и селезенке животных определяли методом атомно-оптико-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой; содержание железа в плазме и ее общую железосвязывающую способность – в реакции с Ференом-S.

Показано, что острая кровопотеря через 3 часа после ее воспроизведения характеризуется уменьшением содержания железа в плазме крови и костном мозге. Референс-препарат Феррум Лек вызывает увеличение депо железа в печени и не влияет на его содержание в других органах и плазме крови. Композитные наночастицы, содержащие магнетит, 2-этил-6-метил-3-ГП сукцинат и ПВП, способствуют повышению содержания железа как в кроветворной ткани, так и в депонирующих органах (печень), снижая при этом железосвязывающую способность плазмы по сравнению с контрольной патологией. Изменения содержания железа в костном мозге и депонирующих органах животных при коррекции острой кровопотери отдельными составляющими композитных наночастиц свидетельствуют, что определяющую роль в этих процессах играет нанооксид железа, а стабилизирующие вещества, особенно мексидол, модифицируют этот процесс.

Установленные особенности могут объяснить быстрое позитивное влияние НЧМ, стабилизированных мексидолом и ПВП, на восстановление гематологических показателей при острой постгеморрагической анемии в эксперименте.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, 3-гидроксипиридин, поливинилпирролидон, содержание железа, костный мозг, печень, селезенка, плазма крови, кровопотеря

Ye. V. Mokliak, Ye. M. Vazhnichaya, I. N. Andrusishina

Composite magnetite nanoparticles influence on iron content in the organs and blood plasma of rats under the conditions of acute blood loss

Creating of medicinal formulations of iron nanooxides stimulates the search for such methods of coverage that would most appropriately meet the specific purpose of their use. Using of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (3-HP) succinate together with polyvinyl pyrrolidone (PVP) to stabilize magnetite nanoparticles (MNPs) in hydrophilic medium, it was received composite nanoparticles suitable for pharmacological correction of hematological disorders caused by acute posthemorrhagic anemia, but their effect on the iron metabolism in the organism has not been investigated previously.

Research aim is to study the effect of fluid containing MNPs stabilized by 3-HP derivative and PVP and its individual components on the iron content in the blood-forming and depositing organs as well as in blood plasma under the conditions of acute blood loss. In the experiments on 45 albino male Wistar rats acute blood loss was designed. For its correction the animals were administered with MNPs stabilized by

3-HP derivative and PVP in a dose of 1,35 mg Fe/kg, the individual components of the given composition, or the reference preparation Ferrum Lek in appropriate doses. The iron content in the bone marrow, liver and spleen of the animals was determined by atomic-optical emission spectrometry with inductively coupled plasma; the iron content in blood plasma and total iron binding capacity – in the reaction with Feren-S.

It is shown that acute blood loss 3 hr after its design is characterized by the reduction of iron content in the blood plasma and bone marrow. Reference preparation Ferrum Lek causes an increase in iron deposition in the liver and has no effect on its content in other organs and blood plasma. Composite nanoparticles containing magnetite, 2-ethyl-6-methyl-3-HP succinate and PVP, enhance the iron content in hematopoietic tissue and depositing organs (liver) while reducing iron binding capacity of blood plasma as compared to control disease. Changes of iron content in the bone marrow and depositing organs of animals in the correction of acute blood loss by the individual components of composite nanoparticles show that nano-iron plays the decisive role in these processes, and stabilizing agents, especially mexidol, modify these processes.

Revealed features may explain the rapid positive influence of MNPs stabilized by mexidol and PVP on the restoration of hematological parameters in acute post-hemorrhagic anemia under the experimental conditions.

Key words: magnetite nanoparticles, 3-hydroxypyridine, polyvinyl pyrrolidone, iron content, bone marrow, liver, spleen, blood plasma, blood loss

Надійшла: 21.10.2014 р.

Контактна особа: Мокляк Євген Володимирович, заочний аспірант, кафедра експериментальної та клінічної фармакології, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава. Тел.: + 38 0 99 980 85 47. Електронна пошта: evgeniy_m13@ukr.net

УДК 577.35; 612.17; 615.31

М. А. Мохорт, Ю. М. Кутовий

Вплив похідних імідазо[1,2-а]азепінію на скоротливу активність ізольованого серця щура

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

Ключові слова: прекондиціювання міокарда, ізольоване серце, похідні імідазо[1,2-а]азепінію

Сьогодні все більшу увагу дослідників привертає явище прекондиціювання міокарда як способу лікування та профілактики ішемічних пошкоджень міокарда. В Україні смертність від серцево-судинних хвороб становить 65,8 % від загальної й збільшується на 1,5–2,0 % щорічно [1], що вимагає розроблення нових високоефективних підходів до лікування та профілактики серцево-судинних хвороб. Одним з таких методів є прекондиціювання міокарда.

Прекондиціювання міокарда – явище підвищення стійкості міокарда до пошкоджень під час тривалого періоду ішемії-реперфузії. Механізми прекондиціювання запускаються у відповідь на короткі (до 5 хв) епізоди ішемії-реперфузії (ішемічне прекондиціювання), або під дією хімічних сполук (фармакологічне прекондиціювання) [2]. Особливий інтерес становить прекондиціювання за допомогою хімічних сполук. Уперше таку активність виявили в аденозину та нікорандилу [3, 4], а пізніше вона була встановлена для багатьох сполук різних класів, як нових, так і відомих препаратів, що застосовуються в лікарській практиці з іншою метою (препарати для наркозу, опіоїди, сульфаніламідні препарати, інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) та ін. [5–9]).

Важливим елементом прекондиціювання є активація АТФ-чутливих калієвих каналів. Багато сполук, які викликають ефект прекондиціювання, є активаторами АТФ-чутливих калієвих каналів [10]. Серед них – нікорандил, пінацидил, кромакалім, левкромакалім, флокалін та інші відомі сполуки [11].

Результатами прекондиціювання є:

1) зменшення внутрішньоклітинного навантаження іонами Ca^{2+};

2) зниження скоротливої здатності міокарда (відповідно – потреб в енергії);

3) регулювання утворення активних форм кисню (АФК);

4) оптимізація синтезу АТФ;

5) уповільнення апоптозу;

6) стабілізація структури мембран кардіоміоцитів.

Визначення таких показників функціонування серця, як тиск у лівому шлуночку, швидкість скорочення міокарда (dp/dtmax), об'єм коронарного кровообігу, частота серцевих скорочень (ЧСС) у нормі та за моделювання ішемії, дозволяє зробити перші висновки щодо здатності досліджуваної субстанції викликати ефект прекондиціювання міокарда.

У відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» ведуться пошуки ефективних сполук, здатних прекондиціювати міокард, серед похідних імідазо[1,2-а]азепінію. Попередні дослідження показали, що ряд синтезованих сполук ефективно знижували тонус судин на фоні гіперкалієвої констрикції за умов *in vitro* [12]. Зважаючи на попередні дослідження *in silico*, нами було зроблено припущення, що вазодилататорна активність виділених похідних може бути пов'язаною з впливом на АТФ-чутливі калієві канали. Можна припустити, що дані сполуки викликатимуть процес прекондиціювання міокарда. На основі скринінгу було відібрано найактивніші сполуки для подальшого дослідження з метою вивчити їхню здатність прекондиціювати міокард. У

© Колектив авторів, 2014

даній роботі встановлення потенційної здатності обраних сполук до прекондиціювання міокарда проводили, досліджуючи їхній вплив на показники скоротливої активності серця, а саме: пульсовий тиск, ЧСС, dp/dtmax. *Мета дослідження* – вивчити вплив похідних імідазо[1,2-а]азепінію на скоротливу активність ізольованого серця щура.

Матеріали та методи. Було досліджено три сполуки – похідні імідазо[1,2-а]азепінію під шифрами IFT_000273, IFT_000274, IFT_000275. Структурні формули надано на рисунку.

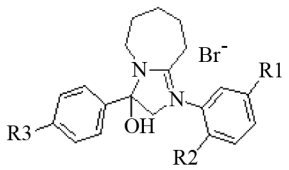

Рисунок. Структурна формула похідних імідазо[1,2-а]азепінію. Для IFT_000273: R1=OCF_2H, R2=H, R3=Cl; IFT_000274: R1=H, R2=H, R3=OCF_2H; IFT_000275: R1=OCF_2H, R2=H, R3=OCF2H

Дослідження проводили на ізольованих серцях нелінійних білих щурів обох статей масою 150–300 г, розведення ПП «Біомодельсервіс». Дослідження проведено відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [13]. Тварин наркотизували шляхом внутрішньоочеревинного введення уретану з розрахунку 1,5 г/кг. Додатково проводили ін'єкцію гепарину (1000 МО) для запобігання тромбоутворенню в коронарних судинах під час видалення серця. Грудну порожнину розкривали поперечним розрізом на рівні діафрагми та видаляли серце, яке одразу поміщали в льодовий розчин Кребса-Хензеляйта, що містив (ммоль/л): NaCl – 116,8, $NaHCO_3$– 25, KCl – 5,9, $MgSO_4$ – 1,2, KH_2PO_4 – 1,2, $CaCl_2$ – 1,7, глюкоза – 12, pH = 7,4. Серця під'єднували до установки перфузії ізольованого серця шляхом канюлювання висхідної аорти. Перфузію проводили під постійним тиском 60 мм рт. ст. розчином Кребса-Хензеляйта, який насичували газовою сумішшю 95 % O_2 і 5 % CO_2. Температуру перфузуючого розчину підтримували на рівні 37 °С. У лівий шлуночок вводили латексний балончик, з'єднаний з датчиком тиску Ohmeda.

Після стабілізаційного періоду тривалістю 15 хв до перфузійного розчину протягом 5 хв додавали досліджувані сполуки, попередньо розчинені в ДМСО і розведені в буфері Кребса-Хензеляйта таким чином, щоб їхня концентрація в перфузійному розчині становила для різних серій експериментів: $5\cdot10^{-7}$, $1\cdot10^{-6}$, $1\cdot10^{-5}$ моль/л, після чого відразу моделювали глобальну ішемію міокарда шляхом припинення подачі перфузату. Здатність досліджуваних сполук змінювати скоротливу активність міокарда визначали за змінами досліджуваних параметрів, а саме: пульсового тиску (різниця між систолічним та діастолічним тиском у лівому шлуночку), ЧСС, а також за першою похідною тиску в лівому шлуночку – dp/dtmax. Дані записували на персональний комп'ютер із застосуванням програми DataTrax2 і аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента в програмі Statistica 6. Достовірними вважали значення при $p \leq 0,05$. Результати наведено у вигляді змін (%) відносно контролю.

Результати та їх обговорення. Отримані результати показали, що досліджувані сполуки по-різному впливають на скоротливу активність ізольованих сердець.

Сполука під шифром IFT_000273 у концентрації $1\cdot10^{-5}$ моль/л викликала зупинку серця відразу після введення. Даний феномен не міг бути спричинений дією розчинника (ДМСО), оскільки, по-перше, контрольне введення відповідної кількості ДМСО не викликало статистично значущих змін, по-друге, інші досліджувані сполуки (IFT_000274, IFT_000275) не проявляли подібного ефекту в аналогічній концентрації. У концентрації $1\cdot10^{-6}$ моль/л сполука під час введення викликала збільшення пульсового тиску, dp/dtmax та ЧСС порівняно з вихідними значеннями (до дії речовини) (табл. 1).

Таблиця 1

Скоротлива активність ізольованого серця щура за впливу сполуки IFT_000273, % змін відносно контролю

Період спостереження	Вимірюваний показник	Контроль	ІФТ_000273, $1\cdot10^{-5}$ моль/л	ІФТ_000273, $1\cdot10^{-6}$ моль/л	ІФТ_000273, $5\cdot10^{-7}$ моль/л
Вихідні значення, %	Пульсовий тиск	100	-	100	100
	dp/dtmax	100	-	100	100
	Частота серцевих скорочень	100	-	100	100
Під дією сполуки, %	Пульсовий тиск	-	-	116,30 ± 21,69	97,80 ± 8,22
	dp/dtmax	-	-	593,10 ± 28,69*	320,10 ± 12,29*
	Частота серцевих скорочень	-	-	153,00 ± 24,88*	98,20 ± 6,63
1 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	102,00 ± 18,64	-	102,80 ± 41,49	46,80 ± 6,22*
	dp/dtmax	418,20 ± 234,89*	-	543,50 ± 22,55*	193,40 ± 17,55*
	Частота серцевих скорочень	123,00 ± 23,73	-	158,60 ± 37,62*	124,00 ± 12,48*
5 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	13,60 ± 4,31*	-	11,80 ± 3,46*	9,80 ± 1,98*
	dp/dtmax	47,20 ± 27,31*	-	80,00 ± 5,18*	46,50 ± 3,39*
	Частота серцевих скорочень	104,40 ± 27,31	-	203,50 ± 74,34*	142,30 ± 35,34*

*Примітка. n = 6–8, *статистично достовірно порівняно з вихідними даними, $p < 0,05$.*

Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск – без змін; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС, знижені dp/dtmax та пульсовий тиск. У концентрації $5\cdot10^{-7}$ моль/л дана сполука під час введення також викликала збільшення dp/dtmax, ЧСС та пульсовий тиск без змін. Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС і dp/dtmax, знижений пульсовий тиск; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС, знижені dp/dtmax та пульсовий тиск.

Сполука під шифром IFT_000274 у концентрації $1\cdot10^{-5}$ моль/л викликала підвищення dp/dtmax та пульсового тиску під час введення сполуки, ЧСС не змінювалася (табл. 2). Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищене значення dp/dtmax, пульсовий тиск і ЧСС знижені; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС і dp/dtmax, пульсовий тиск знижений. У концентрації $1\cdot10^{-6}$ моль/л сполука викликала збільшення пульсового тиску та dp/dtmax порівняно з вихідними значеннями, ЧСС не змінювалася. Під час моделювання ішемії серця

за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск знижений; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС і dp/dtmax, пульсовий тиск знижений. У концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л сполука викликала збільшення всіх досліджуваних показників порівняно з контролем. Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск знижений; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС і dp/dtmax, пульсовий тиск знижений. За результатами досліджень, сполука IFT_000274 спричинювала максимальний ефект при нижчій, порівняно з IFT_000273, концентрації ($5 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

Сполука під шифром IFT_000275 у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л підвищувала значення dp/dtmax порівняно з вихідними показниками одразу після введення, ЧСС та пульсовий тиск не змінювалися (табл. 3) Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск знижений; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС, пульсовий тиск і dp/dtmax знижені. У концентрації $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л сполука викликала збільшення всіх досліджуваних показників. Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск знижений; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС, пульсовий тиск і dp/dtmax знижені. У концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л сполука викликала збільшення пульсового тиску, dp/dtmax та

Таблиця 2

Скоротлива активність ізольованого серця щура за впливу сполуки IFT_000274, % змін відносно контролю

Період спостереження	Вимірюваний показник	Контроль	ІФТ_000273, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	ІФТ_000273, $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л	ІФТ_000273, $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л
Вихідні значення, %	Пульсовий тиск	100	100	100	100
	dp/dtmax	100	100	100	100
	Частота серцевих скорочень	100	100	100	100
Під дією сполуки, %	Пульсовий тиск	-	114,70 ± 9,03*	136,30 ± 19,97*	154,50 ± 22,43*
	dp/dtmax	-	386,90 ± 27,02*	461,20 ± 5,92*	616,40 ± 46,85*
	Частота серцевих скорочень	-	101,20 ± 4,51	101,50 ± 10,33	119,69 ± 18,18*
1 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	102,00 ± 18,64	60,50 ± 12,73*	88,40 ± 15,71*	87,80 ± 10,69*
	dp/dtmax	418,20 ± 234,89*	183,30 ± 50,47*	467,10 ± 20,40*	373,20 ± 19,80*
	Частота серцевих скорочень	123,00 ± 23,73	90,90 ± 16,28*	158,50 ± 26,05*	127,50 ± 16,77*
5 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	13,60 ± 4,31*	35,20 ± 13,38*	28,50 ± 6,01*	30,20 ± 7,47*
	dp/dtmax	47,20 ± 27,31*	127,30 ± 7,42*	163,40 ± 4,85*	125,50 ± 22,36*
	Частота серцевих скорочень	104,40 ± 27,31	108,50 ± 12,25*	172,00 ± 25,26*	124,70 ± 27,43*

*Примітка. Тут і в табл. 3: n = 7–8, *статистично достовірно порівняно з вихідними даними, $p < 0,05$.*

Таблиця 3

Скоротлива активність ізольованого серця щура за впливу сполуки IFT_000275, % змін відносно контролю

Період спостереження	Вимірюваний показник	Контроль	ІФТ_000273, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	ІФТ_000273, $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л	ІФТ_000273, $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л
Вихідні значення, %	Пульсовий тиск	100	100	100	100
	dp/dtmax	100	100	100	100
	Частота серцевих скорочень	100	100	100	100
Під дією сполуки, %	Пульсовий тиск	-	101,80 ± 10,28	108,90 ± 15,43*	127,30 ± 10,19*
	dp/dtmax	-	343,40 ± 51,17*	698,10 ± 46,92*	561,40 ± 194,12*
	Частота серцевих скорочень	-	101,20 ± 1,59	192,30 ± 81,16*	132,30 ± 30,26*
1 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	102,00 ± 18,64	82,10 ± 11,30*	76,50 ± 12,85*	78,20 ± 16,16*
	dp/dtmax	418,20 ± 234,89*	343,20 ± 207,86*	323,90 ± 103,27*	365,70 ± 370,24*
	Частота серцевих скорочень	123,00 ± 23,73*	125,40 ± 22,03*	127,00 ± 27,50*	140,30 ± 43,61*
5 хв ішемії, %	Пульсовий тиск	13,60 ± 4,31*	9,90 ± 2,44*	17,30 ± 4,38*	22,60 ± 9,14*
	dp/dtmax	47,20 ± 27,31*	38,40 ± 15,37*	69,10 ± 17,51*	235,20 ± 17,31*
	Частота серцевих скорочень	104,40 ± 27,31	116,30 ± 24,87*	119,90 ± 30,67*	312,20 ± 134,12*

ЧСС порівняно з вихідними значеннями. Під час моделювання ішемії серця за дії сполуки мали: 1) на першій хвилині ішемії – підвищену ЧСС та dp/dtmax, пульсовий тиск знижений; 2) на п'ятій хвилині ішемії – підвищену ЧСС і dp/dtmax, пульсовий тиск знижений. Як видно з вищевказаного, сполука IFT_000275 збільшує значення dp/dtmax за всіх досліджуваних концентрацій. У концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л одразу після введення збільшується тільки цей показник, у концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л сполука викликала збільшення пульсового тиску, dp/dtmax та ЧСС.

Виходячи з отриманих результатів і порівнюючи їх з хімічними структурами досліджуваних сполук, можна зробити такі висновки: 1) наявність у структурі атома хлору (сполука IFT_000273) може викликати зменшення скоротливої активності ізольованих сердець; 2) наявність у структурі оксидифторметильного замісника за відсутності атома хлору (сполука IFT_000274) може спричинювати підвищення рівня скоротливої активності ізольованих сердець, а збільшення кількості оксидифторметильних замісників до двох (сполука IFT_000275) посилює цей ефект.

Висновок

Зафіксований ефект підвищення ЧСС та dp/dtmax за дії сполук IFT_000273, IFT_000274 та IFT_000275 на різних етапах експерименту, особливо під час моделювання ішемії, може опосередковано вказувати на потенціал даних субстанцій у прекондиціюванні міокарда.

1. Банк даних Державної служби статистики України [електронний ресурс] // Режим доступу: www.ukrcensus.gov.ua.
2. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / О. О. Мойбенко, В. Э. Досенко, О. М. Пархоменко [и др.]. – К. : Наукова думка. – 2008. – 520 с.
3. Nicorandil in Patients with Acute Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: A Systematic Review and Meta-Analysis / Wu M., Huang Z., Xie H., Zhou Z. // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 10. – e78231.
4. The ischemic preconditioning effect of adenosine in patients with ischemic heart disease / Sadigh B., Quintana M., Sylvén C. [et al.] // Cardiovasc Ultrasound. – 2010. – V. 7. – P. 52.
5. Beneficial effect of combination therapy with antihypertensive drugs in patients with hypertension / Shikata C., Sekikawa T., Kimura N. [et al.] // Exp. Clin. Cardiol. – 2007. – V. 12, № 1. – P. 33–36.
6. *Sivaraman V.* Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury / Sivaraman V., Yellon D. M. // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. – 2014. – V. 19, № 1. – P. 83 –96.
7. Cardioprotective effect of sevoflurane and propofol during anaesthesia and the postoperative period in coronary bypass graft surgery: a double-blind randomised study / Soro M., Gallego L., Silva V. [et al.] // Eur. J. Anaesthesiol. – 2012. – V. 29, № 12. – P. 561 –569.
8. Effect of remifentanil preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury / Sun H. T., Xue F. S., Liu K. P. [et al.] // Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. – 2009. – V. 31. – P. 612 –615.
9. Possible involvement of α1-adrenergic receptor and KATP channels in cardioprotective effect of remote aortic preconditioning in isolated rat heart / Taliyan R., Singh M., Lal Sharma P.[et al.] // J. Cardiovasc. Dis. Res. – 2010. – V. 1, № 3. – P. 145–151.
10. A novel mitochondrial KATP channel assay / Wojtovich A., Williams D., Karcz M. [et al.] // Circ. Res. – 2010. – V. 106, № 7. – P. 1190–1196.
11. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis / Quindry J., Miller L., McGinnis G. [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2012. – V. 113, № 3. – P. 498–506.
12. *Геращенко І.* Токолітична активність похідних імідазо[1,2-а]азепінію / І. Геращенко. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 6 (31), – С. 37 –41.
13. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [електронний ресурс] // Режим доступу: http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/994_137.

М. А. Мохорт, Ю. М. Кутовий

Вплив похідних імідазо [1,2-а]азепінію на скоротливу активність ізольованого серця щура

Мета дослідження – вивчення впливу похідних імідазо[1,2-а]азепінію на скоротливу активність ізольованого серця щура для первинного аналізу на їхню здатність викликати прекондиціювання міокарда. Збільшення таких показників, як тиск у лівому шлуночку, dp/dtmax, ЧСС у період ішемії може вказувати на наявність ефекту прекондиціювання. В експерименті вивчали сполуки під шифрами IFT_000273, IFT_000274, IFT_000275 у концентраціях $5{\cdot}10^{-7}$, $1{\cdot}10^{-6}$, $1{\cdot}10^{-5}$ моль/л. Вивчення біологічної дії даних сполук проводили на моделі ізольованого серця щура методом ретроградної перфузії під постійним тиском. У результаті проведених досліджень було встановлено, що обрані сполуки різною мірою впливають на скоротливу активність ізольованих сердець. У концентрації $1{\cdot}10^{-5}$ М сполука IFT_000273 викликала зупинку сердець, а інші сполуки (IFT_000274, IFT_000275) не викликали помітних змін за винятком збільшення dp/dtmax на 343,40 ± 51,17 % за дії речовини IFT_000275. За дії сполук в концентрації $1{\cdot}10^{-6}$ моль/л у більшості випадків спостерігали підвищення всіх показників, а для концентрацій $5{\cdot}10^{-7}$ моль/л спостерігали ще більше зростання досліджуваних показників для сполук IFT_000274 та IFT_000275. Сполука IFT_000273 проявляла максимум активності за концентрації $1{\cdot}10^{-6}$ моль/л. Під час моделювання ішемії, як правило, значення пульсового тиску та dp/dtmax знижувалися відносно вихідних значень, а ЧСС – навпаки зростала. У результаті аналізу отриманих даних було зроблено висновки, що наявність у хімічній структурі досліджуваної сполуки атома хлору призводить до зменшення її впливу на скоротливу активність ізольованого серця, у той час як присутність оксидифторметильних замісників збільшує його. Зважаючи на наявність впливу досліджених речовин на скоротливу активність міокарда, підвищення в більшості випадків значень dp/dtmax, ЧСС та пульсового тиску, представляється доцільним подальше поглиблене дослідження їхньої здатності прекондиціювати міокард за допомогою більш точних методів.

Ключові слова: прекондиціювання міокарда, ізольоване серце, похідні імідазо[1,2-а]азепінію

М. А. Мохорт, Ю. М. Кутовый

Влияние производных имидазо[1,2-а]азепиния на сократительную активность изолированного сердца крысы

Цель исследования – изучить влияния производных имидазо [1,2-а]азепиния на сократительную активность изолированного сердца крысы для первичного их анализа на способность вызывать прекондиционирование миокарда. Увеличение таких показателей как давление в левом желудочке,

dp/dtmax, ЧСС в период ишемии может указывать на наличие эффекта прекондиционирования. В эксперименте изучали соединения под шифрами IFT_000273, IFT_000274, IFT_000275 в концентрациях $5\cdot10^{-7}$, $1\cdot10^{-6}$, $1\cdot10^{-5}$ моль/л. Изучение биологического действия данных соединений проводили на модели изолированного сердца крысы методом ретроградной перфузии под постоянным давлением. В результате проведенных исследований было установлено, что выбранные соединения в различной степени влияют на сократительную активность изолированных сердец. В концентрации $1\cdot10^{-5}$ моль/л соединение IFT_000273 вызвало остановку сердца, а другие соединения (IFT_000274, IFT_000275) не вызвали заметных изменений за исключением увеличения dp/dtmax на 343,40 ± 51,17 % под действием вещества IFT_000275. При воздействии соединений в концентрации $1\cdot10^{-6}$ моль/л в большинстве случаев наблюдали повышение всех показателей, а для концентрации $5\cdot10^{-7}$ моль/л наблюдали еще больший рост исследуемых показателей для соединений IFT_000274 и IFT_000275. Соединение IFT_000273 проявляло максимум активности в концентрации $1\cdot10^{-6}$ моль/л. При моделировании ишемии, как правило, значения пульсового давления и dp/dtmax снижались по отношению к исходным, а ЧСС – наоборот возростала. В результате анализа полученных данных были сделаны выводы, что наличие в химической структуре исследуемого соединения атома хлора приводит к уменьшению ее влияния на сократительную активность изолированного сердца, в то время как присутствие оксидифторметильних заместителей усиливает сократительную активность изолированного сердца. Учитывая наличие влияния исследованных веществ на сократительную активность миокарда, повышение в большинстве случаев значений dp/dtmax, ЧСС и пульсового давления, представляется целесообразным дальнейшее углубленное исследование их способности прекондиционировать миокард с помощью более точных методов.

Ключевые слова: прекондиционирование миокарда, изолированное сердце, производные имидазо[1,2-а]азепиния

M. A. Mokhort, I. M. Kutovyii

Impact of imidazo[1,2-a]azepinium derivatives on isolated rat heart contractile activity

The goal of this study was to clarify the effect of some chemical compounds on myocardial preconditioning by their influence on contractile activity of isolated rat heart. Myocardium preconditioning is a phenomenon of increasing heart stability to damage during prolonged ischemia-reperfusion period induced by several short (till 5 min) ischemia-reperfusion cycles (ischemic preconditioning) or chemical compounds (pharmacological preconditioning).

We compared protective effects of 3 compounds (under ciphers IFT_000273, IFT_000274, IFT_000275) in 3 different concentrations ($5\cdot10^{-7}$, $1\cdot10^{-6}$, $1\cdot10^{-5}$ M). As a result compounds have shown different activity depend on its concentrations and its chemical structures. Compound IFT_000273 in concentration of $1\cdot10^{-5}$ M caused arrest of hearts contractions whereas other substances showed no significant effects. When administered in concentration of $1\cdot10^{-6}$ M all compounds demonstrated increased cardioprotection ability. Infusion of compounds IFT_000274 and IFT_000275 in concentration of $5\cdot10^{-7}$ M lead to effects that exceed those for $1\cdot10^{-6}$ M. Peak activity for compound IFT_000273 was detected in concentration of $1\cdot10^{-6}$ M: dp/dtmax and LVDP were decreased comparatively with baseline values under ischemia, and heart rate was increased. Our data suggest that investigated compounds are able to change contractile activity of isolated rat heart under ischemia. And that's why they may take part in myocardial preconditioning.

Key words: myocardium precondition, isolated heart, imidazo[1,2-a]azepinium derivatives

Надійшла: 06.11.2014 р.

Контактна особа: Кутовий Юрій Миколайович, аспірант, відділ фармакології серцево-судинних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 82 90. Електронна пошта: yurakutovyi@gmail.com

УДК 616.356-06:616.379-008.64]-092.9

К. А. Посохова[1], І. П. Стечишин[2]

Ефективність препаратів кверцетину за експериментального цукрового діабету

[1]ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського»
[2]ПВНЗ «Медичний коледж», м. Тернопіль

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, стрептозотоцин, ожиріння, кверцетин

Епідемічний характер зростання захворюваності на цукровий діабет 2 типу (ЦД 2) з ожирінням є важливою медичною проблемою та загрозою людству в XXI столітті. Припускають, що ожиріння та ЦД 2 мають спільний етіологічний чинник (окрім переїдання) (ВОЗ, 1999 р.; ISPAD, 1995 р., 2000 р., 2006 р., 2007 р.) [1, 2]. Практично 80 % хворих на ЦД 2 мають надмірну масу тіла. Причому в людей з помірним ступенем ожиріння частота діабету збільшується в 4 рази, з різко вираженим – у 30 разів. В Україні поширеність надмірної маси тіла становить 29,7 % серед жінок і 14, 8 % серед чоловіків. Відомо, що при ЦД 2 з ожирінням можуть бути корисними препарати рослинного походження з антиоксидантною активністю, зокрема кверцетин [3].

Мета дослідження – порівняльне вивчення ефективності водорозчинної та ліпосомальної форм кверцетину при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті типу 2 з ожирінням.

Матеріали та методи. У досліді використовували білих аутбредних статевозрілих щурів-самців масою 130–140 г, яких було розподілено на 4 групи: I – контроль (інтактні); II, III, IV групи – щури з ЦД 2, який відтворювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (STZ, «Sigma», 30 мг/кг, на 0,1 моль цитратному буфері, pH 4,5) [4] на тлі ожиріння, яке викликали шляхом 4-тижневого утримання тварин на високожировій дієті [5]. Високожирова модель ожиріння за своїми ознаками наближена до відповідної патології в людини [6]. Щурам III і IV груп через 10 тижнів після введення STZ вводили внутрішньоочеревинно відповідно водорозчинний препарат кверцетину (Корвітин, виробництва Борщагівського ХФЗ) та ліпосомальну форму цього біофлавоноїду (Ліпофлавон, виробництва Харківського підприємства по виробництву імунобіологічних та лікарських препаратів ЗАТ «Біолік») у дозі 10 мг/кг [7]. Уведення препаратів розпочинали через 10 тижнів від початку моделювання STZ діабету та здійснювали протягом 14 днів [8]. Евтаназію тварин проводили в стані наркозу (тіопентал – натрій, 50 мг/кг) відповідно до етичних стандартів та діючих рекомендацій (Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 р. № 3447–1).

Розвиток ЦД 2 підтверджували шляхом визначення концентрації глюкози в крові з використанням стандартного набору ООО НПП «Филисит диагностика» (Україна). У подальшому використовували тварин, у яких рівень глюкози через 14 днів після введення STZ був не нижчим ніж 10,8 ммоль/л [9]. Рівень інтерлейкінів (IL-6, IL-4) у крові визначали за допомогою набору реагентів для імуноферментного аналізу фірми «Вектор-бест» (Росія). Рівень лептину (Леп) досліджували імуноферментним методом за допомогою стандартного набору фірми ELISA (Німеччина). Визначали вміст стабільного метаболіту оксиду азоту – нітрит-аніона (NO_2^-) у крові та гомогенаті серцевого м'яза [10].

Перед евтаназією тварин проводили зважування та вимірювання таких параметрів: довжини тіла, окружності живота (ОЖ), окружності грудної клітки (ОГ) [11]. Визначали індекс маси тіла – ІМТ: маса тіла (г)/довжина тіла (см^2).

© Колектив авторів, 2014

Статистичну обробку результатів проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA. У випадках, коли розподіл вибірки відрізнявся від нормального, додатково застосовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично достовірною при значенні $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. На 15 добу після введення STZ спостерігали достовірне зростання в крові вмісту глюкози, що говорить про ефективне моделювання патології. Для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії не нижче ніж 10,8 ммоль/л. Як свідчать отримані результати, наприкінці терміну спостереження середній рівень глюкози в сироватці крові у тварин з ЦД зростав до 16,34 ± 1,11 ммоль/л і на 234 % перевищував відповідний показник контрольної групи 4,90 ± 0,37 ммоль/л ($p < 0,001$). При застосуванні обох форм кверцетину спостерігали зниження рівня цукру в крові, що було більше виражено (на 25 %) при введенні Ліпофлавону, ніж Корвітину. Ліпофлавон знижував цей показник до 6,47 ± 0,35 ммоль/л, або на 60 %, Корвітин – до 8,65 ± 0,64 ммоль/л, або на 47 % проти групи тварин з ЦД 2, у яких не проводили корекцію. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників [12].

Як свідчать результати, надані в таблиці 1, на тлі сформованої патології спостерігали збільшення в сироватці крові вмісту прозапального цитокіну IL-6 на 396 % з одночасним зниженням протизапального цитокіну IL-4 на 62 %. Указані зміни відбувалися на тлі підвищення в сироватці крові рівня стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- на 150 %. Уміст нітрит-аніона в міокарді знижувався на 35 %. При введенні водорозчинної форми кверцетину відмічено зниження

Таблиця 1

Біохімічні показники в сироватці крові та серці щурів за умов цукрового діабету 2 типу з ожирінням і впливу Корвітину та Ліпофлавону, M ± m

Показник	Група тварин			
	контроль (n = 7)	ЦД 2 (n = 8)	ЦД 2 + Корвітин (n = 10)	ЦД 2 + Ліпофлавон (n = 11)
NO_2^- (кров), мкмоль/л	2,53 ± 0,26	6,32 ± 0,16 $p < 0,001$	4,44 ± 0,15 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	3,97 ± 0,16 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$
NO_2^- (серце), мкмоль/кг	1,04 ± 0,11	0,68 ± 0,12 $p < 0,01$	1,01 ± 0,02 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	1,04 ± 0,04 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$
IL-6, нг/л	12,60 ± 0,28	62,51 ± 0,94 $p < 0,001$	32,88 ± 0,76 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	27,48 ± 0,50 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
IL-4, нг/л	24,42 ± 0,50	9,23 ± 0,37 $p < 0,001$	13,75 ± 0,37 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	17,15 ± 0,32 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Лептин, нг/л	152,71 ± 1,85	364,66 ± 4,71 $p < 0,001$	242,00 ± 2,43 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	212,60 ± 2,08 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примітка. Тут і в табл.2: p – достовірність відносно контролю, p_1 – відносно ЦД 2, p_2 – відносно групи ЦД 2 + Корвітин.

концентрації IL-6 на 47 %, концентрація IL-4, навпаки, зростала на 49 %. Ліпосомальна форма кверцетину, у свою чергу, сприяла зниженню концентрації IL-6 на 56 % та зростанню концентрації IL-4 на 86 %.

Під впливом водорозчинної та ліпосомальної форм кверцетину кількість стабільного метаболіту оксиду азоту в сироватці крові знижувалася на 30 та 37 % відповідно. Причому за ефективністю впливу на вміст NO_2^- Ліпофлавон перевершував Корвітин на 11 %, на IL-6 – на 16 %, на IL–4 – на 25 %. Рівень NO_2^- у міокарді при введенні Корвітину зростав на 49 % та при введенні Ліпофлавону – на 53 %. Причому під впливом обох форм кверцетину цей показник повертався до норми (табл. 1).

Сироватковий рівень лептину зростав при патології на 139 %. Відомо, що надлишкова продукція Леп супроводжується пригніченням секреції інсуліну та розвитком інсулінорезистентності [6, 13]. Водночас в процесі корекції Корвітином та Ліпофлавоном рівень цього ліпоцитокіну знижувався на 34 % та 42 % відповідно, причому при застосуванні ліпосомальної форми кверцетину вміст Леп був на 12 % нижчим, ніж у групі тварин, які отримували його водорозчинну форму (табл. 1).

Показники, що отримані при вимірюванні параметрів тіла експериментальних тварин, підтверджують розвиток ожиріння в щурів, які знаходилися на високожировій дієті. При цьому в групі з ожирінням і модельованим ЦД 2 підвищувалися порівняно з контролем маса тіла тварин на 70 %, ОЖ – на 84 %, ОГ – на 67 %, співвідношення ОЖ/ОГ – на 12 % та ІМТ – на 69 %. Довжина тіла тварин в контрольній та дослідній групах достовірно не відрізнялася.

Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів [5, 11], які описують аналогічні зміни маси тіла, ОЖ та ОГ, ІМТ з одночасним підвищенням рівня Леп при використанні висококалорійної дієти. Дані останніх років свідчать і про тісний зв'язок між ожирінням, інсулінорезистентністю та іншими компонентами метаболічного синдрому та ЦД 2 [14]. Недостатнє утворення NO розглядається як ранній предиктор кардіоваскулярних ускладнень при ЦД [15].

Як свідчать дані, надані в таблиці 2, у групах піддослідних тварин, яким проводили корекцію препаратами кверцетину, спостерігали достовірне зменшення ознак ожиріння.

Під впливом Корвітину відбувалося зниження показників ОЖ на 23 %, ОГ – на 15 %, маси тіла – на 24 %, ІМТ – на 23 % і ОЖ/ОГ – на 8 %. При цьому останній показник не відрізнявся від відповідної величини контрольної групи тварин. При введенні Ліпофлавону відмічалося зниження показника ОГ на 18 %, маси тіла – на 28 %, ІМТ – на 27 %, ОЖ – на 28 % та ОЖ/ОГ – на 13 %. Як видно з таблиці 2, препарати однаково ефективно впливають на показники ОГ та ОЖ/ОГ. Ліпофлавон ефективніше порівняно з Корвітином сприяє зменшенню маси тіла (на 6 %), ІМТ (на 5 %), ОЖ (на 6 %). При цьому показник ОЖ/ОГ повертався до величини контрольної групи тварин.

Таким чином, препарати кверцетину (водорозчинна форма Корвітин і, особливо, його ліпосомальна форма Ліпофлавон) при експериментальному цукровому діабеті 2 типу з ожирінням сприяють зниженню рівнів гіперглікемії, гіперлептинемії, усувають дисбаланс у системі інтерлейкінів та оксиду азоту, що відбувається на тлі зменшення показників, які характеризують ожиріння тварин. У позитивному впливі обох форм кверцетину на вивчені біохімічні та біометричні параметри при ЦД 2 з ожирінням суттєву роль відіграє їхня здатність ефективно пригнічувати вільнорадикальне окиснення та нормалізувати антиоксидантний статус, знижувати метаболічні прояви захворювання та проявляти протизапальну активність, у тому числі відновлюючи рівень лейкотрієнів [16]. Ефективність Ліпофлавону, крім того, завдячує мембранопротекторним, протизапальним і антиоксидантним властивостям ліпосомального фосфатидилхоліну, що входить до складу препарату [16].

Таблиця 2

Фізичні параметри щурів за умов цукрового діабету 2 типу з ожирінням та впливу Корвітину та Ліпофлавону, M ± m

Показник	Група тварин			
	контроль (n = 7)	ЦД 2 (n = 8)	ЦД 2 + Корвітин (n = 10)	ЦД 2 + Ліпофлавон (n = 11)
Маса тіла, г	185,00 ± 2,67	314,38 ± 2,20 $p < 0,001$	239,50 ± 1,89 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	225,91 ± 1,76 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Довжина тіла, см	19,29 ± 0,36	19,50 ± 0,46 $p > 0,05$	19,30 ± 0,26 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	19,09 ± 0,16 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
ІМТ	4,80 ± 0,08	8,10 ± 0,25 $p < 0,001$	6,21 ± 0,10 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	5,92 ± 0,07 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$
ОЖ, см	11,17 ± 0,25	20,54 ± 0,27 $p < 0,001$	15,74 ± 0,21 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	14,86 ± 0,26 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$
ОГ, см	10,30 ± 0,13	17,18 ± 0,24 $p < 0,001$	14,64 ± 0,28 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	14,07 ± 0,42 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
ОЖ/ОГ	1,07 ± 0,04	1,20 ± 0,03 $p < 0,05$	1,10 ± 0,02 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	1,05 ± 0,03 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$

Висновки

1. Експериментальний ЦД 2 з ожирінням супроводжується зростанням у крові рівнів глюкози, інтерлейкіну-6, лептину, стабільного метаболіту оксиду азоту з одночасним зменшенням кількості останнього в гомогенаті міокарда, зниженням вмісту в крові інтерлейкіну-4, що відбувається на тлі підвищення маси тіла тварин, індексу маси тіла, окружності живота та грудної клітки, співвідношення окружність живота/окружність грудної клітки.

2. При ЦД 2 з ожирінням Корвітин та, більшою мірою, Ліпофлавон сприяють зниженню рівнів лептину, інтерлейкіну-6 та підвищенню вмісту інтерлейкіну-4 в сироватці крові на тлі зменшення кількості стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- у сироватці крові та зростання його в гомогенаті міокарда.

3. Корвітин та Ліпофлавон за умов двотижневого введення щурам з ЦД 2 та ожирінням сприяють зменшенню ознак ожиріння: маси тіла, індексу маси тіла, окружності живота, окружності грудної клітки та співвідношення окружність живота/окружність грудної клітки в експериментальних тварин.

4. Отримані експериментальні дані щодо позитивного впливу препаратів кверцетину – Корвітину і, особливо, Ліпофлавону на патологічні прояви, що спостерігаються за експериментального ЦД 2 з ожирінням, є основою для поглибленого вивчення їхніх властивостей з метою розширення показань до застосування в клініці.

1. Цукровий діабет: загальна інформація [Електронний ресурс] / П. М. Боднар, Г. П. Михальчишин. – 2011. – Режим доступу: http://old.guoz.lviv.ua/view/ukr/page/1304/
2. *Сенаторова А. С.* Статья из монографии «Сахарный диабет: от ребенка до взрослого» [Електронний ресурс] / А. С. Сенаторова [та ін.] // Страна врачей. – 2010. – Режим доступу: http://medstrana.com/articles/2219/
3. Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes / Aguirre L., Arias N., Macarulla M. T. [et al.] // The Open Nutraceuticals Journal. – 2011. – № 4. – P. 189–198.
4. *Кіхтяк О. П.* Зміни рівнів лептину, інсуліну, С – пептиду та індексів HOMA у щурів–самців лінії Wistar із стрептозотоциновим діабетом на тлі висококалорійної дієти під впливом метформіну, піоглітазону та глімепіриду / О. П. Кіхтяк, О. П. Нещерет // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2011. – № 1. – С. 16–23.
5. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary–induced obesity / Xiu–Hua Shen, Qing–Ya Tang, Juan Huang [et al.] // Experimental Biology and Medicine. – 2010. – V. 235. – P. 47–51.
6. *Diemen V. V.* Experimental model to induce obesity in rats / V. V. Diemen, E. N. Trindade, M. R. M. Trindade // Acta Cirúrgica Brasileira. – 2006. – V. 21, 6. – P. 425–429.
7. Роль перекисного окислення ліпідів у патогенезі артеріальної гіпертензії / І. С. Чекман, Н. О. Дацюк, О. М. Лук'янова [та ін.] // Ліки України. – 2008. – № 6 (122). – С. 76–81.
8. *Зупанець І. А.* Дослідження гострої токсичності та середньо ефективних доз кверцетину при парентеральному уведенні в умовах розвитку ниркової недостатності у щурів / І. А. Зупанець, С. К. Шебеко, Д. С. Харченко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – № 1 (8). – С. 28–32.
9. *Орловский М. А.* Закономерности формирования гипергликемии при экспериментальном сахарном диабете / М. А. Орловский // Патология. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 52–56.
10. Analysis of nitrate, nirite and [15 N]–nitrate in biological fluids / L. Green, A. David, J. Glogovski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – V. 126, № 1. – P. 131–138.
11. Regulation of obesity and lipid disorders by Foeniculum vulgare and Plantago ovate in hight–fat–diet–induced obese rats / A. A. Shahat, H. A. Ahmed, F. M. Hammouda [et. al.] // American Journal of Food Technology. – 2012. – V. 7 (10). – P. 622–632.
12. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice / S. M. Jeong, M. J. Kang, H. N. Choi [et al.] // Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract). – 2012. –V. 6 (3). –P. 201–207.
13. *Древаль А. В.* Лептин у женщин, больных сахарным диабетом 2 типа, не получающих лекарственную сахароснижающую терапию / А. В. Древаль, И. В. Мисникова, И. В. Триголосова // Ожирение и метаболизм. – 2010. – № 1. – С. 41–45.
14. Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу / Т. І. Галенова, В. В. Конопельнюк, Л. І. Кот [та ін.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2010. – № 3. – С. 184–189.
15. *Koh K. K.* Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? / K. K. Koh, P. C. Oh, M. J. Quon // Cardiovascular Research. – 2009. – № 81. – P. 649–659.
16. *Бєлік Г. В.* Експериментальне обгрунтування використання ліпосомальної форми кверцетину при серцево-судинних захворюваннях: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / Г. В. Бєлік. – Харків, 2006. – 25 с.

К. А. Посохова, І. П. Стечишин

Ефективність препаратів кверцетину за експериментального цукрового діабету

Мета дослідження – вивчення ефективності водорозчинної та ліпосомальної форм кверцетину за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 2 типу з ожирінням.

Встановлено, що за експериментального цукрового діабету 2 типу з ожирінням (уведення стрептозотоцину, 30 мг/кг, на тлі 4-тижневої високожирової дієти) відмічається зростання в сироватці крові рівня глюкози, лептину, інтерлейкіну-6 з паралельним зменшенням вмісту інтерлейкіну-4, підвищується рівень нітрит-аніона в сироватці крові на фоні його зниження в міокарді. В експерименті спостерігали зростання біометричних показників, які однозначно свідчать про розвиток ожиріння.

Препарати кверцетину сприяють редукції патологічних проявів, які спостерігаються за експериментального цукрового діабету 2 типу з ожирінням: гіперглікемії, гіперлептинемії, дисбалансу в системі інтерлейкінів та системі оксиду азоту як у сироватці крові, так і в міокарді.

Як водорозчинна, так і ліпосомальна форми проявили загалом позитивний вплив на біометричні параметри експериментальних тварин. Це проявлялося зменшенням ознак ожиріння: маси тіла тварин, індексу маси тіла та ін., хоча активніший вплив на стан тварин при даній патології спостерігали після застосування ліпосомальної форми кверцетину. За ефективністю він краще, ніж Корвітин впливав на рівні глюкози, нітрит-аніона в сироватці крові, інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-4, лептину, на масу тварини, індекс маси тіла та окружність живота.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, стрептозотоцин, ожиріння, кверцетин

К. А. Посохова, И. П. Стечишин

Эффективность препаратов кверцетина при экспериментальном сахарном диабете

Цель исследования – изучение эффективности водорастворимой и липосомальной форм кверцетина при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете 2 типа с ожирением. При экспериментальном сахарном диабете 2 типа с ожирением отмечается повышение в сыворотке крови уровня глюкозы, лептина, интерлейкина-6 с параллельным уменьшением содержания интерлейкина-4, увеличивается уровень нитрит-аниона в сыворотке крови на фоне его снижения в миокарде. В эксперименте наблюдали увеличение биометрических показателей, которые однозначно свидетельствуют о развитии ожирения. Препараты кверцетина способствуют редукции патологических проявлений, которые наблюдаются при экспериментальном сахарном диабете 2 типа с ожирением: гипергликемии, гиперлептинемии, дисбаланса в системе интерлейкинов и системе оксида азота в сыворотке крови и миокарде. Как водорастворимая, так и липосомальная формы проявили положительное влияние на биометрические параметры экспериментальных животных. Это проявлялось уменьшением признаков ожирения: массы тела животных, индекса массы тела и др., хотя влияние на состояние животных при данной патологии в большей степени выражено у липосомальной формы кверцетина. Липофлавон эффективнее, чем Корвитин, влиял на уровень глюкозы, нитрит-аниона в сыворотке крови, интерлейкина-6 и интерлейкина-4, лептина, на массу животного, индекс массы тела и окружность живота.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, стрептозотоцин, ожирение, кверцетин

K. A. Posokhova, I. P. Stechyshyn

The effectiveness of quercetin containing preparations at the experimental diabetes mellitus

The aim of the study is a comparative research of the effectiveness of water-soluble and liposomal forms of quercetin at the streptozotocin-induced diabetes II type combined with obesity.

Experiments were performed on non-linear white male rats which were divided into four groups: 1 – control (intact animals), 2 – animals with diabetes II type, 3 and 4 – diabetes animals were injected with water-soluble form of quercetin (Korvitin) and liposomal form of quercetin (Lipoflavon) (10mg/kg, intraperitoneally, daily).

Experimental treatment started in 10 weeks after the administration of streptozotocin (STZ), for 2 weeks. Single injection of streptozotocine (STZ, Sigma, USA, 30 mg/kg body weight) was administered intraperitoneally to experimental animals after the previous 4-week high fat diet. STZ was dissolved in 0,1 molar citrate buffer (pH 4,5) immediately before the administration; control group was injected with the appropriate amount of citrate buffer.

It was shown that diabetes II type accompanied with marked changes in carbohydrate and lipid metabolism. In particular increase of glucose, leptin, interleukin-6 levels with reduction of the content of interleukin-4, the level of nitrite-anion in blood serum with its reduction in myocardium were observed. Also in the experiment it was observed the increase of biometrical indices that testifies to the development of obesity.

The quercetin – containing preparations contribute to the reduction of pathological signs which are observed at the experimental diabetes II type with obesity: hyperglycemia, hyperleptinemia and disbalance in the system of interleukins and nitric oxide in blood serum and myocardium.

The liposomal form of quercetinum had more active influence on the state of animals at the given pathology. It had better influenced on the level of glucose, nitrite-anion in blood serum, interleukin-6 and interleukin-4, leptin, on the body weight of animals, body mass index and abdominal circumference.

Key words: diabetes mellitus II type, streptozotocin, obesity, quercetin

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Стечишин І. П., магістр фармації, ПВНЗ «Медичний коледж», буд. 8а, вул. Текстильна, м. Тернопіль, 46024. Тел.: + 38 0 96 75 45 622.
Електронна пошта: irynastechyshyn@gmail.com

УДК 615.252.349.7: 616.36-003.826. 616-018

О. М. Чікіткіна, Н. М. Кононенко, Ю. Б. Лар'яновська

Вплив глікверину на ліпідний обмін та стан печінки щурів на тлі метаболічного синдрому

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: метаболічний синдром, глікверин, кверцетин, воглібоз, метформін, антигіперглікемічна та антиатерогенна дія

Сьогодні однією з актуальних проблем медицини є метаболічний синдром (МС), усі складові якого (інтолерантність до глюкози або цукровий діабет 2 типу (ЦД 2), абдомінальне ожиріння, артеріальна гіпертензія та дисліпідемія) є окремими факторами ризику розвитку серцево-судинних захворювань [1, 2].

Доведено, що провідна роль у формуванні МС належить інсулінорезистентності (ІР). Ступінь вираженості ІР та метаболічних змін корелює з абдомінальним ожирінням, а саме – внутрішньоклітинним накопиченням ліпідів, які порушують передачу сигналу від рецептора інсуліну та знижують інсулінзалежний захват глюкози в клітинах нежирових тканин і, таким чином, стимулюють розвиток ІР та ЦД 2 [3]. Вважають, що ІР виникає, передусім, у печінці й лише потім розвивається в інших органах. Сукупність метаболічних змін у печінці виявляється неалкогольною жировою хворобою печінки (НЖХП) у двох основних формах – стеатозу (жирова дистрофія печінки) та неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) [4].

Для корекції проявів МС застосовується достатньо широкий арсенал препаратів різних фармакологічних груп (антидіабетичні, гіполіпідемічні, антигіпертензивні, дезагрегаційні засоби, та ті, що знижують масу тіла), що призводить до поліпрагмазії та побічних ефектів [5]. Одним з перспективних шляхів вирішення цього питання є зменшення кількості використовуваних препаратів за рахунок створення безпечних лікарських комбінацій, які поєднують різні види фармакологічної дії. У Національному фармацевтичному університеті розроблено новий комбінований протидіабетичний засіб глікверин, складовими компонентами якого є антиоксидант кверцетин та інгібітор α-глюкозидаз воглібоз. У попередніх дослідженнях на моделі ІР, викликаної дексаметазоном у щурів, встановлено виражені антиоксидантні властивості глікверину та його здатність поліпшувати гомеостаз глюкози [6].

Мета дослідження – вивчення впливу глікверину на ліпідний обмін та стан печінки на тлі метаболічного синдрому.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 24 білих нелінійних щурах самцях 18-місячного віку масою 270–300 г. Метаболічний синдром викликали високоцукрозною дієтою (ВЦД), яка забезпечувалася заміщенням питної води 30 % розчином сахарози в поїлках у режимі вільного доступу протягом 8 тижнів. Досліджувані засобі вводили одночасно з розчином сахарози внутрішньошлунково, протягом 8 тижнів. Використовували наступні групи: 1 група – тварини інтактного контролю (ІК); 2 група – тварини контрольної патології, які отримували 30 % розчин сахарози; 3–6 групи – тварини, яким на тлі сахарози вводили глікверин у вигляді суміші кверцетину в дозі 50 мг/кг та воглібозу в дозі 0,03 мг/кг, або препарати порівняння (ПП): субстанцію кверцетину (50 мг/кг) або таблетки метформіну (200 мг/кг) та воглібозу (0,06 мг/кг). Дозу глікверину було отримано в попередніх скринінгових дослідженнях за антигіперглікемічною дією.

Через 8 тижнів проводили тестування стану вуглеводного та ліпідного обміну щурів. Стан вуглеводного гомео-

© Колектив авторів, 2014

стазу оцінювали за рівнем базальної глікемії та внутрішньоочеревинним тестом толерантності до глюкози (ВЧТТГ, глюкоза в дозі 2,5 г/кг). Проби крові для аналізу глюкози відбирали до та через 30, 60, 90 та 120 хв після вуглеводного навантаження. Уміст глюкози в крові визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору «Д-глюкоза», Філісіт-Діагностика (Україна). За результатами ВЧТТГ розраховували інтегральний показник – площу під глікемічними кривими (glicemic area under curve, AUC_{glu} (ммоль·хв/л).

У кінці експерименту тварин знеживлювали шляхом декапітації під ефірним наркозом відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (Страсбург, 1986 р.) [7].

Для біохімічних і гістологічних досліджень отримували кров та вилучали печінку. У сироватці крові визначали показники: уміст холестерину (ХЛ), тригліцеридів (ТГ), ліпопротеїдів низької та високої щільності (ЛПНЩ, ЛПВЩ), з використанням стандартних біохімічних наборів вітчизняного виробництва [8]. Виразність цитолітичних процесів оцінювали за активністю в сироватці крові маркерних ферментів аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) за методом Райтмана-Френкеля, у печінці визначали вміст глікогену [8]. Для проведення гістологічного аналізу структури печінки зразки тканин фіксували в 10 % розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності, заливали в целоїдин-парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Для виявлення глікогену на зрізах печінки проводили ШІК-реакцію. Для виявлення нейтральних жирів фіксовані в формаліні зразки печінки різали на мікротомі, що заморожує, та фарбували суданом IV [9]. Перегляд мікропрепаратів проводили під світловим мікроскопом Granum, фотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum ДСМ 310. Фотознімки обробляли за допомогою програми Toup View.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням параметричних (критерій Н'юмена-Кейлса) і непараметричних (критерій Вілкоксона-Мана-Уїтні) методів варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica, v. 6,0». Показник AUC_{glu} розраховували з використанням статистичних програм «MedCalk, v. 9.3.7.0». Відмінності між контрольними та дослідними групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що рівень базальної глікемії в групі тварин, яких протягом 8 тижнів утримували на ВЦД, не відрізнявся від значень інтактного контролю (ІК). Проте результати ВЧТТГ свідчать про розвиток інтолерантності до вуглеводів у щурів з групи КП внаслідок надмірного вживання вуглеводів (таблиця). Інтегральний показник глікемії AUC_{glu} у тварин КП у 1,6 разу перевищував відповідний показник у тварин ІК (таблиця).

У печінці реєстрували зниження рівня глікогену, що свідчить про активацію процесів глікогенолізу та глюконеогенезу внаслідок погіршення утилізації глюкози та опосередковано – на розвиток печінкової ІР (таблиця).

Дослідження ліпідного профілю в тварин, яких утримували на ВЦД, показало достовірне підвищення рівня тригліцеридів у 2,4 разу, холестерину – 2,6 разу та ЛПНЩ – майже в 2,0 разу порівняно з ІК. Уміст ХС-ЛПВЩ виявляв невиразну тенденцію до підвищення. Накопичення тригліцеридів у сироватці крові щурів з групи КП свідчить про активацію ліполізу в жировій тканині, порушення утилізації ліпідів у печінці та опосередковано – про розвиток печінкової ІР [10, 11] (таблиця). Підвищення рівня холестерину та ЛПНЩ поряд з не зміненим рівнем ХС-ЛПВЩ вказує на розвиток процесів атерогенезу в щурів з ВЦД.

Печінці належить провідна роль з утилізації надлишків вуглеводів та жирів. За умов надмірного надходження вуглеводів в організм щурів відбувається виснаження фізіологічного резерву печінки, на що вказує підвищення активності цитолітичних

ферментів АлАт та АсАт у сироватці крові (таблиця). Крім того, підвищення активності АлАт за умов МС та ЦД 2 вважають предиктором розвитку ІР [12], що підтверджує наявність зниженої чутливості до інсуліну тканин печінки.

Отже, утримання щурів на ВЦД призводило до розвитку інтолерантності до глюкози, зниження чутливості печінки до дії інсуліну, змін ліпідного профілю та розвитку запального процесу в печінці. Саме такий комплекс порушень характерний для МС та початку ЦД 2 [10].

Профілактично-лікувальне введення глікверину суттєво попереджало розвиток метаболічних порушень, викликаних ВЦД. У щурів, які отримували глікверин протягом 8 тижнів, поліпшувалася утилізація глюкози в печінці, про що свідчить підвищення толерантності до вуглеводів: значення AUC_{glu}, розраховані за результатами ВЧТТГ, були достовірно нижчими ніж у тварин з груп КП (таблиця). Статистичний аналіз також показав вірогідну перевагу глікверину над препаратами порівняння воглібозом і метформіном щодо відновлення толерантності до вуглеводів (таблиця). Під дією глікверину достовірно щодо значень КП підвищувався вміст глікогену в печінці (таблиця). За здатністю відновлювати глікогенутворювальну функцію печінки досліджуваний комбінований засіб достовірно переважав ефект його окремих складових компонентів – кверцетину та воглібозу та діяв на рівні метформіну. Отже, глікверин чинить виражену профілактичну дію щодо розвитку ІР, викликаної тривалим вживанням надлишкової кількості вуглеводів.

Не менш важливою й актуальною, ніж нормалізація вуглеводного обміну, є корекція дисліпідемічних порушень, які визначають високий атерогенний потенціал

Таблиця

Біохімічні показники сироватки крові щурів за умов метаболічного синдрому та впливу глікверину, M ± m

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія (метаболічний синдром)	Метаболічний синдром + Глікверин, 50 мг/кг	Метаболічний синдром + Кверцетин, 50 мг/кг	Метаболічний синдром + Воглібоз 0,06 мг/кг	Метаболічний синдром + Метформін, 200 мг/кг
AUC_{glu}, ммоль•хв/л	783,62 ± 19,79	1290,24 ± 55,02*	733,65 ± 15,32**/#/•	768,21 ± 29,44**	900,21 ± 40,43**	848,83 ± 43,33**
Глікоген, мг/100 г тканини	2414,42 ± 283,26	1200,72 ± 149,25*	2828,44 ± 374,70**/#	2321,01 ± 264,78**	1850,72 ± 237,47**	2734,02 ± 339,19**/#
АсАТ, ммоль/(год•л)	0,67 ± 0,01	0,92 ± 0,04*	0,63 ± 0,03**/#	0,72 ± 0,02**	0,77 ± 0,01**	0,72 ± 0,04**
АлАТ, ммоль/(год•л)	0,51 ± 0,02	0,71 ± 0,02*	0,43 ± 0,01**/#	0,46 ± 0,02**/#	0,57 ± 0,02	0,49 ± 0,03**
Холестерин, ммоль/л	0,82 ± 0,04	2,17 ± 0,13*	0,97 ± 0,12**/•	1,11 ± 0,12**/•	1,16 ± 0,12**/•	1,91 ± 0,13*
ХС-ЛПВЩ, ммоль/л	0,71 ± 0,05	0,92 ± 0,11	0,64 ± 0,03**	0,77 ± 0,05	0,69 ± 0,07	0,65 ± 0,02**
ЛПНЩ, г/л	6,79 ± 0,52	12,98 ± 0,35*	6,70 ± 0,33**	6,13 ± 0,56**	7,74 ± 0,36**	6,71 ± 0,53**
ТГ, ммоль/л	1,25 ± 0,10	2,96 ± 0,25*	1,18 ± 0,12**	1,51 ± 0,05**	1,65 ± 0,10**	1,48 ± 0,10**

*Примітка. *Відмінності достовірні щодо групи інтактного контролю, $p < 0,05$, **відмінності достовірні щодо групи контрольної патології, $p < 0,05$, #відмінності достовірні щодо групи воглібозу, $p < 0,05$, • відмінності достовірні щодо групи метформіну, $p < 0,05$.*

МС [13]. Результати дослідження ліпідного обміну в щурів, що отримували глікверин, показали відновлення ліпідного профілю в тварин: у сироватці крові спостерігали достовірне зниження вмісту холестерину, ЛПНЩ та ТГ до рівня інтактних тварин (таблиця). Уміст ХС-ЛПВЩ також відповідав значенням інтактних тварин (таблиця).

Встановлена позитивна динаміка вищезазначених показників ліпідного обміну в групі тварин, що отримували глікверин, свідчить про виразну гіполіпідемічну, гіпохолестеринемічну дію і, опосередковано – про підвищення чутливості до інсуліну тканини печінки під впливом нового комбінованого засобу. За впливом на окремі показники ліпідного обміну глікверин не поступається препаратам порівняння, але переважає метформін за здатністю нормалізувати рівень холестерину.

Отримані результати доводять, що комбінований засіб глікверин найкраще коригує дисліпідемічні порушення при метаболічному синдромі на відміну від кверцетину, воглібозу та метформіну, під впливом яких у даному дослідженні та за результатами інших авторів статистично значуще нормалізуються лише окремі показники ліпідного обміну [14–16]. Крім того, виявлена гіполіпідемічна та гіпохолестеринемічна дія окремих складових комбінованого засобу – кверцетину та воглібозу не тільки зберігається, а й посилюється, тобто завдяки поєднанню двох засобів з різними механізмами дії відбувається синергізм фармакологічної дії глікверину.

Застосування глікверину також сприяло зниженню цитолітичних процесів у печінці, які відбуваються внаслідок запальної реакції на тлі тривалої жирової інфільтрації [17]. Відповідно до отриманих даних (таблиця), активність АлАТ у сироватці крові тварин, які отримували глікверин, достовірно знизилася в 1,7 разу порівняно з контрольною патологією, активність АсАТ – у 1,5 разу. Подібні позитивні зміни в сироватці крові також викликали кверцетин та метформін. У той самий час воглібоз не чинив суттєвого впливу на активність цитолітичних ферментів і достовірно поступався глікверину та кверцетину за здатністю знижувати цитоліз гепатоцитів. Зменшення запальної реакції в печінці під дією глікверину, імовірно, більшою мірою зумовлено наявністю в складі комбінованого засобу кверцетину, який, на відміну від воглібозу, має потужні антиоксидантні властивості [18].

Таким чином, на моделі МС, викликаного ВЦД у щурів глікверин виявив здатність підвищувати толерантність до вуглеводів, гіполіпідемічну та гіпохолестеринемічну дію, за виразністю якої перевершував власні складові компоненти та метформін.

Ефективність глікверину підтверджувалася гістологічними та гістохімічними дослідженнями тканини печінки. Дослідження мікропрепаратів тканини печінки щурів з групи ІК показало, що гістоструктура органу відповідала фізіологічній нормі. Часточковий малюнок тканини – не виразний. Печінкові часточки складалися з тяжів гепатоцитів, які мали доволі чітку радіальну спрямованість. Зони тріад – вузькі.

Стан епітелію кровоносних судин у тріадах та інших судинах – у межах норми. Внутрішньочасточкові синусоїдальні гемокапіляри – помірно розширені, вони містили помірну кількість лімфоїдних клітин. Клітини Купфера (зоряні ретикулоендотеліоцити) – звичайні. Гепатоцити мали характерну форму та розмір, цитоплазма була рівномірно профарбованою, оптично щільною, не містила включень, які були б видні при світловій мікроскопії. Ядра гепатоцитів – нормохромні, центрально розташовані, містили один, іноді два ядерця. Пул двоядерних клітин – достатній (рис. 1, а). ШІК-реакція показала, що цитоплазма гепатоцитів рівномірно та щільно заповнена дрібними гранулами глікогену, фарбування суданом не виявило накопичення жиру в клітинах (рис. 1, б, в).

У щурів, яких утримували на ВЦД, цитоплазма багатьох гепатоцитів ставала оптично пустою: або не фарбувалася, або дуже слабко фарбувалася еозином. Локалізація таких гепатоцитів та виразність ознак у різних щурів

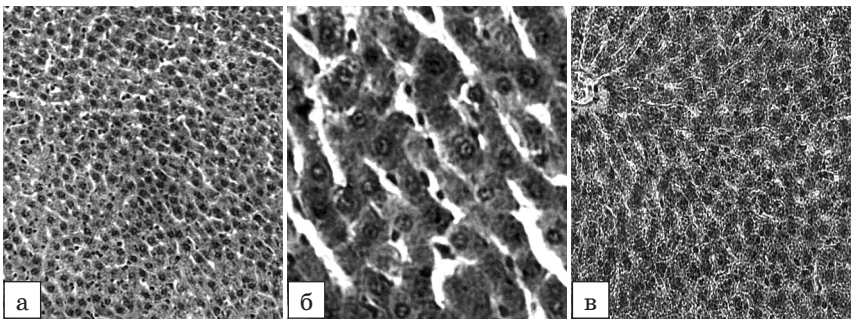

Рис. 1. Печінка інтактних щурів. а – нормальна морфологічна будова тканини. Гематоксилін-еозин. ×200; б – рівномірне заповнення цитоплазми гепатоцитів гранулами глікогену (ШІК-реакція за Мак Манусом); в – відсутність накопичення жиру в клітинах (заморожений зріз. Судан IV). ×250.

варіювала. У одних – зміни зачіпали гепатоцити переважно перипортальних зон, в інших – зміни були більш дифузні або, навпаки, вогнищеві (рис. 2 а, б). У всіх таких зонах радіальна спрямованість тяжів клітин не простежувалася, клітинні межі були нечіткі. Доволі часто в зоні тріад є виразно збільшена клітинна інфільтрація.

При постановці ШІК-реакції в печінці щурів, яких утримували на ВЦД, знайдено значне зменшення насиченості глікогеном клітин або його відсутність. У візуально неушкоджених гепатоцитах також доволі часто спостерігали зменшення насиченості цитоплазми глікогеном, полярність у його розподілі (рис. 2 в, г).

Як було вже зазначено, в основі МС лежить ІР, ключовими механізмами реалізації якої є підвищення ліполізу вісцерального жиру та вивільнення великої кількості вільних жирних кислот (ВЖК). Підвищення окиснення ВЖК у печінці призводить до активації глюконеогенезу, а інсулінорезистентність гепатоцитів – до зниження поглинання глюкози. Постійна підвищена продукція глюкози печінкою, відносний дефіцит інсуліну, підвищення рівня ВЖК та ліпідів повільно призводить до змін паренхіми печінки за типом жирової інфільтрації [4]. Фарбування суданом IV виявило виразне накопичення жиру в цитоплазмі багатьох клітин печінки тварин з групи КП (рис. 2 д).

У 80% щурів, яким на тлі ВЦД вводили глікверин, морфологічна будова печінкової паренхіми відповідала фізіологічній нормі. Цитоплазма гепатоцитів добре фарбувалася еозином. ШІК-реакція показала, що гранули глікогену рівномірно заповнювали цитоплазму клітин у різних зонах часточок, насиченість забарвлення була високою. Забарвлення суданом не виявило жирових включень у клітинах (рис. 3 а, б, в). У решти 20 % щурів частина гепатоцитів містила в цитоплазмі жир, але вони не були переобтяжені ним. Навіть на таких ділянках не всі клітини були

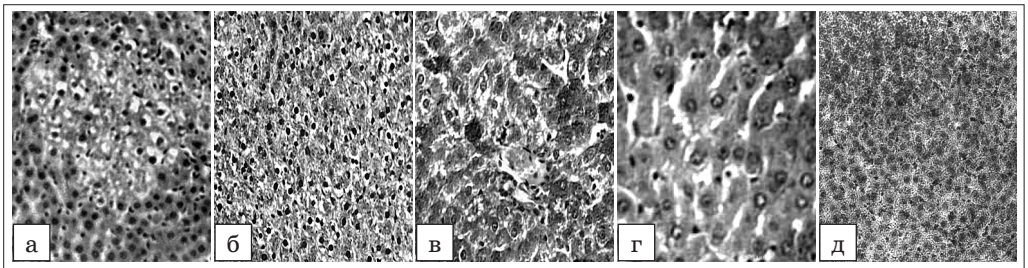

Рис. 2. Печінка щурів з метаболічним синдромом. Різна локалізація гепатоцитів з оптично пустою цитоплазмою: а – вогнищева; б – дифузна. Гематоксилін-еозин. ×200. Зменшення вмісту глікогену: в – у оптично пустих гепатоцитах (×200); г – у візуально неушкоджених (×250). ШІК-реакція за Мак Манусом: д – накопичення жиру в цитоплазмі гепатоцитів. Заморожений зріз. Судан IV. ×200.

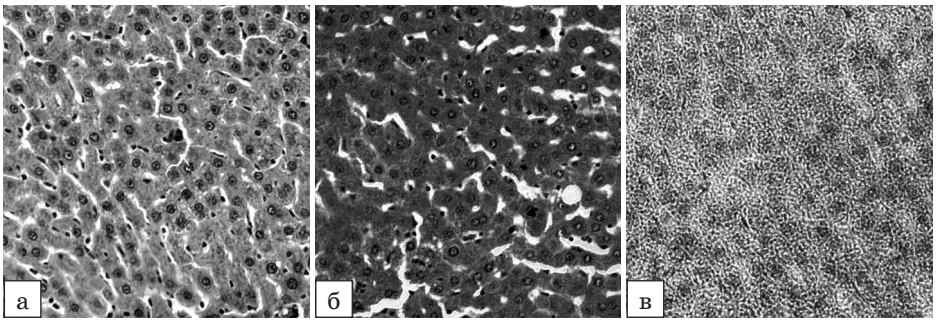

Рис. 3. Печінка щурів, яким на тлі метаболічного синдрому вводили гліквeрин: а – морфологічна будова не змінена. Гематоксилін-еозин. ×200; б – нормальний вміст глікогену в більшості клітин (ШІК-реакція за Мак-Манусом. ×200; в – жир у цитоплазмі окремих гепатоцитів (заморожений зріз. Судан IV. ×100).

збіднені на глікоген. У цілому вміст глікогену в гепатоцитах – задовільний.

У більшості щурів, яким на тлі ВЦД уводили препарат порівняння метформін, було видно різні за розміром ділянки печінкової паренхіми з оптично пустою цитоплазмою клітин (деякі за виразністю на рівні контрольної патології), збіднені глікогеном та насичені жиром (рис. 4 а, б, в). Насиченість глікогеном гепатоцитів за ділянками з оптично пустими клітинами варіювала – зони з нормальним накопиченням його чергувалися з зонами зі збідненим умістом цього вуглеводу.

Таким чином, надмірне надходження вуглеводів в організм щурів призводило до виснаження запасів глікогену та накопичення жиру в клітинах печінкової паренхіми, що свідчить про стимуляцію ліпогенезу та розвиток стеатогепатозу, та в поєднанні з біохімічними даними підтверджує наявність печінкової інсулінорезистенотності в тварин з ВЦД. У печінці більшості щурів, яким вводили гліквeрин, були зменшені ознаки виснаження пулу глікогену та інтенсивності накопичення нейтральних жирів, що вказує на пригнічення процесів ліпогенезу під дією комбінованого засобу. За виразністю протекторної дії на стан печінкової паренхіми щурів гліквeрин перевершував препарат порівняння метформін.

Висновки

1. За умов експериментального МС, викликаного ВЦД, у щурів розвивається інтолерантність до глюкози, погіршення чутливості периферичних тканин до дії інсуліну, порушення ліпідного обміну та запальний процес у печінці. Визначені біохімічні зміни підтверджуються на гістологічному рівні та характеризуються виснаженням запасів глікогену і накопиченням жиру в гепатоцитах, що опосередковано свідчить про розвиток печінкової інсулінрезистентності та ліпогенезу.

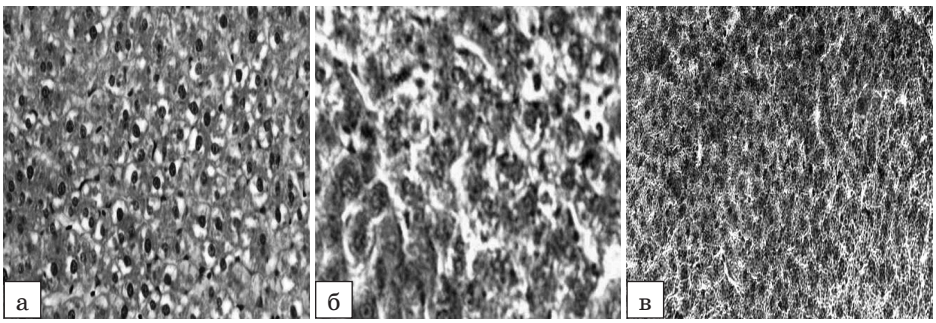

Рис. 4. Печінка щурів, які на тлі метаболічного синдрому отримували метформін: а – гепатоцити з оптично пустою цитоплазмою (Гематоксилін-еозин); б – відсутність глікогену в клітинах або зменшення та полярність його розташування (ШІК-реакція за Мак Манусом); в – жир у цитоплазмі клітин (Судан IV. ×200).

2. Унаслідок підвищення толерантності до вуглеводів, зниження атерогенних та цитолітичних процесів під впливом нового комбінованого засобу глікверину відбувалася нормалізація вуглеводного та ліпідного обмінів у щурів.

3. За виразністю гіполіпідемічної та гіпохолестеринемічної дії глікверин перевершував власні складові компоненти – кверцетин і воглібоз та протидіабетичний засіб метформін.

4. Під впливом глікверину зберігалася морфологічна будова печінкової паренхіми, глікогенутворювальна функція та процеси ліпогенезу. За виразністю протекторної дії на стан печінкової паренхіми щурів глікверин перевершує препарат порівняння метформін.

5. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого фармакологічного дослідження нового комбінованого засобу глікверин.

1. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness / J. A. Shin, J. H. Lee, S. Y. Lim [et al.] // Diabetes Investig. – 2013. – № 4 (4). – P. 334–343.
2. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study / A. M. McNeill, W. D. Rosamond, C. J. Girman [et al.] // Diabetes Care. – 2005. – V. 28. – P. 385–390.
3. *Matsuzawa Y.* The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecularmechanism / Y. Matsuzawa, T. Funahashi, T. Nakamura // J. Atheroscler Thromb. – 2011. – № 18 (8). – P. 629–39.
4. *Dyson J. K.* Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment / J. K. Dyson, Q. M. Anstee, S. McPherson // Frontline Gastroenterol. – 2014. – № 5 (4). – P. 277–286.
5. *Ганцгорн Е. В.* Полипрагмазия как актуальная проблема фармакотерапии больных сахарным диабетом типа 2 в условиях стационара / Е. В. Ганцгорн, А. Н. Алексеев // Молодой ученый. – 2014. – № 4. – С. 343–346.
6. *Кононенко Н. Н.* Гипогликемические свойства нового комбинированного средства гликверина на модели инсулинорезистентности / Н. Н. Кононенко, О. М. Харченко // Медицинские новости, Беларусь. – 2013. – № 11. – С. 74–77.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg : Council of Europe, 1986. – 53 p.
8. *Камышников В. С.* Справочник по клиническо-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. – Минск : Беларусь. – Т. 1. – 2002. – 495 с.; Т. 2. – 2003. – 463 с.
9. *Меркулов Г. А.* Курс патологогистологической техники. – М. : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
10. *Загайко А. Л.* Метаболічний синдром: мезанізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко. – Х. : Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2007. – 216 с.
11. *DeFronzo R. A.* From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for he treatment of type 2 diabetes mellitus / R. A. Defronzo // Diabetes. – 2009. – V. 58, № 4. – P. 773–795.
12. *Hanley Anthony J. G.* Hanley alanine aminotransferase and directly measured insulin sensitivity in a the insulin resistance atherosclerosis study / Anthony J. G. Hanley, Lynne E. Wagenknecht, Andreas Festa // Diabetes Care. – 2007. – V. 30. – P. 1819–1827.
13. *Boudewijn K.* Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets / K. Boudewijn, Jan Willem F. E., Manuel Castro Cabezas // Nutrients. – 2013. – № 5 (4). – P. 1218–1240.
14. Органопротекторные возможности комбинированной антигипертензивной терапии у пациентов с метаболическим синдромом / В. А. Моисеенко, Т. Г. Осташевская, С. Г. Шевчук [и др.] // Український медичний часопис. – 2014. – № 2 (100). – С. 117–118.
15. Effect of alpha-glucosidase inhibitors on the progression of carotid intima-media thickness: a meta-analysis of randomized controlled trials / D. F. Geng, D. M. Jin, W. Wu [et al.] // Atherosclerosis. – 2011. – V. 218 (1). – P. 214–219.
16. *Карпов Ю. А.* Метформин как средство патогенетической терапии больных с метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа / Ю. А. Карпов, А. Т. Шубина // Практикующему эндокринологу. – 2012. – № 1 (41). – С. 35–38.
17. *Буторова Л. И.* Возможности использования Легалона® при неалкогольной жировой болезни печени / Л. И. Буторова, Т. А. Цибизова, А. В. Калинин // Экспериментальная и клиническая гастроентерология. –2010. – № 05. – С. 85–91.
18. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice / M. M. Alam, D. Meerza, I. Naseem // Life Sci. – 2014. – № 109 (1). – P. 8–14.

О. М. Чікіткіна, Н. М. Кононенко, Ю. Б.Лар'яновська

Вплив глікверину на ліпідний обмін та стан печінки щурів на тлі метаболічного синдрому

Актуальною проблемою сучасної медицини є метаболічний синдром (МС), компоненти якого – це фактори ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Корекція проявів МС, зазвичай, супроводжується поліпрагмазією та низкою побічних ефектів, що свідчить про актуальність створення безпечних лікарських комбінацій, які поєднують різні види фармакологічної дії. В НФаУ розроблено новий комбінований протидіабетичний засіб глікверин, складовими компонентами якого є антиоксидант кверцетин та інгібітор α-глюкозидаз воглібоз.

Мета дослідження – вивчення впливу глікверину на ліпідний обмін та стан печінки на тлі метаболічного синдрому, викликаного високоцукрозною дієтою

Встановлено, що глікверин при профілактично-лікувальному введенні поліпшував толерантність до вуглеводів й достовірно переважав відомі протидіабетичні засоби воглібоз та метфомін. За здатністю відновлювати глікогенутворювальну функцію печінки глікверин діяв на рівні метформіну, переважав препарати порівняння кверцетин та воглібоз. Результати дослідження ліпідного обміну в сироватці крові показали, що глікверин найкраще коригує дисліпідемічні порушення при метаболічному синдромі на відміну від кверцетину, воглібозу та метформіну, під впливом яких статистично значуще нормалізувалися лише окремі показники ліпідного профілю. Завдяки наявності в складі досліджуваного комбінованого засобу антиоксиданту кверцетину достовірно знижувалася активність запалення в печінці. Виразна ефективність глікверину підтверджувалася гістологічними та гістохімічними дослідженнями тканини печінки: зберігалася морфологічна будова печінкової паренхіми, зменшувалися ознаки виснаження пулу глікогену та пригнічувалися процеси ліпогенезу. За виразністю протекторної дії на стан печінкової паренхіми щурів глікверин перевершував препарат порівняння метформін.

Таким чином, виявлені фармакологічні властивості глікверину за умов метаболічного синдрому свідчать про його переваги, які реалізуються за рахунок синергізму фармакологічної дії його складових компонентів – кверцетину та воглібозу.

Отримані результати обґрунтовують перспективність подальшого фармакологічного дослідження нового комбінованого засобу глікверин як потенційного засобу для корекції проявів порушень при МС.

Ключові слова: метаболічний синдром, глікверин, кверцетин, воглібоз, метформін, антигіперглікемічна та антиатерогенна дія

О. М. Чикиткина, Н. Н. Кононенко, Ю. Б. Ларьяновская

Влияние гликверина на липидный обмен и состояние печени крыс на фоне метаболического синдрома

Актуальной проблемой современной медицины является метаболический синдром (МС), компоненты которого – это факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Коррекция проявлений МС, как правило, сопровождается полипрагмазией и рядом побочных эффектов, что свидетельствует об актуальности создания безопасных лекарственных комбинаций, сочетающих различные виды фармакологического действия. В НФаУ разработано новое комбинированное противодиабетическое средство гликверин. Составными компонентами гликверина являются антиоксидант кверцетин и ингибитор α-глюкозидаз воглибоз.

Цель исследования – изучение влияния гликверина на липидный обмен и состояние печени на фоне метаболического синдрома, вызванного высокосахарозной диетой.

Установлено, что гликверин при профилактическо-лечебном введении улучшал толерантность к углеводам и достоверно превышал известные противодиабетические средства воглибоз и метформин. По способности восстанавливать гликогенобразующую функцию печени гликверин действовал на уровне метформина и превышал препараты сравнения кверцетин и воглибоз. Результаты исследования липидного обмена в сыворотке крови показали, что гликверин лучше всего корректирует дислипидемические нарушения при метаболическом синдроме в отличие от кверцетина, воглибоза и метформина, под влиянием которых статистически значимо нормализовались только некоторые показатели липидного профиля. Благодаря наличию в составе исследуемого комбинированного средства антиоксиданта кверцетина, достоверно снижалась активность воспаления в печени. Выраженная эффективность гликверина подтверждалась гистологическими и гистохимическими исследованиями ткани печени: сохранялось морфологическое строение печеночной паренхимы, уменьшались признаки истощения пула гликогена и угнетались процессы липогенеза. По выраженности протекторного действия на состояние печеночной паренхимы крыс гликверин превосходил препарат сравнения метформин.

Таким образом, установленные фармакологические свойства гликверина в условиях метаболического синдрома свидетельствуют о его преимуществах, которые реализуются за счет синергизма фармакологического действия его составных компонентов – кверцетина и воглибоза.

Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего фармакологического исследования нового комбинированного средства гликверина в качестве потенциального препарата для коррекции проявлений нарушений при МС.

Ключевые слова: метаболический синдром, гликверин, кверцетин, воглибоз, метформин, антигипергликемическое и антиатерогенное действие

O. M. Chikitkina, N. N. Kononenko, Y. B. Laryanovskaya

The influence of glikverin on lipid metabolism and the condition of rat liver under metabolic syndrome

Actual problem of modern medicine is the metabolic syndrome whose components are separate risk factors for cardiovascular diseases. Correction of metabolic syndrome manifestation, usually accompanied by polypragmasy and a number of side effects, which indicate the relevance of creating a safe drug combinations that would combine different types of pharmacological action. A new combined antidiabetic agent glikverin was developed in National University of Pharmacy. Components of glikverin are the antioxidant quercetin and α-glucosidase inhibitor voglibose.

The purpose of this study was to investigate the influence of glikverina on lipid metabolism and condition of the rat liver under metabolic syndrome induced by high sucrose diet that was provided by substitution of drinking water to 30% sucrose solution.

It was found that while preventive and treatment administration of glikverin it improved tolerance to carbohydrates and significantly exceeded known antidiabetic agents voglibose and metformin. By the ability to restore glikogen generating liver function glikverin acted at the level of metformin and also exceeded than the reference drugs quercetin and voglibose. Results of the study of lipid metabolism in blood serum showed that glikverin best adjusts dyslipidemic disorders in metabolic syndrome as opposed to quercetin, voglibose and metformin, under whose influence, in this study and from results of other authors, statistically significant normalized only some indices of lipid profile. Due to the presence in a test compound antioxidant quercetin it possesses ability to reduce inflammation in the liver. Severe efficiency of glikverin was confirmed by histological and histochemical study of liver tissue: morphological structure of hepatic parenchyma was preserved, the signs of depletion of glycogen pool reduced andprocesses of lipogenes was oppressed. Glikverin superiored reference drug metformin by intensity of protective effect on the state of the liver parenchyma in rats.

Thus, the pharmacological properties glikverina established under metabolic syndrome demonstrate its benefits which are being realized through the synergistic pharmacological actions of its components - quercetin and voglibose.

The results obtained confirm the prospect of further pharmacological studies of new combined agent glikverin as a potential tool for correction of manifestations of metabolic syndrome.

Key words: metabolic syndrome, glikverin, quercetin, voglibose, metformin antihyperglycemic and anti-atherogenic effect

Надійшла: 26.11.2014 р.

Контактна особа: Чікіткіна Ольга Михайлівна, аспірант, кафедра патологічної фізіології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61002. Тел.:+ 38 057 706 30 66. Електронна пошта: chikitkina.valentina@mail.ru.

УДК 615.324:577.112.6]:616.61-008.64-085

Т. С. Щудрова, І. І. Заморський

Порівняльна оцінка нефропротекторної активності органоспецифічних пептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Ключові слова: нефропротекція, пептиди, гентаміцинова нефропатія

Аміноглікозиди є потужними бактерицидними антибіотиками, що широко використовуються для лікування інфекцій, викликаних грамнегативними мікроорганізмами [1, 2]. Можливість розвитку нефро- та ототоксичності є серйозним обмеженням до використання аміноглікозидів у клінічній практиці, що часто вимагає припинення їхнього застосування, адже в 30 % пацієнтів при використанні протягом 7 днів і більше з'являються ознаки ураження [3]. Центральною ланкою механізму формування гентаміцинової нефротоксичності є тубулярний ефект, зумовлений частковою його реабсорбцією в проксимальних канальцях з наступною дестабілізацією мембран лізосом та ендоплазматичного ретикулуму, що призводить до вивільнення протеаз та пригнічення синтезу білка. «Цитозольний» гентаміцин прямо та опосередковано атакує мітохондрії, пригнічує клітинне дихання та продукцію АТФ, провокує розвиток оксидативного стресу, що призводить до активації апоптозу [2, 4]. Гістологічно токсичність гентаміцину асоціюється з індукцією тубулярного некрозу, епітеліального набряку проксимальних канальців, клітинної десквамації, гломерулярного застою, периваскулярного набряку та запалення [5].

З огляду на прогресуючий розвиток резистентності до значної кількості антибіотиків інших класів, аміноглікозиди залишаються актуальними препаратами, тому стратегія зменшення їхньої токсичності є обґрунтованим напрямом досліджень.

© Колектив авторів, 2014

Органоспецифічні олігопептиди розроблені в Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології (РФ) на основі вивчення амінокислотного складу поліпептидних фракцій різних органів. Для дослідження було обрано трипептиди нирок AED та EDL, а також тетрапептид епіфіза AEDG. Згідно із результатами останніх досліджень, ниркові пептиди стимулюють ріст органотипових культур клітин нирок тварин, регулюють експресію маркерів клітинного оновлення та апоптозу, мають регуляторні властивості та тканиноспецифічну дію [6, 7]. Системні ефекти органоспецифічних пептидів включають покращання енергетичного забезпечення тканин, модуляцію антиоксидантного захисту та імунологічного стану організму [8].

Мета дослідження – вивчення та порівняння нефропротекторних ефектів обраних пептидів за умов розвитку гентаміцинової нефропатії в щурів.

Матеріали та методи. Досліди проведено на 35 статевозрілих нелінійних білих щурах масою 150–200 г, які знаходилися в умовах віварію з підтриманням постійної температури та вологості, вільним доступом до води та їжі. Тварин було розподілено на 5 груп (n = 7): I група – інтактний контроль, II група – гентаміцинова нефропатія, яку відтворювали внутрішньом'язовим введенням щурам 4 % розчину гентаміцину сульфату (АТ «Галичфарм») у дозі 80 мг/кг один раз на одну добу протягом шести днів [9]. Тваринам III–V груп через 40 хв після кожної ін'єкції гентаміцину внутрішньоочеревинно вводили пептид EDL (3 мкг/кг), пептид AED (3 мкг/кг) та пептид AEDG (7 мкг/кг) відповідно. Функціональний стан нирок щурів оцінювали на 7 добу за умов водного наван-

таження (ентеральне введення питної води в об'ємі 5 % від маси тіла) за показниками швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), екскреції білка, іонів натрію та калію з сечею [9]. Евтаназію тварин виконували під тіопенталовим наркозом (80 мг/кг). Усі дослідження здійснено відповідно до Директиви Європейського союзу про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010 р.). Стан пероксидації ліпідів у нирках оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) та окисно-модифікованих білків (ОМБ), системи антиоксидантного захисту – за активністю каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГП) [10]. Для морфологічної оцінки гістологічних зрізів зразки забарвлювали гематоксиліном і еозином. При мікроскопії використовували такі параметри об'єктива та окуляра – Об. 10х, Ок. 10х. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Характер розподілу визначали за допомогою критерію Колмогорова-Смирнова. Достовірність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Критичний рівень значення був прийнятий за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Застосування гентаміцину протягом 6 днів призвело до порушення морфофункціонального стану нирок з розвитком токсичної нефропатії, яка проявлялася зниженням ШКФ на 73,3 % та розвитком вираженої протеїнурії, що перевищувала контрольні значення на 88,2 % (табл. 1). Застосування трипептиду EDL призвело до зростання ШКФ на 65 %, тетрапептиду AEDG – 70 % ($p < 0,01$), у той час як використання трипептиду AED не викликало достовірного збільшення показника. Усі пептиди достовірно знижували екскрецію білка з сечею: пептиди EDL та AEDG – на 83 % ($p < 0,01$), AED – на 43 % ($p < 0,05$). Токсичне ураження проксимальних канальців нирок призвело до порушення реабсорбційної функції, що зумовило значну втрату іонів із сечею: екскреція натрію зросла на 67,6 %, калію – на 78,8 %. Застосування пептидів достатньою мірою компенсувало дані порушення, що проявлялося в зменшенні екскреції іонів натрію на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) та 85,4 % (AEDG), у калійзберігаючій дії – зменшенні екскреції іона на 56,4 % та 48,2 % при застосуванні EDL та AEDG відповідно порівняно з групою нелікованих тварин з нефропатією.

Як відомо, токсичне ураження нирок супроводжується розвитком локального оксидативного стресу, що є важливою патогенетичною ланкою розвитку та прогресування патології. Тому для

Таблиця 1

Функціональний стан нирок щурів при застосуванні олігопептидів на тлі розвитку гентаміцинової нефропатії, M ± SD

Показник	Контроль	Гентаміцинова нефропатія	Гентаміцин + EDL	Гентаміцин + AED	Гентаміцин + AEDG
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв	470,8 ± 52,9	125,6 ± 29,7 $p_1 \le 0,01$	358,6 ± 63,5 $p_2 \le 0,01$	218,5 ± 52,9	411,8 ± 42,3 $p_2 \le 0,01$
Екскреція білка, мг/100 мкл	0,022 ± 0,010	0,186 ± 0,020 $p_1 \le 0,01$	0,032 ± 0,003 $p_2 \le 0,01$	0,106 ± 0,020 $p_2 \le 0,05$	0,032 ± 0,110 $p_2 \le 0,01$
Екскреція Na^+, мкмоль/100 мкл	0,80 ± 0,14	6,02 ± 0,48 $p_1 \le 0,01$	1,08 ± 0,25 $p_2 \le 0,01$	2,50 ± 0,65 $p_2 \le 0,01$	0,88 ± 0,13 $p_2 \le 0,01$
Екскреція K^+, мкмоль/100 мкл	6,89 ± 0,66	32,47 ± 8,49 $p_1 \le 0,01$	14,16 ± 1,75 $p_2 \le 0,01$	25,43 ± 4,01	16,82 ± 2,61 $p_2 \le 0,01$

Примітка. Тут і в табл. 2: p_1 – показник достовірності різниці з групою контролю; p_2 – показник достовірності різниці з групою гентаміцинової нефропатії.

оцінки захисної дії препаратів необхідно встановити характер їхнього впливу на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в ураженому органі. Курсове введення гентаміцину призвело до посилення процесів пероксидації, про що свідчить майже дворазове зростання вмісту МДА та ОМБ у тканині нирок, що поряд із пригніченням активності ГП у 2,8 разу та КАТ у 2,2 разу вказує на порушення цієї рівноваги (табл. 2). Виражене пригнічення вільнорадикального окиснення спостерігалося як при застосуванні пептиду EDL, який зменшував уміст МДА у 1,7 разу, ОМБ у 1,6 разу порівняно із групою патології, так і при застосуванні AEDG, який зменшував дані показники в 1,3 та 1,6 разу відповідно. Трипептид AED зменшував уміст МДА у 1,2 разу, ОМБ у 1,3 разу. У всіх групах лікованих тварин спостерігали зростання активності ГП у 1,7, 1,3 та 1,5 разу відповідно в III–V групах. Подібну тенденцію спостерігали за впливу олігопептидів на активність КАТ, яка зростала в 1,7 разу в III та V групах тварин, та в 1,5 разу в IV групі.

Для верифікації наявності нефропротекторної активності олігопептидів було проведено морфологічне дослідження з вивчення змін гістоструктури нирок.

Токсична дія гентаміцину характеризується некрозом значної кількості епітеліоцитів звивистих канальців нирок, який охоплює 69,0 ± 2,4 % клітин, решта епітеліоцитів – з ознаками гідропічної вакуолізації, що відображає значний ступінь ушкодження нефронів. Просвіти канальців та збірних трубочок в основному заповнені білковими циліндрами, решта канальців та трубочок – розширені. Спостерігається нерівномірне повнокров'я та набряк клубочків (рис. 1).

На тлі застосування пептиду EDL некротичних змін клітин не виявили, спостерігали зворотне набухання епітеліоцитів проксимальних канальців нирок переважно у вигляді гідропічного набухання з поширеністю на 80,0 ± 1,8 % клітин, клубочки – незмінені (рис. 2).

При застосуванні AED за умов розвитку гентаміцинової нефропатії виявлено обмеження розповсюдження некротичних процесів до 48,0 ± 2,1 % епітеліоцитів канальців нирок, решта епітеліоцитів – з ознаками гідропічної вакуолізації. Просвіти канальців та збірних трубочок розширені та переважно заповнені білковими циліндрами (рис. 3).

Виражений захисний ефект також виявлено при застосуванні пептиду AEDG: за відсутності некрозу спостерігається зворотне гідропічне набухання епітеліоцитів проксимальних канальців нирок з поширеністю на 91,0 ± 1,3 % клітин, набряк клубочків (рис. 4).

Таблиця 2

Показники стану прооксидантно-антиоксидантних процесів у тканині нирок щурів при застосуванні олігопептидів за умов гентаміцинової нефропатії, M ± SD

Показник	Контроль	Гентаміцинова нефропатія	Гентаміцин + EDL	Гентаміцин + AED	Гентаміцин + AEDG
Активність глутатіонпероксидази, нмоль/хв · мг	149,34 ± 2,40	53,59 ± 2,50 $p_1 \le 0,01$	88,51 ± 11,80 $p_2 \le 0,01$	68,32 ± 3,70 $p_2 \le 0,01$	78,48 ± 8,90 $p_2 \le 0,01$
Активність каталази, мкмоль H_2O_2/хв · мг	7,85 ± 0,08	3,65 ± 0,17 $p_1 \le 0,01$	6,34 ± 0,07 $p_2 \le 0,01$	5,38 ± 0,14 $p_2 \le 0,01$	6,11 ± 0,19 $p_2 \le 0,01$
Вміст малонового діальдегіду, мкмоль/г	19,08 ± 1,69	36,85 ± 1,56 $p_1 \le 0,01$	21,68 ± 1,93 $p_2 \le 0,01$	30,29 ± 0,88 $p_2 \le 0,05$	27,33 ± 1,79 $p_2 \le 0,01$
Вміст окисно-модифікованих білків, у.о./мл	9,07 ± 0,38	17,03 ± 0,36 $p_1 \le 0,01$	10,96 ± 0,31 $p_2 \le 0,01$	13,33 ± 0,43 $p_2 \le 0,05$	10,09 ± 0,34 $p_2 \le 0,01$

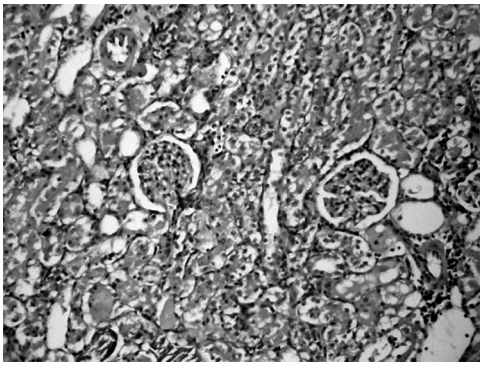

Рис. 1. Препарат нирки щура з гентаміциновою нефропатією. Гематоксилін і еозин, ×100.

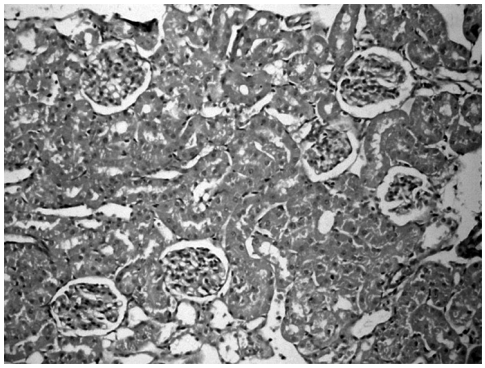

Рис. 2. Препарат нирки щура з гентаміциновою нефропатією, якому вводили EDL. Гематоксилін і еозин, ×100.

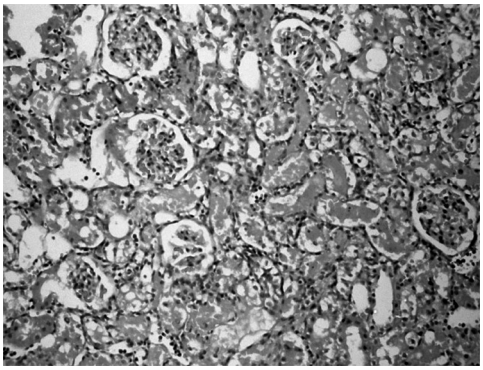

Рис. 3. Препарат нирки щура з гентаміциновою нефропатією, якому вводили AED. Гематоксилін і еозин, ×100.

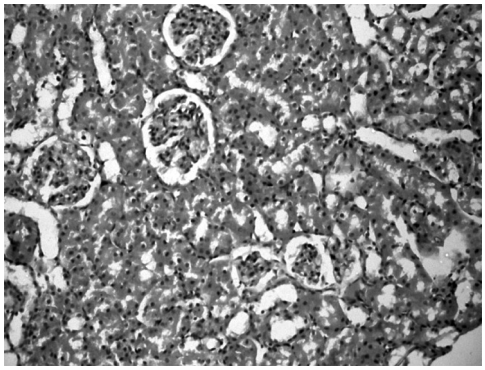

Рис. 4. Препарат нирки щура з гентаміциновою нефропатією, якому вводили AEDG. Гематоксилін і еозин, ×100.

Результати проведеного дослідження вказують на наявність нефропротекторної активності обраних пептидів, яка реалізувалася в покращанні екскреторної функції нирок за рахунок достовірного зростання ШКФ та зменшення екскреції білка, іонів натрію та калію під впливом пептидів EDL та AEDG. Коригуючий вплив обох пептидів був виражений рівною мірою, на що вказує відсутність достовірних міжгрупових відмінностей за критерієм Краскела-Уолліса. Дещо слабший ефект виявлено при застосуванні пептиду AED, який достовірно зменшував тільки показники екскреції білка та іонів натрію. Найвираженіші антиоксидантні властивості встановлені в пептиду EDL, який більшою мірою, порівняно з іншими пептидами, сприяв зменшенню вмісту МДА та збереженню активності ГП у тканині нирок. За впливом на показники активності КАТ та вмісту ОМБ ефективність пептидів EDL та AEDG є рівнозначною, у той час як пептид AED діяв менш виражено.

Висновок

Курсове застосування органоспецифічних пептидів сприяло захисту ниркової тканини від токсичної дії гентаміцину, що проявлялося в покращанні під їхнім впливом функціонального стану нирок, обмеженні процесів пероксидації ліпідів та підвищенні активності ферментів антиоксидантного захисту. Нефропротекторний вплив застосованих олігопептидів підтверджується даними гістологічного дослідження, які корелюють з результатами біохімічних досліджень: введення пептиду AED призвело до обмеження розповсюдженості некротичних та дистрофічних процесів, у той час як при застосуванні пептидів EDL і AEDG некрозу епітеліоцитів не виявлено, патологічні зміни клітин представлені гідропічним набуханням, поширеність якого менш виражена при застосуванні EDL.

1. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the KDIGO clinical practice guidelines on acute kidney injury / D. Fliser, M. Laville [et al.] // Nephrol Dial Transplant. – 2012. – V. 27. – P. 4263–4272.
2. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin / Y. Quiros, L. Vicente-Vicente, A. I. Morales [et al.] // Toxicol Sci. – 2011. – V. 119 (2). – P.245–256.
3. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research / B. H. Ali, M. Al Za'abi, G. Blunden [et al.] // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2011. – V. 109 (4). – P. 225–232.
4. Reno-protective role of flunarizine against gentamicin induced nephrotoxicity in rats / A. Muthuraman, S. Singla, A. Rana [et al.] // Yakugaku Zasshi. – 2011. – V. 131 (3). – P. 437–443.
5. *Balakumar P.* Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? / P. Balakumar, A. Rohilla, A. Thangathirupathi // Pharmacol Res. – 2010. – V. 62 (3). – P. 179–186.
6. Пептиды регулируют экспрессию сигнальных молекул в клеточных культурах почек при старении *in vitro* / В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова, В. О. Полякова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 2. – С. 227–230.
7. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения / В. Х. Хавинсон, А. Ю. Соловьёв, Д. В. Жилинский [и др.] // Успехи геронтологии. – 2012. – Т. 25, № 1. – С. 11–22.
8. *Хавинсон В. Х.* Роль пептидов в эпигенетической регуляции активности генов в онтогенезе / В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин, Б. Ф. Ванюшин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 10. – С. 452–457.
9. Методи експериментального моделювання ураження нирок при фармакологічних дослідженнях / С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець [та ін.]. – К., 2009. – С. 9–10.
10. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М., 2009. – 880 с.

Т. С. Щудрова, І. І. Заморський

Порівняльна оцінка нефропротекторної активності органоспецифічних пептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів

Мета дослідження – вивчення та порівняння нефропротекторних ефектів органоспецифічних олігопептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів.

Комплексний нефропротекторний вплив оцінювали за показниками функціонального стану нирок, прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканині нирок, а також на основі вивчення гістоструктури нирок тварин.

Застосування гентаміцину протягом 6 днів призвело до розвитку олігуричної форми токсичної нефропатії. При введенні EDL швидкість клубочкової фільтрації зросла на 65 %, AEDG – на 70 %. Усі пептиди достовірно знижували екскрецію білка з сечею: пептиди EDL та AEDG – на 83 %, AED – на 43 %. Ураження проксимальних канальців нирок зумовило зростання екскреції натрію та калію із сечею. Застосування пептидів компенсувало дані порушення, що проявлялося в зменшенні екскреції іонів натрію на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) та 85,4 % (AEDG) та калійзберігаючій дії пептидів EDL та AEDG. Під впливом гентаміцину спостерігалося зростання вмісту МДА та ОМБ у тканині нирок та пригнічення активності ГП та КАТ. Пептид EDL зменшував уміст МДА у 1,7 разу, ОМБ – у 1,6 разу, AEDG зменшував дані показники в 1,3 та 1,6 разу, пептид AED – у 1,2 та 1,3 разу відповідно. У всіх групах лікованих тварин спостерігали достовірне зростання активності ГП та КАТ. Токсична дія гентаміцину призвела до некрозу 69,0 ± 2,4 % епітеліоцитів канальців нирок, решта клітин – з ознаками гідропічної вакуолізації, просвіти канальців та збірних трубочок заповнені білковими циліндрами. На тлі застосування пептидів EDL та AEDG некротичних змін клітин не виявлено, гідропічне набухання охоплює 80,0 ± 1,8 % та 91,0 ± 1,3 % клітин відповідно. При застосуванні AED виявлено обмеження розповсюдження некротичних процесів до 48,0 ± 2,1 % епітеліоцитів канальців.

Курсове застосування органоспецифічних пептидів сприяло захисту ниркової тканини від токсичної дії гентаміцину, що проявлялося в покращанні функціонального стану нирок та антиоксидантному ефекті. Нефропротекторний вплив підтверджується даними гістологічного дослідження, з більш вираженим позитивним ефектом пептидів EDL та AEDG.

Ключові слова: нефропротекція, пептиди, гентаміцинова нефропатія

Т. С. Щудрова, И. И. Заморский

Сравнительная оценка нефропротекторной активности органоспецифических пептидов при гентамициновой нефропатии у крыс

Цель исследования – изучение и сравнение нефропротекторных эффектов органоспецифических олигопептидов при гентамициновой нефропатии у крыс.

Нефропротекторное влияние олигопептидов оценивали по комплексу показателей функционального состояния почек, прооксидантно-антиоксидантного баланса в ткани почек, а также на основе изучения гистоструктуры почек животных.

Применение гентамицина на протяжении 6 дней привело к развитию олигурической формы токсической нефропатии. При введении EDL скорость клубочковой фильтрации возросла на 65 %, AEDG – на 70 %. Все пептиды достоверно понижали экскрецию белка с мочой: пептиды EDL и AEDG – на 83 %, AED – на 43 %. Поражение проксимальных канальцев обусловило возрастание экскреции натрия и калия с мочой. Применение пептидов компенсировало данные нарушения, что проявлялось в снижении экскреции ионов натрия на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) и 85,4 % (AEDG) и калийсберегающем действии пептидов EDL и AEDG. Под влиянием гентамицина наблюдали увеличение содержания МДА и ОМБ в ткани почек, а также угнетение активности ГП и КАТ. Пептид EDL снижал содержание МДА в 1,7 раза, ОМБ – у 1,6 раза, AEDG уменьшал данные показатели в 1,3 и 1,6 раза, пептид AED – в 1,2 и 1,3 раза соответственно. Токсическое действие гентамицина привело к некрозу 69,0 ± 2,4 % эпителиоцитов канальцев почек, остальные клетки – с признаками гидропической вакуолизации, просветы канальцев и собирательных трубочек заполнены белковыми цилиндрами. На фоне применения пептидов EDL и AEDG некротических изменений не выявлено, гидропическое набухание охватывает 80,0 ± 1,8 % и 91,0 ± 1,3 % клеток соответственно. При применении AED выявлено ограничение некротических процессов до 48,0 ± 2,1 % эпителиоцитов канальцев.

Курсовое применение органоспецифических пептидов способствовало защите почечной ткани от токсического действия гентамицина, что проявлялось улучшением функционального состояния почек и антиоксидантным эффектом. Нефропротекторное влияние подтверждается данными гистологического исследования, с более выраженным эффектом пептидов EDL и AEDG.

Ключевые слова: нефропротекция, пептиды, гентамициновая нефропатия

T. S. Shchudrova, I. I. Zamorskii

Comparative assessment of the nephroprotective activity of organospecific peptides in rats with gentamicin nephropathy

The aim of the study was to compare the nephroprotective effects of organospecific peptides in rats with gentamicin nephropathy.

The nephroprotective influence was determined using the indices of the functional state of kidneys, prooxidant-antioxidant balance in kidney tissue and on the base of histological study of rats' kidneys tissues.

Gentamicin administration during 6 days resulted in the development of oligouric form of toxic nephropathy. EDL increased glomerular filtration rate by 65 %, AEDG – by 70 %. All peptides significantly decreased urinary protein excretion: EDL and AEDG – by 83 %, AED – by 43 %. Proximal tubules injury caused an increase in urine sodium and potassium excretion. Administration of peptides compensated this disturbances, manifested in decrease of sodium excretion by 82 % (EDL), 58,5 % (AED) and 85,4 % (AEDG) and potassium sparing action of peptides EDL and AEDG. An increase of MDA and OMP content in kidney tissue along with inhibition of GPx and CAT activity under the influence of gentamicin was observed. Peptide EDL decreased MDA content by 1,7 times, OMP – by 1,6 times, AEDG decreased these indices by 1,3 and 1,6 times, peptide AED – by 1,2 and 1,3 times, respectively. A significant increase of GPx and CAT activity was observed in all groups of treated animals. Toxic action of gentamicin caused the necrosis of 69,0 ± 2,4 % of tubular epitheliocytes, the rest of cells were without the signs of the hydropic vacuolization, lumens of the tubules and collecting ducts are filled with protein casts. The peptides EDL and AEDG administration did not produced necrotic lesions of cells bat led to hydropic swelling involved 80,0 ± 1,8 % and 91,0 ± 1,3 % of cells, respectively. In case of AED administration a restriction of necrotic processes in tubular epitheliocytes up to 48,0 ± 2,1 % was identified.

In condusion, the course of peptides treatment contributed to protection of kidney tissue from toxic action of gentamicin and manifested in amelioration of functional state of kidneys and antioxidant effect. Nephroprotective action of peptides is confirmed by histological studies with more significant effect for EDL and AEDG peptides.

Key words: nephroprotection, peptides, gentamicin nephropathy

Надійшла: 17.11.2014 р.

Контактна особа: Щудрова Тетяна Сергіївна, аспірант, кафедра фармакології, Буковинський державний медичний університет, буд. 57/52, вул. Героїв Майдану, м. Чернівці, 58029.
Тел.: + 38 0 50 665 24 28. Електронна пошта: tshchudrova@gmail.com

УДК 615.22: 615.036.2: 615.074

О. К. Ярош[1], О. О. Нагорна[2], Л. І. Кучеренко[3], А. В. Волуй[1], О. В. Кузнєцова[1]

Кардіотропність нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після внутрішньом'язового введення

[1]ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ
[2]Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ
[3]НПО «Фарматрон», м. Запоріжжя

Ключові слова: кардіотропність, препарат «Ангіолін», міокард, внутрішньом'язове введення, ВЕРХ

Пошук ефективних лікарських засобів терапії захворювань серцево-судинної системи (ССС) залишається вкрай актуальною проблемою. Щорічно в Україні діагностують близько 50 тис. випадків інфаркту міокарда, а внаслідок захворювання серця і судин умирає майже 460 тис. осіб [1].

Ефективність фармакологічної допомоги пацієнтам з патологією ССС значною мірою залежить, з одного боку, від особливостей фармакодинаміки препарату, а з іншого – від основних показників фармакокінетики (ФК), тобто шляхів досягнення таргетних клітин та тих змін, яких зазнає активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) в організмі. Для препаратів серцево-судинної групи найважливішим з параметрів ФК є швидкість і повнота доставки АФІ препарату спочатку в кров, а потім – до цільових клітин (клітин-мішеней), зокрема, серця та судин організму [2–4].

У науково виробничому об'єднанні «Фарматрон» синтезовано новий препарат під умовною назвою «Ангіолін» та створено готову лікарську форму – ін'єкційний розчин в ампулах. При вивченні фармакодинаміки Ангіолін виявився найкращим за співвідношенням ефективність/безпечність серед багатьох представників групи кардіотоніків. Новий препарат показав дуже важливі позитивні властивості на різних моделях серцево-судинної недостатності [5, 6].

© Колектив авторів, 2014

Як відомо, одним з найшвидших і найпоширеніших шляхів доставки АФІ до цільових тканин сьогодні є внутрішньовенний (в/в) та внутрішньом'язовий (в/м). Тому нова лікарська форма препарату «Ангіолін» у вигляді ін'єкційного розчину в ампулах для в/м введення в перспективі буде мати велике практичне значення для надання невідкладної лікарської допомоги при кризових станах ССС.

Мета дослідження – визначення параметрів кардіофармакокінетики АФІ ін'єкційного розчину «Ангіолін» за умов одноразового внутрішньом'язового (в/м) введення щурам.

Матеріали та методи. Дослідження здійснювали на 50 білих статевозрілих щурах обох статей масою 150–230 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс». Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до національних та міжнародних вимог з біоетики. Препарат «Ангіолін» вводили одноразово в/м у вигляді 2,5 % розчину для ін'єкцій у дозі 50 мг/кг маси тіла в перерахунку на АФІ. Через 5, 10, 20, 40, 60, 120 та 180 хв після введення під ефірним наркозом забивали щурів та вилучали серце й готували біопроби з метою їхнього подальшого хроматографування за методикою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для цього тканини серця заморожували, ретельно подрібнювали й готували тканинну біопробу для кількісного визначення вмісту в ній активного фармацевтичного інгредієнта. Вилучення АФІ з тканин серця здійснювали шляхом додавання до кожної проби 1 мл метанолу та ставили на 5 хв в ультра-

звукову баню і при температурі 55 °С здійснювали повне осаджування дрібнодисперсних часток з вивільненням з них досліджуваної сполуки. Проби центрифугували 30 хв при 8000 об/хв, а надосадовий прозорий розчин заміряли (точний об'єм) та переносили до віал для подальшого хроматографування.

Визначення концентрації сполуки «Ангіолін» здійснювали за допомогою ВЕРХ з мас-селективним детектуванням на приладі фірми «Agilent Technologies 1200 Series» (США).

Параметри налаштування мас-селективного детектора та валідації методу наведено в попередніх публікаціях [7]. Експериментальне визначення концентрації АФІ в тканинах серця проводили в повній відповідності до вимог національних та міжнародних керівництв [8, 9].

Отримані хроматограми АФІ ін'єкційного розчину препарату «Ангіолін» визначали в тканинах серця білих щурів протягом 3 год після одноразового в/м введення. На кожну точку визначення концентрації брали серця з 5 тварин.

Для визначення інших фармакокінетичних параметрів, які неможливо було дослідити в експериментах на тваринах в умовах *in vivo*, застосовували математичне моделювання віртуальних параметрів [12] на основі отриманих експериментальних даних із використанням комп'ютерної програми.

Цифрові результати експериментів піддавали статистичній обробці з використанням стандартних комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistika 6,0 з орієнтуванням на t-критерії Стьюдента [10, 11].

Результати та їх обговорення. Типові хроматограми, які було отримано в різні проміжки часу після ін'єкції, наведено на рисунках 1–7. Динаміку кількісного вмісту АФІ «Ангіолін» після перерахунку за площами відповідних хроматограм на їхню концентрацію в нг/г та мкг/г тканини серця після в/м введення 2,5 % розчину для ін'єкцій у дозі 50 мг/кг надано в таблиці 1, а графічне відображення – на рисунку 2.

Із результатів вмісту АФІ у тканинах серця, наданих у таблиці 1, видно, що концентрація сполуки досить швидко зростала в тканині серця й уже на 5 хв після введення досягала порівняно високої концентрації 2147,0 ± 571,3 нг/г або 2,15 мкг/г ± 0,57 мкг/г тканини. Але вже на 10 хв після введення концентрація сполуки досягла максимального рівня й була 2688,6 ± 280,8 нг/г.

Після цього зростання насичення тканин серця препаратом припинилося, починався період виведення активної субстанції з міокардіоцитів. У цей період уміст АФІ у серці починав зменшуватися, і на 20 хв він становив 2296,6 ± 247,9 нг/г, що на 14,9 % менше порівняно з попереднім періодом.

У наступній точці, через 40 хв, концентрація швидко (більше ніж удвічі) зменшувалася й уміст активної субстанції «Ангіолін» був у цей період 955,0 ± 126,3 нг/г тканини серця. Через 60 хв рівень АФІ препарату знизився до концентрації 250,0 ± 65,6 нг/г, тобто вона була майже в 4 рази меншою порівняно з попереднім терміном.

Така висока швидкість зникнення АФІ «Ангіолін» з міокарда призвела до зменшення концентрації на 2 год до величини меншої, ніж нижня межа кількісного визначення (НМКВ) (табл. 1, рис. 2).

Аналізуючи отримані дані щодо кінетики активної складової препарату «Ангіолін», можна вважати, що її розподіл і накопичення в міокардіоцитах (альфа-фаза тканинної кінетики) як клітинах-мішенях досить високі, і вже через 13 ± 3 хв реєстрували її максимальний рівень у тканинах серця тварин. Однак високий рівень АФІ утримувався тільки до 20 хв, а після цього починалося зменшення концентрації препарату. Спочатку – повільне в період з 10 по 20 хв, а після цього відбувалося досить швидке зниження вмісту сполуки в серці, і через 2 год її концентрація була меншою, ніж НМКВ (рис. 2).

Результати визначення інших фармакокінетичних параметрів АФІ «Ангіолін» у тканинах серця після його в/м введення, обрахованих шляхом використання математичного моделювання віртуальних параметрів, надано в таблиці 2.

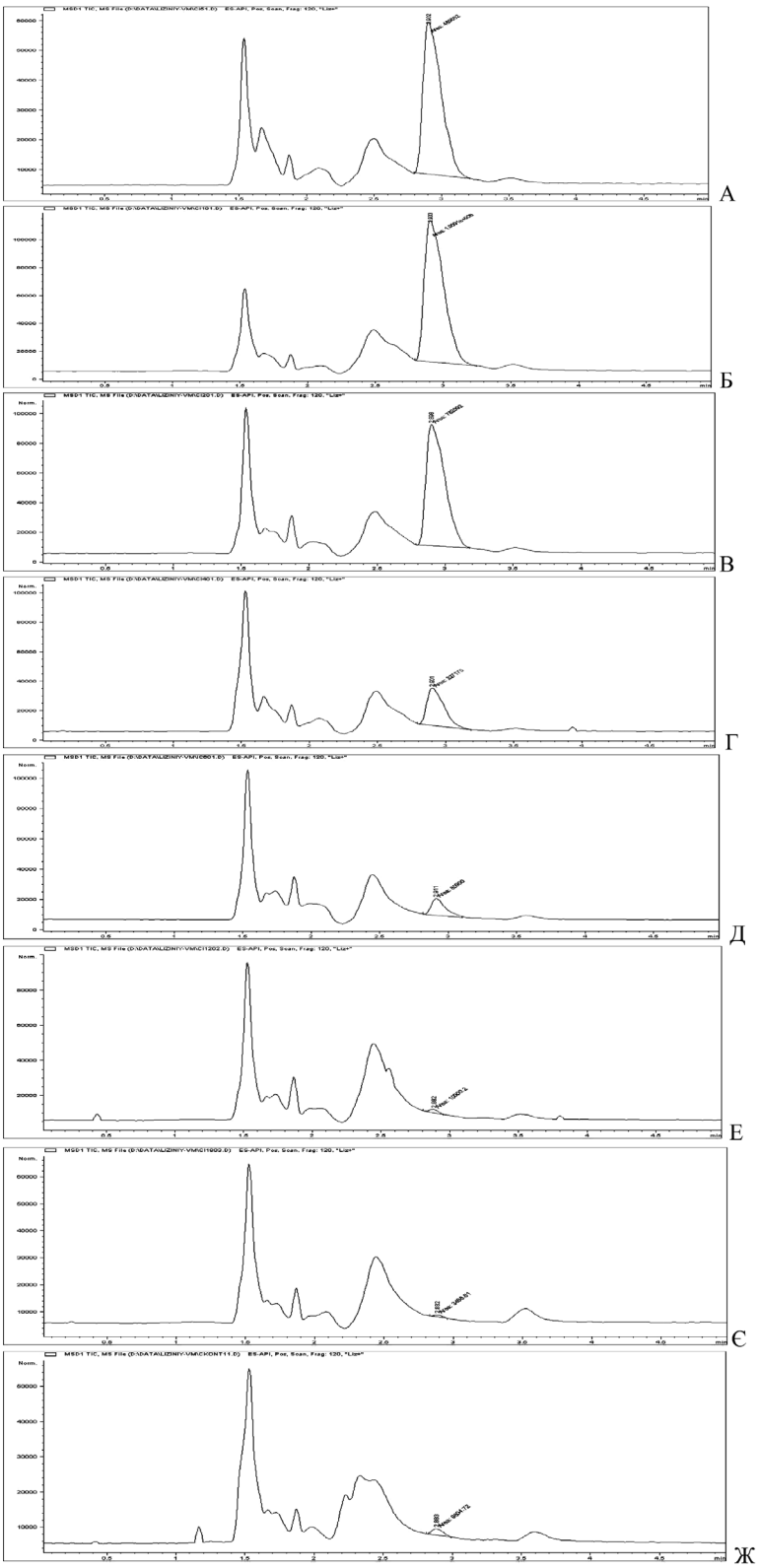

Рис. 1 Хроматограми сполуки «Ангіолін» у різні періоди після внутрішньом'язового введення щурам: А – 5 хв, Б – 10 хв, В – 20 хв, Г – 40 хв, Д – 60 хв, Е – 120 хв, Є – 180 хв, Ж – контроль

Таблиця 1

Уміст активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» у тканині серця щурів після одноразового внутрішньом'язового введення в дозі 50 мг/кг (n = 5 у кожній точці виміру)

Уміст активного фармацевтичного інгредієнта, нг/г	Час після введення, хв						
	5	10	20	40	60	120	180
M	2147,0	2688,6	2296,6	955,0	250,0	< НМКВ	< НМКВ
± m	571,3	280,8	247,9	126,3	65,6	< НМКВ	< НМКВ

Примітка. M – середнє значення, ± m – стандартна похибка, НМКВ – нижня межа кількісного визначення.

Без сумніву, світова тенденція до заміни тварин з проведенням експериментальних визначень, комп'ютерним моделюванням і розрахунками параметрів фармакокінетики, особливо її сегмента визначення рівня досліджуваної сполуки в недоступних тканинах за клінічних умов, поступово витісняє досліди на тваринах і в майбутньому збереже життя мільйонів живих істот. Однак відразу перейти до віртуальної фармакокінетики неможливо без накопичення фактичного матеріалу, тому кожний такий досвід дає можливість порівнювати обидва способи одержання інформації й оцінити його адкватність і достовірність показників, отриманих обома шляхами. Нині існують сотні комп'ютерних програм, за якими можна обраховувати параметри фармакокінетики, і цей процес набирає все більшу швидкість.

Тому в цьому дослідженні були використані одночасно два підходи – експериментальний і віртуальний, і нам здавалося природним порівняти їхні параметри. Виявилося, що порівняльний аналіз даних експериментальної ФК АФІ сполуки «Ангіолін» у тканинах серця на тваринах і отриманих при обрахуванні за комп'ютерною програмою віртуальних параметрів показав як збіжність, так і розходження даних. Такими параметрами, що практично співпадають, можна вважати час досягнення максимального рівня АФІ у тканині серця (відповідно $T_{C_{max}}$ = 13,00 ± 3,00 хв та 8,67 ± 0,93 хв) та максимальна досягнута концентрація (відповідно C_{max} = 2688,6 ± 280,8 нг/г і 2028,0 ± 110,4 нг/г).

Натомість, показник середнього часу перебування сполуки в серці за експериментальними та розрахунковими даними відрізняється значно більше. За дослідними даними цей показник становив у середньому 135,1 ± 35,5 хв, а за математичним моделюванням – лише 39,4 ± 20,9 хв, тобто дійсний термін виявився майже в 2 рази довшим, ніж розрахунковий.

Таким чином активна складова препарату «Ангіолін» у серці знаходилася у високій концентрації майже цілу годину, і тільки після цього рівень АФІ препарату починав знижуватися і досягав величин, менших за НМКВ. Саме цей експериментальний показник є основою розрахунків режиму дозування при проведенні I фази клінічних випробувань нового лікарського засобу.

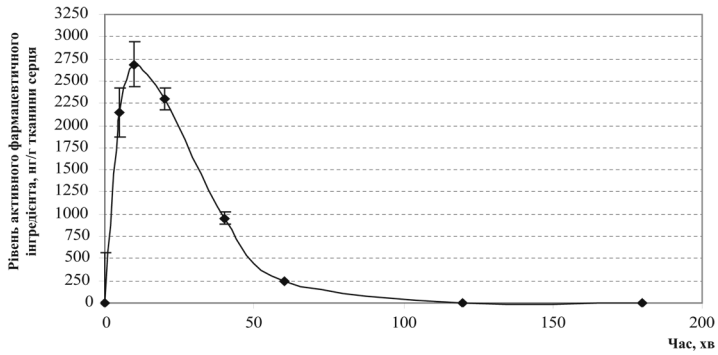

Рис. 2. Зміни концентрації препарату «Ангіолін» у тканинах серця після внутрішньом'язового введення в дозі 50 мг/кг, нг/г

Таблиця 2

Фармакокінетичні параметри активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» у тканинах серця щурів після одноразового внутрішньом'язового введення, обраховані шляхом математичного комп'ютерного моделювання

№	Параметр	Показник і розмірність	Серце
1	Час досягнення максимальної концентрації	t, хв	8,67 ± 0,93
2	Максимальна концентрація препарату	C_{max}, нг/г	2028,0 ± 110,4
3	Стаціонарний об'єм розподілу	V, мл	16 823,5 ± 8357,8
4	Площа під фармакокінетичною кривою	AUC нг•хв/г	88 260,0 ± 13 748,8
5	Константа елімінації	K_{el} (хв$^{-1}$)	0,050 ± 0,006
6	Загальний кліренс	Cl_t нг/хв	639 393,8 ± 121 126,0
7	Середній час перебування в тканинах серця	MRT, хв	39,42 ± 20,91

Висновки

1. Активний фармацевтичний інгредієнт нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після одноразового внутрішньом'язового введення досягав максимальної концентрації (C_{max}) 2688,6 ± 280,8 нг/г у серці щурів через 13,0 ± 3,0 хв ($T_{C_{max}}$).

2. Термін перебування незміненої фракції АФІ препарату «Ангіолін» у тканинах серця щурів складав 135,1 ± 35,5 хв, після чого її концентрація ставала меншою за НМКВ.

3. Показник кліренсу (Cl_t) активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» з тканин серця становив 639 393,8 ± 121 126,0 нг/хв.

1. Счетная палата Украины: Проблема с сердечно-сосудистыми заболеваниями вышла за рамки медицины // Електронний ресурс. – Режим доступу: Фармацевтический дайджест No.33 (317) (18.08.14–24.08.14). Pharma.net.ua.
2. *Катцунг Б. Г.* Базисная и клиническая фармакология / Бертрам Г. Катцунг; Пер. с англ. – М. – Спб. : Бином-Невский діалект, 1998. – 1876 с.
3. Фармакокинетика / Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко. – Ростов-на-Дону : «Феникс», 2001. – 384 с.
4. *Головенко М. Я.* Фізико-хімічна фармакологія: Монографія / М. Я. Головенко. – Одеса : Астропринт, 2004. – 720 с.
5. *Мазур І. А.* Патент України № 86668 № C07 D, A61K 31/41 «Ангіолін 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти, володіючий нейропротективною, ноотропною, кардіопротективною, ендотеліотропною, протиішемічною, антиоксидантною, протизапальною, протигіпоксичною дією і маючу низьку токсичність / І. А. Мазур, Ю. М. Колесник, Л. І. Кучеренко, І. Ф. Бєленічев та ін. Заявл.04.06.2007. Опубл. 20.10.2009.
6. 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 [та ін.] // Электронный ресурс. – Режим доступа: Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry № 2(58)/2012.
7. Серцева тканинна біодоступність та показники розрахункової фармакокінетики нової кардіотропної сполуки «Ангіолін» / Л. І. Кучеренко, В. М. Бобков, О. І. Барчина [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 5 (30). – С. 37–43.
8. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – С. 58-67.
9. *Либина В. В.* Национальные и международные правила проведения биоаналитических исследований по оценке биоэквивалентности генерических препаратов / Либина В. В. // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – № 8. – С. 30–37.
10. *Гельман В. Я.* Медицинская информатика: практикум / Гельман В. Я. – СПб. : Питер, 2001. – 480 с.
11. *Лапач С. Н.* Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2002. – 640 с.
12. *Мирошниченко И. И.* Основы фармакокинетики. – М .: «ГЭОТАР-МЕД», 2002. – 192 с.

О. К. Ярош, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, А. В. Волуй, О. В. Кузнєцова

Кардіотропність нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після внутрішньом'язового введення

За розробленою і валідованою, згідно із національними вимогами ДФУ і ДЕЦ МОЗ України та міжнародними рекомендаціями EMEA і FDA, методикою кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) вивчено кардіотропність препарату «Ангіолін» (НВО «Фарматрон») після одноразового внутрішньом'язового введення з використанням мас-спектрометричної ВЕРХ. АФІ препарату швидко, протягом 13,0 ± 3,0 хв, досягав максимальної концентрації в тканинах серця на рівні 2688,6 ± 280,8 нг/г. Рівень сполуки в тканинах серця знижувався через 20 хв після в/м введення і досягав концентрації меншої, ніж межа кількісного визначення в середньому через 135,1 ± 35,5 хв.

За результатами математичного моделювання час досягнення максимальної концентрації (T_{Cmax}) у міокардіоцитах становить у середньому 8,67 ± 0,93 хв, максимальна концентрація препарату (C_{max}) у тканинах серця – 2028,0 ± 110,4 нг/г, площа під фармакокінетичною кривою (AUC) – 88 260,0 ± 13 748,8 нг/хв·г.

За експериментальними даними середній час перебування препарату в міокарді складав 135,1 ± 35,5 хв, після чого концентрація ставала меншою ніж нижня межа кількісного визначення, у той час як за результатами комп'ютерного моделювання він був лише 39,4 ± 20,9 хв.

Ключові слова: кардіотропність, препарат «Ангіолін», міокард, внутрішньом'язове введення, ВЕРХ

А. К. Ярош, Е. А. Нагорная, Л. И. Кучеренко, А. В. Волуй, Е. В. Кузнецова

Кардиотропность новой инъекционной формы препарата «Ангиолин» после внутримышечного введения

По разработанной и валидированной в полном соответствии с национальными требованиями ГФУ и ГЭЦ МЗ Украины и международными рекомендациями EMEA и FDA методике количественного определения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) изучена кардиотропность препарата «Ангиолин» (НПО «Фарматрон») после однократного внутримышечного введения с использованием масс-спектрометрической ВЭЖХ. Параметры фармакокинетики определяли у крыс после однократного внутримышечного введения раствора Ангиолина в дозе 50 мг/кг. Активный фармацевтический ингредиент препарата быстро, в течение в среднем 13,0 ± 3,0 мин, достигал максимальной концентрации в тканях сердца – 2688,6 ± 280,8 нг/г. Уровень соединения в тканях сердца снижался через 20 мин после в/м введения и достигал концентрации меньшей, чем нижний предел количественного определения в среднем через 135,1 ± 35,5 мин.

По результатам математического моделирования время достижения максимальной концентрации (T_{Cmax}) в миокарде составляет в среднем 8,67 ± 0,93 мин, максимальная концентрация препарата (C_{max}) в тканях сердца – 2028,0 ± 110,4 нг/г, площадь под фармакокинетической кривой (AUC) – 88 260,0 ± 13 748,8 нг·мин/г.

По экспериментальным данным среднее время пребывания препарата в миокарде составляло 135,1 ± 35,5 мин, затем концентрация становилась меньше нижнего предела количественного определения, в то время как по результатам компьютерного моделирования оно составляло только 39,4 ± 20,9 мин.

Ключевые слова: кардиотропность, препарат «Ангиолин», миокард, внутримышечное введение, ВЭЖХ

A. K. Yarosh, H. A. Nagornaya, L. I. Kutsherenko, A. V. Volui, H. V. Kuznietsova

Cardiotropism of a new injectable form of the drug «Angiolin» after intramuscular administration

The aim of this study was to estimate the myocardium pharmakokinetics of the drug «Angiolin» in new injectable form. Mass-spectrometry HPLC quantitative determination of the active pharmaceutical compound (APC) of «Angiolin» in the heart tissues was performed after a single intramuscular injection 50 mg/kg to rats. The active pharmaceutical compound of the drug quickly reached a maximum concentration in the heart tissues at the level of 2688,6 ± 280,8 ng·min/g within an average of 13,0 min ± 3,0 min. Highest levels of compound was reduced 20 min after i/m administration and reached a concentration below the lower limit of quantification of an average of 135,1 ± 35,5 min.

Based on the results of mathematical modeling the time to reach maximum concentration (T_{Cmax}) in myocardium averaged 8,67 ± 0,93 min, maximum drug concentration (C_{max}) in the heart tissues – 2028,0 ± 110,4 ng/g, the area under the concentration-time curve (AUC) – 88 260,0 ± 13 748,8 ng/min·g. According to experimental data the average residence time of the drug in the myocardium was 135,1 ± 35,5 min, then the concentration becomes smaller than the lower limit of quantification, while as to the results of computer modeling it was only 39,4 ± 20,9 min.

Key words: cardiotropism, «Angiolin», myocardium, intramuscular administration, HPLC.

Надійшла: 21.10.2014 р.

Контактна особа: Ярош Олександр Кузьмич, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: yarosh44@mail.ru

До 75-річчя видатного науковця

5 січня 2015 року виповнилося 75 років ректору Національного фармацевтичного університету Валентину Петровичу Черниху, член-кореспонденту НАН України, лауреату Державної премії України, доктору фармацевтичних наук, доктору хімічних наук, професору. У 2015 році виповнюється 50 років його науково-педагогічної та громадської діяльності й 35 років – на посаді ректора.

Півстоліття життя віддано служінню благородній місії – підготовці фахівців для фармацевтичної галузі, наукових і науково-педагогічних кадрів, перебудові та реорганізації НФаУ, реформуванню вищої фармацевтичної освіти та фармацевтичної галузі України. В. П. Черних пройшов шлях від студента, аспіранта, асистента, доцента, професора, завідувача кафедри, декана, проректора з навчальної роботи до ректора НФаУ, який очолює з 1980 року.

Сьогодні колектив університету налічує понад 20 тис. співробітників і студентів. Під керівництвом В. П. Черниха Харківський фармацевтичний інститут, у якому навчалося 1600 студентів за однією спеціальністю «Фармація» та працювало 6 докторів і 73 кандидати наук, виріс в унікальний науково-освітній комплекс – Національний фармацевтичний університет, у якому навчаються 17 500 студентів за 14 спеціальностями та здійснюють науково-педагогічну діяльність 110 докторів і 500 кандидатів наук (середній вік яких – 45 років). У 1991 році Харківський фармацевтичний інститут одним із перших серед 900 ВНЗ отримав статус акредитованого на союзному рівні. У 1999 році в першій п'ятірці ВНЗ України набув статусу національного, став другим національним ВНЗ у м. Харкові.

У НФаУ з 1980 року підготовлено понад 130 докторів і близько 650 кандидатів наук. За рейтингом ЮНЕСКО серед 200 кращих університетів України НФаУ має один із найвищих показників якості науково-педагогічного потенціалу – 94 %. За останні 15 років у НФаУ відкрито 13 нових спеціальностей, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, коледж. НФаУ посідає лідерські позиції в Україні, у національному рейтингу знаходиться на 2 місці серед 18 медичних навчальних закладів і на 3 – серед харківських університетів, є флагманом фармацевтичної освіти серед навчальних закладів країн СНД. НФаУ нагороджений Почесною грамотою КМ України за вагомий внесок у розвиток медичної та фармацевтичної науки і освіти. Університет є дійсним членом міжнародних фармацевтичних та освітніх асоціацій. У 2013 році НФаУ приєднався до Великої Хартії університетів. У його аудиторіях отримали вищу фармацевтичну освіту понад 50 тис. фахівців, у тому числі понад 6 тис. магістрів фармації для 82 країн світу.

З метою реалізації державної політики кадрового забезпечення галузі В. П. Чернихом запропонована система підготовки фахівців «на місцях» шляхом відкриття мережі з 20 фармацевтичних факультетів при медичних ВНЗ.

Уперше в системі фармацевтичної освіти України створено навчально-методичні комплекси навчальної літератури з усіх дисциплін обсягом понад 2 тис. найменувань. Наукова спадщина університету – це понад 490 підручників і посібників, 300 монографій, понад 1500 сертифікатів на винаходи; розроблено і впроваджено у виробництво 261 лікарський препарат.

В. П. Черних – ініціатор і один із авторів розробки Концепції розвитку фармацевтичної галузі та освіти України, розширення спектра спеціальностей для фармацевтичної галузі, основоположник новітнього напряму в фармації: фармацевтичної опіки хворих, системи контролю якості ліків, у тому числі впровадження біоеквівалентності на засадах належної клінічної практики відповідно до світових вимог.

З ініціативи та за участі В. П. Черниха в Україні встановлене професійне свято – День фармацевтичного працівника (1999 р.), запроваджена державна нагорода – почесне звання «Заслужений працівник фармації України» (2005 р.), прийнятий Етичний кодекс фармацевтичного працівника України (2010 р.), створена перша в світі Фармацевтична енциклопедія (2005 р.), збагачена культурна скарбниця Харківщини унікальною скульптурною композицією «Фармація у віках», першим у світі пам'ятником фармацевту, проведені на базі університету V, VI і VII Національні з'їзди фармацевтів України, створена Фармацевтична асоціація України.

В. П. Черних – видатний учений у галузі органічної хімії. Він є автором 1260 наукових праць, у тому числі підручника «Органічна хімія» у 3 томах (Державна премія України в галузі науки і техніки, 2000 р.). Ученим заснований науковий напрям – синтез біологічно-активних речовин – похідних дикарбонових кислот, створення на їхній основі різних гетероциклічних структур і дослідження шляхів циклізації полифункціональних реагентів в ансамблі гетероциклів. Пріоритетність наукових досліджень підтверджують 126 патентів України та Росії, 341 авторське свідоцтво. В. П. Черних створив школу хіміків-синтетиків, у рамках якої підготував понад 60 докторів і кандидатів наук, а також (особисто та з учнями) створив 16 лікарських препаратів.

У 1997 році професора В. П. Черниха було обрано член-кореспондентом НАН України. За наукові досягнення Президія НАН України нагородила В. П. Черниха почесним знаком НАН України в 2013 році.

В. П. Черних – ініціатор видання 7 наукових журналів ВАК України, протягом 30 років працював в Експертних радах ВАК СРСР та України. Нині очолює республіканську Проблемну комісію «Фармація» МОЗ України, є головою Науково-методичної комісії з фармації МОН України, членом Вченої Ради ДП «Державний фармакологічний центр» МОЗ України, Президії Фармакопейного Комітету МОЗ України, Вченої медичної ради МОЗ України, бюро Державного фармакологічного центру з реєстрації ЛЗ і ЛП, секції хімії та хімічної технології Комітету з Державних премій у галузі науки і техніки, колегії Держінспекції з контролю якості лікарських препаратів МОЗ України. В. П. Черних – віце-президент Фармацевтичної асоціації України, президент Фармацевтичної асоціації Харківщини, депутат Київської районної ради народних депутатів м. Харкова (1986 р.) і міської Ради народних депутатів (1985–1987 рр.). У 1999 році Міжнародний біографічний центр та Американський біографічний інститут визнали В. П. Черниха одним із 500 найвпливовіших і видатних учених світу.

В. П. Черних нагороджений орденами «Знак Пошани», «Трудового Червоного Прапора», орденами України «За заслуги» I, II, III ступенів, князя Ярослава Мудрого IV і V ступенів, Почесною грамотою ВР України, почесними грамотами та відзнаками МОЗ та МОН України, «Відмінник охорони здоров'я», «Відмінник освіти України», «Винахідник СРСР», «Петро Могила», відзнакою Харківської облдержадміністрації «Слобожанська слава». Йому присвоєно почесні звання «Заслужений винахідник УРСР», «Заслужений діяч науки і техніки УРСР». Харківська громадськість обрала В. П. Черниха Почесним громадянином міста.

Науково-педагогічна й академічна громадськість, колектив і студенти НФаУ, колеги, друзі, учні від щирого серця вітають вченого, педагога, організатора і реформатора вищої фармацевтичної освіти, невтомного ентузіаста й патріота фармації, який є яскравим прикладом відданого служіння інтересам освіти, науки, здоров'я людей, інтересам України.

Нових Вам, Валентине Петровичу, звершень і злетів, невичерпного творчого натхнення та довголіття.

СОДЕРЖАНИЕ

ОГЛЯДИ

Кизуб И. В. Rho-киназа: одно из главных звеньев в Ca^{2+}-сенситизации при индуцированной диабетом гиперсократимости сосудистых гладких мышц 3

Слесарчук В. Ю. Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина 11

Шарыкина Н. И., Мешкова Н. А., Мищенко О. В., Хавич О. А., Кудрявцева И. Г., Пенделюк С. И. Трансдукция митогенных сигналов как основа создания противоопухолевых таргетных препаратов (часть II) 19

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Котов А. А., Громов Л. А., Ярош А. К. Формирование резистентности (толерантности) к анксиолитическому действию феназепама при продолжительном введении мышам 27

Макаренко О. В., Криворучко Т. Н. Экспериментальная оценка антипаркинсонической активности цитиколина совместно с амантадином 32

Нефедов А. А. Сравнительная оценка влияния ненаркотических анальгетиков и средств адъювантной терапии на поведенческие реакции крыс в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза 37

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Добреля Н. В., Стрелков Е. В., Хромов А. С., Клименко Е. И., Новохацкая Т. В., Соловьев А. И. Роль дельта-изоформы протеинкиназы С в развитии нарушений коронарного кровотока, обусловленных сахарным диабетом 44

Мокляк Е. В., Важничая Е. М., Андрусишина И. Н. Влияние композитных наночастиц магнетита на содержание железа в органах и плазме крови крыс в условиях острой кровопотери 51

Мохорт М. А., Кутовый Ю. М. Влияние производных имидазо[1,2-а]азепиния на сократительную активность изолированного сердца крысы 59

Посохова К. А., Стечишин И. П. Эффективность препаратов кверцетина при экспериментальном сахарном диабете 66

Чикиткина О. М., Кононенко Н. Н., Ларьяновская Ю. Б. Влияние гликверина на липидный обмен и состояние печени крыс на фоне метаболического синдрома 72

Щудрова Т. С., Заморский И. И. Сравнительная оценка нефропротекторной активности органоспецифических пептидов при гентамициновой нефропатии у крыс 81

Ярош А. К., Нагорная Е. А., Кучеренко Л. И., Волуй А. В., Кузнецова Е. В. Кардиотропность новой инъекционной формы препарата «Ангиолин» после внутримышечного введения 87

ЛИЧНОСТИ

К 75-летию выдающегося ученого 93

CONTENT

REVIEWS

Kizub I. V. Rho-kinase: one of the main links in Ca^{2+} sensitization in diabetes-induced vascular smooth muscle hypercontractility 3

Slesarchuk V. Yu. The neuroprotective properties of Quercetin containing preparations 11

Sharykina N. I., Meshkova N. A., Mischenko O. V., Khavich O. A., Kudryavtzeva I. G., Pendeluk S. I. Transduction of mitogenic signals as a basis for the creation of anticancer targeted agents (part II) 19

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

Kotov O. O., Gromov L. O., Yarosh O. K. Development of resistance (tolerance) to anxiolytic action of phenazepam in prolonged administration to mice 27

Makarenko O. V., Kryvoruchko T. N. Experimental evaluation of antiparkinsonian activity of Citicoline combined with Amantadine 32

Nefedov O. O. Comparative evaluation of the impact of non-narcotic analgesics and adjuvant drugs on the behavioural responses of rats under the experimental equivalent of multiple sclerosis 37

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

Dobrelya N. V., Strelkov E. V., Khromov A. S., Klimenko K. I., Novokhatskaya T. V., Soloviev A. I. Role of protein kinase C delta-isoform in the development of coronary blood flow disturbances due to diabetes mellitus 44

Mokliak Ye. V., Vazhnichaya Ye. M., Andrusishina I. N. Composite magnetite nanoparticles influence on iron content in the organs and blood plasma of rats under the conditions of acute blood loss 51

Mokhort M. A., Kutovyii I. M. Impact of imidazo[1,2-a]azepinium derivatives on isolated rat heart contractile activity 59

Posokhova K. A., Stechyshyn I. P. The effectiveness of quercetin-containing preparations at the experimental diabetes mellitus 66

Chikitkina O. M., Kononenko N. N., Laryanovskaya Y. B. The influence of glikverin on lipid metabolism and the condition of rat liver under metabolic syndrome 72

Shchudrova T. S., Zamorskii I. I. Comparative assessment of the nephroprotective activity of organospecific peptides in rats with gentamicin nephropathy 81

Yarosh A. K., Nagornaya H. A., Kutsherenko L. I., Volui A. V., Kuznietsova H. V. Cardiotropism of a new injectable form of the drug «Angiolin» after intramuscular administration 87

PERSONALITY 93