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

№ 3(44)/2015

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Кізуб І. В., Клименко К. І., Соловйов А. І. Участь протеїнкінази С (ПКС) у механізмах порушення судинного тонусу за умов цукрового діабету. Частина 3 3

Нефьодов О. О., Мамчур В. Й. Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти 10

Хайтович М. В. Фармакогенетика бронхіальної астми 17

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Демченко А. В., Бєленічев І. Ф. Стан глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи мозку білих щурів після корекції цитиколіном модельованої хронічної ішемії 28

Мовчан О. Д. Протисудомна активність підвищених доз антиконвульсантів на тлі сформованої толерантності 35

Шастун Н. П., Опрышко В. И., Павлов С. В., Бухтиярова Н. В. Сравнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндлинга 40

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Kharchenko O. Long-term alcohol consumption provokes oxidative and nitrosative stress in albino rats brain 49

Дроговоз С. М., Зупанец М. В., Кононенко А. В., Абдурахмонов Ж. У. Антиартритные препараты природного происхождения – альтернатива НПВС 55

Загайко А. Л., Брюханова Т. О, Шкапо А. І. Модулюючий вплив сибутраміну на зміни метаболізму, зумовлені експериментальною інсулінорезистентністю в щурів 62

Кузнєцова О. В., Лавренчук Г. Й., Буцька В. Є., Сімонова І. В. Фармакобіологічні властивості екстракту шроту темних сортів винограду 70

Лук'янчук В. Д., Шебалдова К. О. Аденілнуклеотидний компонент механізму протигіпоксичної дії нової координаційної сполуки германію ВІТАГЕРМ-3 на моделі гіпоксії замкнутого простору 76

Маньковська І. М., Носар В. І., Гончар О. О., Гавенаускас Б. Л., Французова С. Б., Братусь Л. В., Миронова Г. Д. Вплив модуляторів мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу на фізичну витривалість щурів 82

Цуркан О. О., Делян Є. П. Визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин з сировини осоту городнього (*Sonchus Oleraceus L.*) 90

ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ

Ветютнева Н. О., Римар М. В., Мінарченко В. М., Марусенко Н. А., Макіян Ш. А. Дослідження твердих дисперсних систем мелоксикаму з високомолекулярними сполуками методами електронної мікроскопії та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області 98

ОСОБИСТОСТІ

Светлой памяти выдающегося ученого-токсиколога профессора Брониславы Самойловны Бравер-Чернобульской 104

СОДЕРЖАНИЕ 107

CONTENT 108

м. Київ
Видавець: ТОВ «Видавничий дім «Авіцена», 2015 р.

© «Фармакологія та лікарська токсикологія», 2015 р.

© ВД «Авіцена», 2015 р.

УДК 612.133; 616.132; 615.255; 611.018.61; 615.252

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

Участь протеїнкінази С (ПКС) у механізмах порушення судинного тонусу за умов цукрового діабету. Частина 3

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

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

Участь ПКС у зниженні ендотелій-опосередкованої вазодилатації за умов ЦД. Ендотеліальні клітини беруть активну участь у регуляції судинної реактивності як за фізіологічних, так і за патологічних умов через вивільнення великої кількості важливих судинорозширюючих та судинозвужуючих факторів [1]. Ендотеліальна дисфункція пов'язана зі зниженим ендотелій-залежним розширенням діабетичних судин [2–5]. Клінічні дослідження також свідчать про порушення ендотелій-залежної вазодилатації в пацієнтів з цукровим діабетом (ЦД) [6, 7]. Ендотеліальна дисфункція є системним патологічним станом, що проявляється в дисбалансі між дією судинорозширюючих та судинозвужуючих субстанцій, які продукуються ендотелієм, або в порушенні роботи ендотелію в цілому [8]. Асоційована з ЦД ендотеліальна дисфункція також проявляється в зниженні антикоагулянтних властивостей крові, збільшенні агрегації тромбоцитів, експресії адгезійних молекул, хемокінів та цитокінів [8]. Активація протеїнкінази С (ПКС) у судинному ендотелії за умов ЦД може призводити до дисфункції ендотелій-залежної вазодилатації за рахунок пригнічення шляхів, пов'язаних із оксидом азоту II (NO) [6, 9], ендотелій-залежним гіперполяризуючим фактором (ЕЗГФ) [10] та простацикліном [11]. З іншого боку, активація ПКС призводить до посилення ендотелій-залежної вазоконстрикції, що опосередкована ендотеліном-1 (ЕТ-1) [3], простагландином E_2 ($ПГE_2$) та тромбоксаном A_2 ($ТКА_2$) [11]. До ПКС-опосередкованої ендотеліальної дисфункції за умов ЦД також залучено експресію фактора росту судинного ендотелію (ФРСЕ) та активацію НАДФН-оксидаз (НОК), що призводить до збільшення утворення реактивних форм кисню (РФК) [8]. Показано, що інгібітори ПКС попереджують зниження ендотелій-залежної вазодилатації за умов гіперглікемії [2, 12]. Зокрема встановлено, що ПКС-β є залученою до індукованих гіперглікемією порушень ендотелій-залежної вазодилатації в людини [6]. Нещодавно нами було показано, що нокаутування гена РКС-δ за допомогою малих інтерференційних РНК (міРНК) призводить до повного відновлення зниженої ендотелій-залежної дилатації аорти щурів із стрептозотоцин (СТЗ)-індукованим діабетом [5].

Участь ПКС у порушенні NO-опосередкованої вазодилатації за умов ЦД. Оксид азоту є однією з найважливіших молекул, що синтезуються ендотеліальними клітинами та постійно утворюються за участю ендотеліальної NO-синтази (eNOC) шляхом окиснення L-аргініну [13]. NO викликає розширення кровоносних судин, проникаючи до гладеньком'язових клітин (ГМК) та активуючи там розчинну форму гуанілатциклази, що призводить до утворення циклічного 3'-5'-гуанозинмонофосфату [13]. Механізми, що лежать в основі асоційованої з діабетом ендотеліальної дисфункції, включають зниження активності та експресії eNOC [14], її роз'єднання та деградацію NO внаслідок зростаючої продукції супероксид аніона [9, 11] або зниження сигнальної здатності NO та його біодоступності [3]. За умов діабету ПКС впливає на біодос-

© Колектив авторів, 2015

тупність NO не лише через внутрішньоклітинну акумуляцію РФК [9], але також і через зниження активності eNOC [14]. Встановлено, що дисфункція eNOC за умов ЦД пов'язана з пригніченням її активності ПКС-α [15], ПКС-β [16], зокрема ПКС-β_2 [6] та ПКС-δ внаслідок їхньої активації [16].

Як було встановлено, за умов діабету ПКС фосфорилює eNOC [14] за її інгібіторним сайтом Thr495 [17] та знижує фосфорилювання eNOC на активуючому сайті Ser1177 [18], призводячи до зниження активності eNOC. З іншого боку, опосередковане ПКС-α пригнічення активності eNOC пов'язане зі здатністю ПКС фосфорилювати інший інгібіторний сайт eNOC Thr497, знижуючи її спорідненість до кальмодуліну, і призводить до утворення NO [19]. З іншого боку, за умов ЦД було показано ПКС-залежне зниження експресії eNOC та утворення NO в ендотеліальних клітинах судин сітківки ока [20] та аорти [11, 12]. Зниження експресії eNOC за умов діабету може відбуватися за рахунок ПКС-опосередкованої активації судинних НОК [21]. Як це було показано на аорті діабетичних щурів, пригнічення ПКС попереджало активацію НОК, знижувало eNOC-опосередковане утворення супероксид-аніона, запобігало генній індукції eNOC та відновлювало порушену ендотелій-залежну вазодилатацію [12]. З іншого боку, як це було показано на ендотеліоцитах аорти людини, підвищений рівень глюкози може викликати парадоксальну ПКС-залежну активацію експресії eNOC, яка однак супроводжується зменшенням вивільнення NO [11]. Цей ефект може бути наслідком роз'єднання eNOC, ПКС-опосередкованої активації НОК та утворення РФК, а також утворення пероксинітриту ($ONOO^-$), продукту реакції NO та супероксид-аніона (O_2^-) [11].

Обидва типи діабету зазвичай супроводжуються хронічною гіперінсулінемією та ендотеліальною інсулінорезистентністю [19], яка обумовлена гіперглікемією, глюкозотоксичністю та підвищеним рівнем вільних жирних кислот [19, 22, 23]. До патогенезу діабетичних судинних порушень за умов стану ендотеліальної інсулінорезистентності залучений дисбаланс між вивільненням NO та ET-1 [19, 24]. Інсулін є вазоактивним гормоном, що стимулює утворення NO в ендотеліоцитах через активацію інсулінових рецепторів (IP). Ендотеліальні клітини експресують IP, лігандами яких, окрім самого інсуліну, є фактори росту, такі як інсуліноподібний фактор росту-1 та вже нам відомий ФРСЕ [25]. Активовані IP фсфорилюють членів родини субстратів інсулінових рецепторів (CIP), призводячи надалі до активації внутрішньоклітинних ферментів фосфоінозитид-3-кінази (ФІ3К) та Akt-кінази (Akt, також відомої як протеїнкіназа B), яка, у свою чергу, фосфорилює та активує eNOC [26] або стимулює експресію гена eNOC [27]. Akt фосфорилює eNOC за Ser1177 або Thr308, що призводить до підвищення активності ферменту, а також зростання його відповідей на інші стимули [28]. Таким чином, за фізіологічних умов інсулін посилює NO-опосередковану вазодилатацію. Однак за умов інсулінорезистивності спостерігається зниження інсулін-опосередкованої сигналізації через шлях CIP/ФІ3К [24], що призводить до зниження утилізації глюкози [28], пригнічення синтезу NO [19], зростання експресії ET-1 [24] та зниження ендотелій-залежної вазодилатації [19, 24, 28].

За умов інсулінорезистивності ПКС-β_2 [27, 29] та ПКС-δ [30] пригнічують ФІ3К та Akt в ендотеліоцитах, знижуючи фосфорилювання eNOC [19, 23, 24, 29]. Було показано, що активація ПКС, зокрема ізоформи ПКС-β [23, 24, 29], селективно пригнічує активацію Akt та eNOC інсуліном в ендотеліоцитах діабетичних тварин [24] та пацієнтів [23, 29] через зниження фосфорилювання Akt за Ser473 та eNOC за Ser1179 [23, 29]. Зростання рівня вільних жирних кислот також може активувати ПКС та знижувати опосередковану субстратом інсулінових рецепторів 1 (CIP-1) активність ФІ3К [22]. Нещодавно було показано, що ПКС фосфорилює субодиницю p85 ФІ3К за Thr86 [24], яка пригнічує активацію інсуліном Akt/eNOC в ендотелії аорти [31] та стегнової артерії [24].

З іншого боку, за умов діабету ПКС

може фосфорилювати CIP-1 та CIP-2 за Ser24 [26], які втрачають при цьому здатність зв'язуватися з ФІЗК та активувати її. Це також призводить до інактивації Akt [27]. Як це було показано на культивованих ендотеліоцитах аорти корів, ПКС-β_2 може фосфорилювати CIP-2 за Ser303 та Ser675, пригнічуючи тим самим викликану інсуліном активацію Akt/eNOC [24]. Встановлено також, що активація ПКС призводить до пригнічення стимульованої інсуліном експресії інформаційної РНК eNOC у культивованих ендотеліоцитах [27].

Участь ПКС у порушенні опосередкованої щільними контактами вазодилатації за умов ЦД. ЕЗГФ також залучений до ендотеліальної дисфункції за умов ЦД, оскільки ЕЗГФ-опосередкована вазодилатація в діабетичних судинах є пригніченою [4, 10]. Вважається, що розслаблення ГМК, яке пов'язане з гіперполяризацією сарколеми, не залежить від дії NO або простацикліну, які вивільняються ендотелієм, а опосередковується ЕЗГФ [32]. Природа ЕЗГФ залишається остаточно не з'ясованою, однак, найімовірніше він не є справжнім хімічним медіатором. Більшість дослідників схиляються до думки про те, що ЕЗГФ є гіперполяризацією мембрани ендотеліоцитів, яка поширюється на мембрану ГМК через міоендотеліальні щільні контакти (МЕЩК) [32, 33].

Прямі комунікації в ендотеліальному шарі та шарі ГМК, а також між ними за участю щільних контактів (ЩК), є важливим модулятором судинного тонусу та суттєві для контролю й координації нормальних судинних функцій [32, 33]. Судинні ЩК складаються з міжклітинних каналів, які безпосередньо сполучають цитоплазму сусідніх клітин, дозволяючи проходженню електричного струму та дрібних сигнальних молекул [33]. У судинній стінці ЩК складаються з чотирьох протеїнів, що мають назву конексини (Cx, зокрема Cx37, Cx40, Cx43 та Cx45) та утворюють один канал – конексон, який разом із конексоном мембрани протилежної клітини формує повний міжклітинний канал [34]. Ендотелій поєднаний з внутрішнім шаром ГМК за допомогою МЕЩК [33]. Електричні та біохімічні властивості ЩК регулюються фосфорилюванням та дефосфорилюванням конексинів, змінами концентрації Ca^{2+}, а також на рівні транскрипції та трансляції [35]. Важливо також зазначити, що фосфорилювання конексинів є дуже чутливим до концентрації глюкози із залученням ПКС-опосередкованих сигнальних шляхів [35, 36].

Діабетичний стан може безпосередньо впливати на міоендотеліальні міжклітинні комунікації. Показано, що найчутливішою до дії гіперглікемії є функція ЩК у резистивних судинах [7]. Показано, що рівень експресії ендотеліальних Cx37 та Cx40 та відповідно ЩК, сформованих цими білками, є зниженим у різних судинних регіонах мишей із СТЗ-індукованим діабетом I типу [37]. Довготривала гіперглікемія також призводить до пригнічення ендотеліальних ЩК, що містять Cx37 та Cx40, в аорті мишей [38]. Як це встановлено на дрібних мезентеріальних артеріях щурів з ожирінням лінії Zucker, рівень РНК та рівень білка Cx40 є зниженим та корелює з пригніченням ендотелій-залежної вазодилатації [39]. З іншого боку, багато досліджень свідчать про те, що високий рівень глюкози призводить до пригнічення Cx43 в ендотелії, що має відношення до розвитку діабетичної ретинопатії [40] та еректильної дисфункції за ЦД [41]. Inoguchi та співавтори показали, що в ендотеліальних клітинах аорти корів гіперглікемія пригнічує комунікації через ЩК за участю ПКС [36]. Подібні результати було отримано для мікросудин сітківки ока щурів з СТЗ-індукованим діабетом [42]. Також встановлено, що підвищений рівень глюкози через ПКС-опосередковане фосфорилювання Cx43 може впливати на активність ЩК в культивованих ГМК аорти корів [43].

Участь ПКС у збільшенні опосередкованої ендотеліном-1 вазоконстрикції за умов ЦД. ЕТ-1 є пептидом, що складається з 21 амінокислоти та синтезується судинним ендотелієм [44]. Це потужний вазоконстриктор, який бере участь у регуляції судинного тонусу як

за фізіологічних, так і патофізіологічних умов [45]. За умов діабету та гіперглікемії спостерігається зростання експресії та секреції ЕТ-1 в ендотелії, що відіграє важливу роль у розвитку гіпертонусу судинної стінки [1, 45, 46]. Дослідження ролі ЕТ-1 у розвитку патологічних змін ретинальної гемодинаміки за умов ЦД показали, що надмірна експресія ЕТ-1 пов'язана з активацією ПКС, зокрема ПКС-β_2 та ПКС-δ [46], що призводить до зниження кровотоку в сітківці та ретинопатії [47]. Також за умов інсулінорезистентності було встановлено, що надекспресія ПКС-β в ендотеліоцитах призводить до пригнічення інсулін-індукованої сигналізації та посилення експресії ЕТ-1, призводячи до ендотеліальної дисфункції [24]. Показано, що ПКС може викликати зростання експресії ЕТ-1 через шлях, опосередкований міоген-активованими протеїнкіназами (МАПК) [47]. Добре задокументовано, що цей механізм, як мінімум, може залучати активацію кінази, що активується позаклітинним сигналом (КПС, або англійською ERK), одного з членів МАПК з боку ПКС-β_2 [46]. Встановлено також, що зростання скоротливості стінки аорти та коронарних артерій за ЦД I типу у відповідь на ЕТ-1 пов'язано зі збільшенням активності ПКС [48]. Опосередковане ПКС-β зростання експресії ЕТ-1 також залучене до порушення ниркової гемодинаміки за умов ЦД [49, 50].

Участь ПКС у збільшенні опосередкованої простаноїдами вазоконстрикції за умов ЦД. Простаноїди є кінцевим продуктом трансформації арахідонової кислоти. Вона вивільняється з плазматичної мембрани під дією фосфоліпаз і потім трансформується за участю двох ізоформ циклооксигенази (ЦОГ), ЦОГ-1 та ЦОГ-2, а в подальшому – специфічних ізомераз [51]. Утворені за участю ЦОГ простаноїди відіграють важливу роль у діабетичних судинних ускладненнях та залучені до розвитку ендотеліальної дисфункції внаслідок гіперглікемії [11, 51]. Як це показано в ендотеліальних клітинах аорти людини, гіперглікемія викликає ПКС-залежне зростання експресії індукованої ЦОГ-2, що призводить до збільшення синтезу $ТКА_2$ та зниження утворення простацикліну (або простагландину I_2, $ПГI_2$) [11]. При цьому активація ПКС може викликати eNOC-залежне утворення пероксинітриту та інактивацію $ПГI_2$-синтази (ПГІС) через нітрацію її тирозину [11]. ПГІС є ферментом, що каталізує синтез $ПГI_2$ із загального попередника всіх простагландинів – простагландину H_2 ($ПГH_2$) [11]. Утворення вазоактивного ейкозаноїду $ПГE_2$ також збільшується в ендотелії діабетичних судин [51, 52]. До того ж було показано, що вазоконстрикторний ефект $ПГE_2$ та агоніста рецепторів простагландину Е 1 та 3 (ЕР1-/ЕР3) – сульпростону підвищений в очеревинних артеріях щурів з ЦД II типу та чутливий до селективного пригнічення ПКС-δ [51]. Як свідчать автори цього дослідження, викликане діабетом зростання опосередкованої ЕР3 вазоконстрикції є результатом активації ПКС-δ [51].

1. *Sena C. M.* Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease / C. M. Sena, A. M. Pereira, R. Seiça // Biochem. Biophys. Acta. – 2013. – V. 1832, № 12. – P. 2216–2231.
2. *Cotter M. A.* Effects of protein kinase Cβ inhibitor LY333531 on neural and vascular function in rats with streptozotocin-induced diabetes / M. A. Cotter, A. M. Jack, N. E. Cameron // Clin. Sci. – 2002. – V. 103. – P. 311–321.
3. Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat / Matsumoto T., Ishida K., Nakayama N. [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2009. – V. 296. – P. H1388–H1397.
4. *Leo C. H.* Impairment of both nitric oxidemediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes / C. H. Leo, J. L. Hart, O. L. Woodman // Br. J. Pharmacol. – 2011 B. – V. 162. – P. 365–377.
5. PKC-δ isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat / Klymenko K. I., Novokhatska T. V., Kizub I. V. [et al.] // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. – 2014 (in press).
6. Inhibition of protein kinase Cbeta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans / Beckman J. A., Goldfine A. B., Gordon M. B. [et al.] // Circ. Res. – 2002. – V. 90. – P. 107–111.

7. Effect of gap junction uncoupler heptanol on resistance arteries reactivity in experimental models of diabetes, hyperlipemia and hyperlipemia-diabetes / A. Georgescu, N. Alexandru, E. Constantinescu [et al.] // Vasc. Pharm. – 2006. – V. 44. – P. 513–518.
8. *Kolluru G. K.* Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing / G. K. Kolluru, S. C. Bir, C. G. Kevil // Int. J. Vasc. Med. – 2012. – V. 2012. – P. 1–30.
9. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes / D. Pitocco, F. Zaccardi, E. Di Stasio [et al.] // Rev. Diabet. Stud. – 2010. – V. 7. – P. 15–25.
10. *Gao X.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes / Gao X., Martinez-Lemus L. A., Zhang C. // World J. Cardiol. – 2011. – V. 3, № 1. – P. 25–31.
11. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species / F. Cosentino, M. Eto, P. De Paolis [et al.] // Circulation – 2003. – V. 107. – P. 1017–1023.
12. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus / Hink U., Li H., Mollnau H. [et al.] // Circ. Res. – 2001. – V. 88. – P. E14–E22.
13. *Moncada S.* The L-arginine–nitric oxide pathway / S. Moncada, A. Higgs // N. Engl. J. Med. – 1993. – V. 329. – P. 2002–2012.
14. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C / Hirata K., Kuroda R., Sakoda T. [et al.] // Hypertension. – 1995. – V. 25. – P. 180–185.
15. Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKCα / I. Fleming, A. Mohamed, J. Galle [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2005. – V. 65, № 4. – P. 897–906.
16. *Förstermann U.* Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling / U. Förstermann, H. Li // Br. J. Pharmacol. – 2011. – V. 164. – P. 213–223.
17. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca^{2+}/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity / I. Fleming, S. Fisslthaler, B. E. Dimmeler [et al.] // Circ. Res. – 2001. – V. 88, № 11. – P. E68–E75.
18. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein pinase / Michell B. J., Chen Z. P., Tiganis T. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 21. – P. 17625–17628.
19. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms / J. A. Kim, M. Montagnani, K. K. Koh [et al.] Circulation. – 2006. – V. 113. – P. 1888–1904.
20. Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization / Suzuma K., Takahara N., Suzuma I. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 721–726.
21. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells / Inoguchi T., Li P., Umeda F. [et al.] // Diabetes. – 2000. – V. 49. – P. 1939–1945.
22. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity / Dresner A., Laurent D., Marcucci M. [et al.] // J. Clin. Invest. – 1999. – V. 103. – P. 253–259.
23. Protein kinase C-beta contributes to impaired endothelial insulin signaling in humans with diabetes mellitus / Tabit C. E., Shenouda S. M., Holbrook M. [et al.] // Circulation. – 2013. – V. 127. – P. 86–95.
24. Induction of vascular insulin resistance, endothelin-1 expression, and acceleration of atherosclerosis by the overexpression of protein kinase Cβ isoform in the endothelium / Q. Li, K. Park, C. Li [et al.] // Circ. Res. – 2013. – V. 113. – P. 418–427.
25. Akt pathway is hypoactivated by synergistic actions of diabetes mellitus and hypercholesterolemia resulting in advanced coronary artery disease / Shannon R. P., Birnbaum M. J., Wilensky R. L. [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2010. – V. 299. – P. H699–H706.
26. *Guo S.* Molecular basis of insulin resistance: the role of IRS and Foxo1 in the control of diabetes mellitus and its complications / S. Guo // Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. – 2013. – V. 10, № 1–2. – P. e27–e33.
27. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo*: a specific vascular action of insulin / Kuboki K., Jiang Z. Y., Takahara N. [et al.] // Circulation. – 2000. – V. 101. – P. 676–681.
28. Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients / Okon E. B., Chung A. W., Rauniyar P. [et al.] // Diabetes. – 2005. – V. 54. – P. 2415–2423.
29. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance / Naruse K., Rask-Madsen C., Takahara N. [et al.] // Diabetes. – 2006. – V. 55. – P. 691–698.
30. PKCdelta-mediated IRS-1 Ser24 phosphorylation negatively regulates IRS-1 function / M. W. Greene, M. S. Ruhoff, R. A. Roth [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V. 349. – P. 976–986.
31. Inhibition of insulin signaling in endothelial cells by protein kinase C induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Maeno Y., Li Q., Park K. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287. – P. 4518–4530.

32. *Feletou M.* Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis / M. Feletou, P. Vanhoutte // Pflugers Arch. – 2010. – V. 459, № 6. – P. 863–879.
33. *Figueroa X. F.* Gap junctions in the control of vascular function / X. F. Figueroa, B. R. Duling // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – V. 11, № 2. – P. 251–266.
34. *Brisset A. C.* Connexins in vascular physiology and pathology / A. C. Brisset, B. E. Isakson, B. R. Kwak // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – P. 11, № 2. – P. 267–282.
35. *Lin D.* Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C1 domain: effects on gap junctions / D. Lin, D. J. Takemoto // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 13682–13693.
36. Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes / Inoguchi T., Yu H. Y., Imamura M. [et al.] // Med. Electron. Microsc. – 2001. – V. 34. – P. 86–91.
37. Downregulation of connexin40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice / Makino A., Platoshyn O., Suarez J. [et al.] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – V. 295. – P. C221–C230.
38. Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice: recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment / Yeh H. I., Lu C. S., Wu Y. J. [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – V. 23. – P. 1391–1397.
39. Reduced EDHF responses and connexin activity in mesenteric arteries from the insulin-resistant obese Zucker rat / Young E. J., Hill M. A., Wiehler W. B. [et al.] // Diabetologia. – 2008. – V. 51. – P. 872–881.
40. *Li A. F.* High glucose-induced downregulation of connexin 43 expression promotes apoptosis in microvascular endothelial cells. Invest. Ophthalmol / A. F. Li, S. Roy // Vis. Sci. – 2009. – V. 50. – P. 1400–1407.
41. Expressions of eNOS and connexin 43 in the penile tissue of rats with diabetic erectile dysfunction / Chen W. G , Zhu X. F., Hou J. Q. [et al.] // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2008. – V. 14. – P. 427–430.
42. Diabetes-iduced disruption of gap junction pathways within the retinal microvasculature / H. Oku, T. Kodama, K. Sakagami [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2001. – V. 42. – P. 1915–1920.
43. High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells / Kuroki T., Inoguchi T., Umeda F. [et al.] // Diabetes. – 1998. – V. 47. – P. 931–963.
44. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells / Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S. [et al.] // Nature. – V. 1988. – V. 332. – P. 411–415.
45. *Ergul A.* Endothelin-1 and diabetic complications: focus on the vasculature / A. Ergul // Pharmacol. Res. – 2011. – V. 63. – P. 477–482.
46. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation / Park J. Y., Takahara N., Gabriele A. [et al.] // Diabetes. – 2000. – V. 49. – P. 1239–1248.
47. Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes / Yokota T., Ma R. C., Park J. Y. [et al.] // Diabetes. – 2003. – V. 52. – P. 838–845.
48. *Tickerhoof M. M.* Alterations in rat coronary vasoreactivity and vascular protein kinase C isoforms in Type 1 diabetes / M. M. Tickerhoof, P. A. Farrell, D. H. Korzick // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – V. 285. – P. H2694–H2703.
49. Association between endothelin-1 and collagen deposition in db/db diabetic mouse kidneys / Mishra R., Emancipator S. N., Kern T. S. [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V. 339. – P. 65–70.
50. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C β-null mice / Y. Ohshiro, R. C. Ma, Y. Yasuda [et al.] // Diabetes. – 2006. – V. 55. – P. 3112–3120.
51. Protein kinase C delta contributes to increase in EP3 agonist-induced contraction in mesenteric arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats / K. Ishida, T. Matsumoto, K. Taguchi [et al.] // Eur. J. Physiol. – 2012. – V. 463. – P. 593–602.
52. *Ayalasomayajula S.* P. Inhibition of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E2 secretion from diabetic rat retinas / Ayalasomayajula S. P., Amrite A. C., Kompella U. B. // Eur. J. Pharmacol. – 2004. – V. 498. – P. 275–278.

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

Участь протеїнкінази С (ПКС) у механізмах порушення судинного тонусу за умов цукрового діабету. Частина 3

Ендотеліальні клітини беруть активну участь у регуляції судинної реактивності шляхом вивільнення великої кількості важливих судинорозширюючих та судинозвужуючих факторів. Ендотеліальна дисфункція є одним з важливих компонентів розвитку судинної дисфункції при цукровому діабеті (ЦД) внаслідок гіперглікемії та ендотеліальної інсулінорезистентності. У першу чергу, діабетична ендотеліальна дисфункція проявляється в розвитку дисбалансу в дії судинорозширюючих та судинозвужуючих субстанцій, що продукуються ендотелієм. Активація протеїнкінази С (ПКС) у судинному ендотелії за ЦД може викликати порушення ендотелій-залежної вазодилатації за рахунок пригнічення шляхів, пов'язаних із синтезом та вивільненням оксиду азоту II (NO), реалізацією дії ендо-

телій-залежного гіперполяризуючого фактора (ЕЗГФ) за участі міоендотеліальних щільних контактів (ЩК) та зниження утворення простацикліну (або простагландину I_2, $ПГI_2$). З іншого боку, при ЦД активація ПКС призводить до підсилення ендотелій-залежної вазоконстрикції за рахунок підсилення вивільнення ендотеліну-1 (ЕТ-1), простагландину E_2 ($ПГE_2$) та тромбоксану A_2 ($ТКA_2$). До розвитку ПКС-опосередкованої ендотеліальної дисфункції за ЦД також є залученою експресія фактора росту судинного ендотелію (ФРСЕ), а також активація НАДФН-оксидаз, що призводить до посилення утворення реактивних форм кисню.

Ключеві слова: цукровий діабет, ендотелій, гіперглікемія, протеїнкіназа С, реактивні форми кисню, судинний тонус, судинні гладенькі м'язи

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

Участие протеинкиназы С (ПКС) в механизмах нарушения сосудистого тонуса при сахарном диабете. Часть 3

Эндотелиальные клетки принимают активное участие в регуляции сосудистой реактивности путем освобождения большого количества важных сосудорасширяющих и сосудосуживающих факторов. Эндотелиальная дисфункция является одним из важных компонентов развития сосудистой дисфункции при сахарном диабете (СД) вследствие гипергликемии и эндотелиальной инсулинорезистентности. В первую очередь, диабетическая эндотелиальная дисфункция проявляется в развитии дисбаланса в действии сосудорасширяющих и сосудосуживающих субстанций, продуцируемых эндотелием. Активация протеинкиназы С (ПКС) в сосудистом эндотелии при СД может вызывать нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации за счет угнетения путей, связанных с синтезом и выделением оксида азота II (NO), реализацией действия эндотелий-зависимого гиперполяризующего фактора (ЭЗГФ) при участии миоэндотелиальных плотных контактов (ПК) и снижения образования простациклина (или простагландина I_2, $ПГI_2$). С другой стороны, при СД активация ПКС приводит к усилению эндотелий-зависимой вазоконстрикции за счет усиления освобождения эндотелина-1 (ЕТ-1), простагландина E_2 ($ПГE_2$) и тромбоксана A_2 ($ТКA_2$). В развитие ПКС-опосредованной эндотелиальной дисфункции при СД также вовлечена экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия (ФРСЕ) и активация НАДФН-оксидаз, что приводит к увеличению образования реактивных форм кислорода.

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

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

Protein kinase C (PKC) participation in mechanisms of vascular tone abnormality in diabetes mellitus. Part 3

Endothelial cells actively regulate vascular reactivity by releasing a variety of relaxing and contracting factors. Endothelial dysfunction is the one of the most important components of vascular dysfunction in diabetes mellitus (DM) as a result of hyperglycaemia and endothelial insulin-resistance. Endothelial dysfunction is a systemic pathological condition broadly defined as an imbalance between vasodilating and vasoconstricting mediators produced by the endothelium. In diabetes activation of endothelial protein kinase C (PKC) results in endothelium-dependent vasodilator dysfunction by inhibiting vasodilatation mediated by nitric oxide II (NO) synthesis and release, effect of endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) via myoendothelial gap junctions (GJ), and synthesis of prostacyclin (or prostaglandin I_2, PGI_2). On the other hand, PKC activation in DM results in increasing endothelium-dependent vasoconstriction mediated by endothelin-1 (ET-1), prostaglandin E_2 (PGE_2), and thromboxane A_2 release. PKC-mediated endothelial dysfunction in diabetes also involves vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and NADPH oxidases (Nox) activation leading to increased reactive oxygen species (ROS) production.

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

Надійшла: 14.03.2015 р.

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

УДК 616.832-004-085

О. О. Нефьодов, В. Й.Мамчур

Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ

Ключові слова: розсіяний склероз, доказова медицина, фармакотерапія, стандарти лікування

Розсіяний склероз (РС) – хронічне прогресуюче демієлінізуюче захворювання ЦНС, яке в більшості випадків має хвилеподібний перебіг зі зміною періодів загострень та ремісії на ранніх стадіях захворювання, та характеризується, насамперед, неухильним прогресуючим темпом розвитку [1, 2].

РС є мультифакторіальним захворюванням, в ініціюванні та розвитку якого важливу роль відіграють вірусна інфекція, спадкова схильність, а також зовнішні чинники, зокрема, екологічні. У той самий час питання етіології РС дотепер залишається дискусійним. Нині не викликає сумнівів той факт, що РС є не лише запальним, а й нейродегенеративним захворюванням, що призводить до загибелі аксонів. При цьому аксональне пошкодження спостерігають вже на початкових етапах захворювання. Запальні та дифузні дегенеративні зміни в головному і спинному мозку призводять до розвитку в них атрофічного процесу [3, 4].

За даними Міністерства охорони здоров'я України, останніми роками спостерігається тенденція до зростання захворюваності РС в Україні. Так, якщо в 1999 році було зареєстровано 16 701 випадок захворювання на РС (41,12 на 100 тис. населення), то в 2004 році – 18 144 (47,8 на 100 тис. населення), а в 2005 році – 18 394 (у тому числі 1,5–5,0 % дітей), що становить 48,4 хворих на 100 тис. населення. Лише за останні 5 років показники поширеності РС в Україні зросли на 2,8 %. За останні 20 років поширеність РС в Україні збільшилася в 2,5 разу [5].

© Колектив авторів, 2015

Отже, тенденція до неухильного зростання РС в Україні, розширення вікового діапазону (від 15 до 55–60 років), непередбачуваність перебігу з раптовим загостренням, важкі соціально-економічні умови, погіршення екології дають усі підстави прогнозувати подальший несприятливий розвиток ситуації з появою значної кількості важких та атипових форм цього захворювання. Неухильне прогресування РС, високий рівень інвалідизації в молодому віці свідчать про недостатню ефективність заходів, що застосовуються в Україні для його лікування.

Множинність неврологічних симптомів, відносне поєднання загострень і ремісій з загальним прогресуванням чи без нього та важкість захворювання спричиняють відчутну гетерогенність клінічної картини в таких хворих. Для стандартизації підтипів РС було розроблено наступну класифікацію [6]:

- рецидивуючо-ремітуючий РС (РРРС). У більшості пацієнтів з РС (приблизно в 85 %) спостерігається подальше повне одужання чи залишковий неврологічний дефіцит. РРРС не вважається прогресуючою формою, але резидуальні мікросимптоми можна виявити після кожної екзацербації;
- вторинно прогресуючий РС (ВПРС). Принаймні в 50 % хворих з РРРС він переходить у цю форму, для якої характерне прогресування хвороби з ситуативними рецидивами, невеликими ремісіями та стабільними періодами чи без них;
- первинно прогресуючий РС (ППРС). Приблизно в кожного десятого хворого РС одразу починається з прогресування з нечастими періодами плато і тимчасовим поліпшенням загального стану;

– прогресуючо-рецидивуючий РС (ПРРС). Найрідкісніша форма, що характеризується прогресуванням від самого початку з гострими екзацербаціями та безперервним прогресуванням між загостреннями.

Динаміка захворювання характеризується тим, що в більшості хворих на РС формується прогресуюче погіршення неврологічних функцій. Близько 50 % пацієнтів з діагностованим РС протягом найближчих 10 років потребуватимуть ціпка для пересування; у 90 % хвороба набуде прогресуючих форм у період до 25 років після постановки діагнозу з розвитком клінічно вираженої інвалідності. На час накопичення інвалідизуючих дефектів суттєво впливатиме кількість загострень на початкових стадіях хвороби.

Серед етіологічних факторів розвитку РС виділяють вірусну концепцію, на користь якої свідчать епідемічні спалахи захворювання та зв'язок його дебюту або загострення з перенесеною вірусною інфекцією. Як доказ вірусної причини РС автори численних клінічних досліджень наводять дані про підвищення титру антитіл до вірусів кору, краснухи, паротиту, вітряної віспи, простого герпесу, грипу та парагрипу [7]. Сьогодні найбільший інтерес викликає взаємозв'язок РС з вірусом Епштейн-Барра, який є збудником мононуклеозу. Яким чином вірус Епштейн-Барра може підвищувати вірогідність появи РС, залишається неясним.

Про генетичну схильність до РС свідчать насамперед сімейні випадки, що становлять 2–5 %; при цьому жінки в таких сім'ях хворіють у 5–6 разів частіше, ніж чоловіки; найбільший ризик захворювання мають родичі першого коліна споріднення, передусім – брати та сестри. За даними статистичних досліджень, якщо ризик захворювання на РС для популяції в цілому становить менше ніж 0,2 %, то в сім'ях хворих ризик розвитку захворювання для трьох поколінь – 20 %. Дослідження показників серед близнюків показали, що ризик конкордатності при РС у монозиготних близнюків значно вищий (25,0–40,0 %), ніж у гетерозиготних (3,3–4,7 %), у яких він практично не відрізняється від інших братів і сестер [8].

Серед зовнішніх чинників, що відіграють певну роль у розвитку РС, виділяють географічні та екологічні (збільшення частоти виявлення захворювання в екологічно забруднених районах) [9, 10]. Біла людина, особливо та, яка народилася в Північній Європі, знаходиться в групі найвищого ризику захворіти на розсіяний склероз. Найнижчий ризик у тих осіб, які народилися в Азії, Африці чи Південній Америці. Поширеність РС значно коливається в різних країнах: при цьому має місце «градієнт широти» – збільшення поширеності РС з віддаленням від екватора. З огляду на це, виділено територіальні зони ризику РС залежно від його поширеності. Найбільше поширення РС спостерігають на територіях з прохолодним і вологим кліматом порівняно з теплим і сухим, а також з відповідними природними умовами, складом ґрунту, природних вод, з недостатнім вмістом у них мікроелементів – цинку, міді, кобальту тощо [11].

Симптоми РС різняться залежно від ступеня та місця пошкодження нервової системи. У важких випадках хворі з діагнозом «розсіяний склероз» можуть втратити можливість ходити та говорити. Діагностика РС важка на ранніх стадіях, оскільки симптоми захворювання можуть з'являтися та зникати, іноді навіть на декілька місяців.

Основні зусилля в лікуванні РС мають бути спрямовані на зниження гостроти процесу, ефективне попередження рецидивів, подовження тривалості ремісій, уповільнення темпу інвалідизації, а відтак і підвищення функціональної активності та поліпшення якості життя хворих. Лікування РС на сучасному етапі наших знань базується на автоімунній характеристиці цього захворювання з призначенням імунотропних засобів [12].

Безумовно, дуже важливо при лікуванні хворих на РС діяти відповідно до рекомендацій, що базуються на доказовій базі, не забуваючи використовувати індивідуалізований підхід з урахуванням клінічної форми та типу прогресування захворювання.

Існують 4 рівні (класи) доказовості [13, 14]:

Рівень А: клас I клінічних досліджень, які затверджені регуляторними органами, переконливі й остаточні, є найбільше рекомендованими;

Рівень В: клас I або клас II клінічних досліджень, які передбачають користь та ефективність проведеної терапії, але не затверджені регуляторними органами, є позитивно рекомендованими;

Рівень С: клас III клінічних досліджень, не експериментальні, описові дослідження, як порівняльні, кореляційні чи дослідження «випадок-контроль», є позитивно рекомендованими, але не кінцевими;

Рівень U: клас IV клінічних досліджень, які базуються на клінічному досвіді або документах, або на висновку групи експертів [15].

Лікування РС поділяється на превентивну та симптоматичну терапію. Превентивна терапія – це терапія, що здатна змінювати перебіг захворювання, вона, як правило, є патогенетичною. Препарати превентивного ряду не припиняють розвиток РС повністю, тобто вони є частково ефективними, але суттєво знижують його активність, в оптимальному випадку практично призупиняючи патологічний процес. Препарати превентивного ряду є препаратами першого вибору, поки не доведені переваги інших методів лікування [16].

У свою чергу всі засоби превентивної терапії умовно поділяють на препарати першої лінії патогенетичної терапії та препарати другої лінії. Останні використовують у разі неефективності чи непереносимості засобів першої лінії патогенетичної терапії. Медикаментозні засоби, що дозволені для лікування хворих на РС, мають різне дозування, шляхи введення й частоту застосування (рисунок).

Невролог, відповідальний за лікування кожного хворого на РС, повинен мати досвід роботи з усіма медикаментозними засобами згідно зі стандартами лікування, незважаючи на їхню відсутність у деяких випадках.

Так, згідно з рекомендаціями «Протоколу введення хворих на РС», необхідно починати терапію з гормональних засобів. Глюкокортикоїди є основними засобами для лікування загострень РС (рівень доказовості А). Найефективнішим засобом даної групи є метилпреднізолон для в/в використання (так звана пульс-терапія) – рівень доказовості А. Також використовується дексаметазон для парентерального застосування та преднізолон для прийому внутрішньо. Глюкокортикоїди використовують у всіх хворих на РС для зняття загострення середнього та важкого ступеня перебігу захворюван-

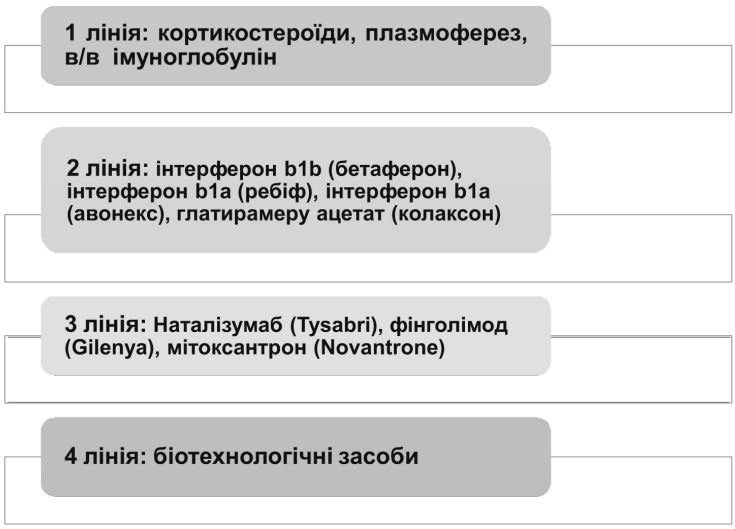


Рисунок. Патогенетичні засоби лікування РС

ня. У хворих із загостренням легкого ступеня неврологічних порушень використання глюкокортикостероїдів показано також при оптичних невритах та симптомах враження стовбуру мозку.

Метилпреднізолон – синтетичний глюкокортикостероїд – аналог преднізолону. За активністю є близьким до преднізолону, але практично не має мінералокортикоїдної активності, що забезпечує кращу переносимість. Препарат виявляє протизапальну, десенсибілізуючу та антиалергічну дію, а також має протишокові, антитоксичні та імунодепресивні властивості. На відміну від цитостатиків, імунодепресивні властивості метилпреднізолону не пов'язані з мітостатичною дією, а є результатом пригнічення різних етапів імуногенезу: міграції стовбурних клітин кісткового мозку, міграції В-клітин і взаємодії Т- і В-лімфоцитів. Подібно до інших кортикостероїдів, метилпреднізолон гальмує вивільнення цитокінів (інтерлейкінів 1 і 2, ig-інтерферону) з лімфоцитів і макрофагів, пригнічує вивільнення еозинофілами медіаторів запалення, знижує метаболізм арахідонової кислоти.

Препарати гормонів гіпофіза, а саме, десмопресин, рекомендується використовувати при нічній затримці сечі (рівень доказовості В).

Десмопресину ацетат – синтетичний аналог натурального гормону задньої долі гіпофіза – аргінін-вазопресину (антидіуретичний гормон). Порівняно з вазопресином, десмопресин виявляє менш виражену дію на гладенькі м'язи судин і внутрішніх органів при більш вираженій антидіуретичній активності, що зумовлено змінами в структурі молекули десмопресину порівняно з молекулою природного вазопресину, дезамінуванням 1-цистеїну і заміною 8-L-аргініну на 8-D-аргінін. Після надходження до організму десмопресин швидко всмоктується. Антидіуретичний ефект настає вже через 30 хв після застосування препарату. Прийом 10–20 мкг десмопресину інтраназально забезпечує в більшості пацієнтів антидіуретичний ефект тривалістю 8–12 год.

Протипухлинні, імунодепресивні (цитостатики) засоби використовують при швидкому прогресуванні захворювання та відсутності ефективності імуномодулюючої (інтерферони – бета) та глюкокортикостероїдної терапії з метою зниження частоти, важкості загострень та темпу прогресування захворювання. Найефективнішим препаратом є мітоксантрон (рівень доказовості В) [17].

Мітоксантрон – синтетичний цитостатичний засіб, похідне антрацендіону, подібний за хімічною структурою до протипухлинних антрациклінових антибіотиків. Механізм протипухлинної дії до кінця не з'ясований. Вважається, що мітоксантрон порушує матричну активність ДНК, інгібує фермент топоізомеразу II. Дія мітоксантрону не залежить від фази клітинного циклу [18].

Серед засобів профілактики та лікування інфекцій на перший план виходить імуноглобулін людини нормальний, який використовують для зменшення частоти та виразності загострень, уповільнення прогресування інвалідизації хворого (рівень доказовості В). Так, імуноглобулін може бути рекомендований наступним групам хворих:

- пацієнтам дитячого віку;
- пацієнтам, які планують вагітність, або в періоді лактації;
- у разі поганої переносимості інтерферону-β і глатірамеру ацетату.

Засоби для лікування РС, що впливають на центральну нервову систему. Хворі з підтвердженим діагнозом РС віком від 18 до 50 років при наявності легкої та помірної інвалідизації чи без неї, у яких було не менше 2 загострень протягом останніх 2 років, мають отримувати лікування інтерферонами – β чи глатірамером ацетатом з метою зниження частоти, важкості загострень (рівень доказовості А), гальмування темпів прогресування захворювання (для інтерферонів – β – рівень доказовості В, для глатірамеру ацетату – рівень доказовості С).

Хворі з клінічно ізольованим синдромом, з характерними ознаками РС при магнітно-резонансній томографії, мають отримувати лікування інтерферонами – β (рівень доказовості А).

Інтерферон – β (Betaferon-Німеччина) – рекомбінований цитокін, що є

антагоністом гама-інтерферону, одного з основних протизапальних та стимулюючих імунну систему цитокінів. Механізм дії інтерферону – β1b при РС невідомий, однак, вірогідно встановлена його ефективність при ремітуючому РС. Лікування починають після гальмування екзацербації глюкокортикоїдами. Засіб водять п/ш через 1 день у різні ділянки тіла (згідно з топографічною схемою) протягом 1–3 років. Вартість лікування досягає 14 тис. доларів США. Можливі ускладнення, а саме, у місці введення засобу (гіперемія, набряк, свербіж), астенічний стан, загальна реакція організму (збільшення температури, болі в суглобах та м'язах та ін.). Виразність системних побічних явищ від використання β-інтерферону-1b зменшується при одночасному використанні пентоксифіліну (1600 мг на 1 добу) чи парацетамолу (600–1000 мг на 1 добу). Повторні курси лікування бетафероном менш ефективні через появу в організмі хворих на РС нейтралізуючих антитіл до цього білка. β-інтеферон-1a (Ребіф (ARES-Serono) чи Авонекс (Biogen) за своєю хімічною структурою подібні до природного інтерферону та мають більшу активність, ніж β-інтерферон – 1b. Засіб уводять п/ш 1 раз на 1 тиждень у дозі 6–9 МОД. Курс лікування – 1–2 роки. Побічні ефекти спостерігають у 80 % хворих, але вони менш виразні, ніж при лікуванні бетафероном. β-інтерферон–1b був затверджений Food and Drug Administration як засіб для лікування РС у США при дотриманні конкретних рекомендацій щодо його застосування [19].

Глатирамер ацетат – конкурує з основним білком мієліну, а також олігодендроцитарним глікопротеїном мієліну та протеоліпідним білком за зв'язування з молекулами головного комплексу гістосумісності класу II на поверхні клітин, що несуть антигени. Препарат стимулює утворення антиген-специфічних Т-лімфоцитів, блокує мієлін-специфічні автоімунні реакції, що зумовлюють руйнування мієлінової оболонки нервових волокон (демієлізація) при РС, у разі лікування хворих на РС ремітуючого перебігу зменшує частоту загострень і уповільнює розвиток необоротних неврологічних порушень.

Протисудомні засоби мають бути використані для лікування епілептичних припадків у хворих на РС (карбамазепін, вальпроати, ламотриджин та ін.). У разі наявності у хворого синдрому хронічної втоми використовують засіб амантадин (рівень доказовості С). У разі наявності у хворих на РС тривожних станів, невротичних реакцій, порушень сну застосовують анксіолітики (транквілізатори) та снодійні препарати. Серед анксіолітиків використовують, головним чином, бензодіазепіни (діазепам, алпразолам, лоразепам, клоназепам та ін.) [20].

Таким чином, сучасні стандарти лікування РС дозволяють обирати низку засобів для покращання якості життя хворих. Сьогодні велика кількість нових ефективних ліків знаходиться на етапі доклінічних експериментів та клінічних досліджень. У зв'язку з покращанням діагностики РС, появою сучасних високоефективних технологій та нових ліків існують великі сподівання щодо впровадження в медичну практику нових лікарських засобів з високим рівнем доказовості (А).

1. Clinical neuroimmunology: multiple sclerosis and related disorders / Syed A. Rizvi, Patricia K. Coyle, O. E. Ferraro [et al.]. – V. XIV. – New York : Humana, 2011. –– 404 p.
2. Multiple sclerosis and related disorders: clinical guide to diagnosis, medical management, and rehabilitation / Alexander Rae-Grant, Robert J. Fox, François Bethoux [et al.]. – V. XIV. – New York : Demos Medical, 2013.– 325 p.
3. *Негрич Т. І.* Дослідження впливу солумедролу на процес апоптозу при розсіяному склерозі / Т. І. Негрич // Укр. мед.часопис. – 2007. – № 3 – С. 54–60.
4. *Міщенко Т. С.* Стан неврологічної служби в Україні / Т. С. Міщенко // Здоров'я України. – 2006. – № 23/1 (додатковий). – С. 9–24.
5. *Волошина Н. П.* Обґрунтування лікування розсіяного склерозу // Міжнародний неврологічний журнал / Н. П. Волошина. – 2006. – № 4. – С. 91–98.

6. *Негрич Т. І.* Порівняльна характеристика клініко-патогенетичних ознак розсіяного склерозу у віковому аспекті / Т. І. Негрич, М. С. Шоробура // Міжнародний неврологічний журнал. – 2009. – № 6 (28). – С. 74–81.
7. Environmental Factors and Multiple Sclerosis Severity: A Descriptive Study / D. Mandia , O. E. Ferraro, G. Nosari [et al.] / Int. J. Environ Res Public Health. – 2014. – V. 11 (6). – P. 6417–6432.
8. *Гусев Е. И.* Рассеянный склероз: достижения десятилетия / Е. И. Гусев // Журнал неврологии и психиатрии. – 2007. – № 4. – С. 4–15.
9. The effects of massage therapy on multiple sclerosis patients' quality of life and leg function / B. Schroeder, J. Doig, K. Premkumar [et al.] [Електронний ресурс] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2014. – P. 345-349. – Режим доступу : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949078.
10. Клиническая характеристика гендерных различий при разных типах течения рассеянного склероза [Електронний ресурс] / В. В. Василовский, Н. П. Волошина, Т. В. Негреба [и др.] // Міжнародний неврологічний журнал. – 2013. – № 6 (60). – С. 23–30. – Режим доступу: http://www.mif-ua.com/archive/article_print/11424.
11. Regional but Not Global Brain Damage Contributes to Fatigue in Multiple Sclerosis / M. A. Rocca, L. Parisi, E. Pagani [et al.] [Електронний ресурс] // Radiology. – 2014. – V. 56 (123). – P. 1271–1278. – Режим доступу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
12. *Гапонов І. К.* Гендерні та вікові особливості порушень особистості у хворих на розсіяний склероз / І. К. Гапонов, О. О. Бородавко // Український вісник психоневрології. – 2010. – Т. 18, № 1 (62). – С. 10–14.
13. *Петров В. И.* Медицина, основанная на доказательствах: учебное пособие / В. И. Петров, С. В. Недогода. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 144 с.
14. Клинико-экономический анализ / П. А. Воробьев, М. В. Авксентьева, О. В. Борисенко [и др.]. – [3-е изд]. – Москва : НЬЮДИАМЕД, 2008. – 778 с.
15. Ресурсы по доказательной медицине [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://apps.who.int/rhl/education/Education_EBM/ru/
16. *Гусев Е. И.* Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / Е. И. Гусев, И. А. Завалишин, А. Н. Бойко. – Изд. Миклош, 2004. –526 с.
17. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology / D. S. Goodin, B. G. Arnason, P. K. Coyle [et al.] // Neurology. – 2003. – V. 61. – P. 1332–1338.
18. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double blind, placebo controlled trial / Johnson K. P., Brooks B. R., Cohen J. A. [et al.] // Neurology. – 2001. – V. 57 (Suppl. 5). – P. 16–24.
19. Компания Teva завершает этап включения пациентов в исследование применения глатирамера ацетата (КОПАКСОН) три раза в неделю при рассеянном склерозе, фаза III [Електронний ресурс] // Международный неврологический журнал. – 2011. – Т. 4 (42). – С. 34–39. – Режим доступу: / http://www.mif-ua.com/archive/article/37133.
20. *Завалишин И. А.* Рассеянный склероз: избранные вопросы теории и практики / И. А. Завалишин. – Москва : ООО «Эльф ИПР», 2000. – 640 с.

О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур

Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти

У статті розглянуто загальні напрями лікування розсіяного склерозу (РС). Визначено основні показники захворюваності та поширеності РС у світі й в Україні. Відомо, що в 1999 році було зареєстровано 16 701 випадок захворювання на РС (41,12 на 100 тис. населення), у 2000 році – 18 394 (у тому числі 1,5–5,0 % дітей), що становить 48,4 хворих на 100 тис. населення. За останні 20 років поширеність РС в Україні збільшилася в 2,5 разу. Позначено клінічні форми захворювання, які часто зустрічаються: рецидив-ремітуючий РС (85 % хворих), вдруге прогресуючий РС, первинно-прогресуючий РС і прогресуючий рецидивуючий РС.

Проведено аналіз даних літератури щодо загальноприйнятих патогенетичних і симптоматичних аспектів вибору лікарського засобу для лікування РС. Симптоми РС відрізняються залежно від ступеня й місця пошкодження нервової системи. Лікування РС на сучасному етапі наших знань базується на аутоімунній характеристиці цього захворювання з призначенням імунотропних засобів. Безумовно, дуже важливо при лікуванні хворих на РС діяти відповідно до рекомендацій, які базуються на доказовій базі з урахуванням клінічної форми й типу прогресування захворювання.

Проведено порівняльну фармакодинамічну та фармакокінетичну експертизу сучасних лікарських засобів для лікування розсіяного склерозу. Так, відповідно до рекомендацій «Протоколу ведення хворих з розсіяним склерозом» необхідно починати терапію з гормональних засобів. Глюкокортикоїди є основними засобами в лікуванні загострень при РС (рівень доказовості А). Найефективнішим сьогодні засобом даної групи є метилпреднізолон. У зв'язку з ранньою діагностикою розсіяного склерозу, появою нових технологій і лікарських засобів існує надія на поповнення списку А (ліки з доведеною ефективністю) для лікування досліджуваної патології.

Ключові слова: розсіяний склероз, доказова медицина, фармакотерапія, стандарти лікування

А. А. Нефедов, В. Й. Мамчур

Фармакотерапия рассеянного склероза – современные стандарты

В статье рассмотрены общие направления лечения рассеянного склероза (РС). Определены основные показатели заболеваемости и распространенности РС в мире и в Украине. Известно, что в 1999 году было зарегистрировано 16 701 случай заболевания на РС (41,12 на 100 тыс. населения), в 2000 году – 18 394 (в том числе 1,5–5,0 % детей), что составляет 48,4 больных на 100 тыс. населения. За последние 20 лет распространенность РС в Украине увеличилась в 2,5 раза. Обозначены часто встречаемые клинические формы заболевания: рецидив-ремитирующий РС (85 % больных), вторично прогрессирующий РС, первично-прогрессирующий РС и прогрессирующий-рецидивирующий РС.

Проведен анализ данных литературы общепринятых патогенетических и симптоматических аспектов выбора лекарственного средства для лечения РС. Симптомы РС отличаются в зависимости от степени и места повреждения нервной системы. Лечение РС на современном этапе наших знаний базируется на аутоиммунной характеристике этого заболевания с назначением иммунотропных средств. Безусловно, очень важно при лечении больных РС действовать в соответствии с рекомендациями, которые базируются на доказательной базе с учетом клинической формы и типа прогрессирования заболевания.

Проведена сравнительная фармакодинамическая и фармакокинетическая экспертиза современных лекарственных средств для лечения РС. Так, согласно рекомендациям «Протокола введения больных с рассеянным склерозом» необходимо начинать терапию с гормональных средств. Глюкокортикоиды являются основными средствами в лечении обострений при РС (уровень доказательности А). Наиболее эффективным на сегодняшний день средством данной группы является метилпреднизолон. В связи с ранней диагностикой РС, появлением новых технологий и лекарственных средств существует надежда на пополнение списка А (лекарства с доказанной эффективностью) для лечения изучаемой патологии.

Ключевые слова: рассеянный склероз, доказательная медицина, фармакотерапия, стандарты лечения

A. A. Nefedov, V. I. Mamchur

Pharmacotherapy of multiple sclerosis – modern standards

The article describes the general directions in the treatment of multiple sclerosis (MS). The main indicators of the incidence and prevalence of multiple sclerosis in the world and in Ukraine were identified. It is known that in 1999, there were 16,701 cases in the MS (41,12 per 100 thousand of population), it was already 18 394 (of which 1,5–5,0 % of children) in 2000 year, which is 48,4 per 100 patients thousand population. The prevalence of MS in Ukraine increased in 2,5 times over the past 20 years. Marked frequently encountered clinical forms of the disease: a relapse-remitting MS (85 % patients), secondary progressive MS, primary progressive MS and progressive – recidivous MS were established.

The analysis of generally accepted pharmacological interventios and their selection taken info account pathogenetic and symptomatic aspects for the multiple sclerosis treatment was provided. MS symptoms vary depending on the degree and location of nervous system damage. The treatment of MS now is based on the characteristics of this autoimmune disease with the purpose of immunotropic drugs administration. Of course, it is very important in the MS treatment to act in accordance to recommendations which are based on scientific evidence, taking into account the clinical form and the type of disease progression.

The pharmacodynamic and pharmacokinetic comparative examination of modern drugs for the multiple sclerosis treatment was made. Thus in according to the "Protocol of administration in patients with multiple sclerosis" recommendations the therapy must begin with hormonal agents. Corticosteroids are the main agents in the exacerbations in MS treatment (level of evidence A). Nowadays the most effective tool at this group is methylprednisolone. With the multiple sclerosis early diagnosis, new technologies and medicines, there is hope for the list of A (drugs with proven efficacy) completion for the treatment of this pathology.

Key words: multiple sclerosis, evidence-based medicine, pharmacotherapy, treatment standards

Надійшла: 16.04.2015 р.

Контактна особа: Нефьодов Олександр Олександрович, доцент, кафедра фармакології і клінічної фармакології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», буд. 9, вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49044. Тел.: + 38 0 93 779 32 79. Електронна пошта: e-mail nefedov911@mail.ru

УДК 616.248-085:575

М. В. Хайтович

Фармакогенетика бронхіальної астми

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

Ключові слова: ген, поліморфізм, фармакогенетика, бронхіальна астма

Згідно з епідеміологічними даними, бронхіальна астма (БА) залишається надзвичайно актуальною проблемою, причому серед дитячого населення в багатьох країнах світу відмічається прогресивне зростання поширеності БА. Сучасна медицина пропонує нові підходи до ведення пацієнтів з БА, акцентується увага на ступеневій терапевтичній стратегії, що забезпечує досягнення клінічного контролю. Однак, незважаючи на значні успіхи клінічної фармакології, лікування БА залишається складним завданням. Часто пацієнти з тяжкою формою БА потребують тривалої терапії високими дозами глюкокортикостероїдів (ГКС). У 80 % пацієнтів не досягається адекватний рівень лікувального контролю над БА [1,2], а в 10–20 % хворих діагностують тяжкий перебіг захворювання з проявами терапевтичної резистентності [3,4], що є основою інвалідизації. Важливо виявляти цих пацієнтів на ранніх етапах захворювання, тому що відсутність відповіді на терапію часто призводить до невиправдано високих доз інгаляційних ГКС і β_2-адреноміметиків, і, як наслідок, розвитку побічних ефектів.

Встановлено, що варіабельність відповіді на ряд протиастматичних препаратів залежить від генетичних особливостей організму [5, 6]. Можна припустити, що БА етіологічно не єдина нозологічна форма, проявом чого є широка варіабельність відповіді організму на терапію. Вважається, що генетична детермінованість може бути відповідальна за 60–80 % варіацій відповіді на лікувальні засоби [7], і тому генетичні дослідження є найперспективнішими в розумінні патогенетичних механізмів розвитку терапевтично резистентної БА, а також у пошуку нових діагностичних тестів з високим ступенем чутливості та специфічності. Тому нині все більшого розвитку набуває персоналізована медицина – модель організації медичної допомоги, що базується на виборі діагностичних, лікувальних та профілактичних засобів з урахуванням генетичних, фізіологічних, біохімічних та інших особливостей пацієнта [8]. Персоналізована медицина дозволяє за допомогою сучасних молекулярно-генетичних технологій індивідуалізувати застосування лікарських засобів та зробити фармакотерапію в пацієнтів максимально ефективною, безпечною та економічною [9].

Вивченню зв'язку генетичного варіанту з клінічним перебігом БА та відповіддю на лікування присвячено багато досліджень [10, 11]. При цьому ідентифікуються гени, особливості взаємодії ген – середовище, вивчаються епігенетичні механізми регуляції [12, 13].

Перші роботи з виявлення генів, пов'язаних зі схильністю до БА, було виконано в рамках так званого «кандидатного» картування [5]. Було ідентифіковано декілька десятків генів, доведено їхню участь у патогенезі БА, формуванні асоційованих з нею фенотипів або впливі на ефективність терапії. Так, доведено, що мінливість низки генів може впливати на функцію легень, схильність до БА і тяжкість перебігу [14]. Встановлено вплив генетичних поліморфізмів на вік початку хвороби, фенотипи БА [10, 15].

Перспективним методом представляється «позиційне картування». Цей метод базується на аналізі зчеплення між генами захворювання, що розташовуються в картованій області хромосом, і поліморфними ДНК-маркерами. Використання різних прийомів повногеномного скринінгу дозволило визначити регіони різних хромосом, які містять гени схильності до БА. Особливу увагу привертають ділянки

© М. В. Хайтович, 2015

17q21.1-q21.2, 13q14.1, 11q12.3-q13.1, 10q11.2, 6p21.2-p12, 6p21.3, 6p21.3, 5q32-q34, 5q31.1-q33.1, 5q31-q34, 5q31, 4q13-q21, 2q22 [5]. Досить велика група кандидатних генів, що визначають схильність до розвитку БА, а також ефективність різних протиастматичних препаратів, знаходиться в ділянці 5q31-33. Зокрема, у даній ділянці розташовуються гени β_2-адренорецепторів (ADRB2), генний кластер ІЛ-4, ген рецептора ГКС.

Так, одиночний нуклеотидний поліморфізм специфічного рецептора ІЛ-4 пов'язаний з персистуючим запаленням дихальних шляхів, тяжкими загостреннями БА і підтримкою функціонального пошкодження підслизових мастоцитів, ІЛ-4-залежним шляхом алергічного запалення [16].

Поліморфізм генів металопротеїнази ADAM33, регулятора біосинтезу сфінголіпідів (ORMDL3), гасдерміну B (GSDMB) і ІЛ-4, асоціюється в групі дітей з рецидивуючим свистячим диханням з БА [17], також з ризиком розвитку БА поєднаний поліморфізм rs146456111A/C гена катепсину S [18]. Поліморфізм V4 гена ADAM33 вважається біомаркером ранньої діагностики БА [19].

Зміни в рецепторі ІЛ-6 асоціюються зі зниженням легеневих функцій і більш тяжкими субфенотипами БА [20].

Пов'язаний з розвитком астми генотип G/G екзону 2 (rs41423247) гена глюкокортикоїдного рецептора Bcl1 [21].

У китайській популяції встановлено значимо вищий рівень сироваткового IgE у дітей з атопічною БА з генотипом TT гена CD14 (rs2569190) на відміну від пацієнтів з генотипом CC [22]; у сербській популяції виявлено проективну роль алеля 16Ala при поліморфізмі Ala16Val гена MnSOD [23]. Поліморфізм IL-1RA асоціюється з високим ризиком БА, особливо в кавказькій популяції, тоді як не виявлено асоціацій з поліморфізмом IL-1β -511C/T [24].

Останнім часом вивчають також роль епігенетичних змін і їхній вплив на реакцію на протиастматичну терапію. Епігенетичні впливи є результатом некодуючих структурних змін ДНК, таких як метилювання ДНК або структурні зміни хроматину в гістонах, або внаслідок змін експресії мікроРНК. В експериментальних дослідженнях було вивчено роль мікроРНК у регуляції функції Т-хелперів, подальшому алергічному запаленні дихальних шляхів і продукції Т-клітинами ІЛ-13 [25]. Встановлено зміни в конкретних мікроРНК CD4 і CD8 Т-клітинах при БА [26].

Сьогодні для базисної терапії БА широко використовують чотири основні класи лікарських препаратів: β-адреноміметики; ГКС; теофілін і його похідні; інгібітори лейкотрієнового шляху. Принципово можливі два основні шляхи впливу генетичних факторів на ефективність лікування БА – вплив на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.

Зміни метаболізму лікарського засобу, які пов'язані з алельними варіантами генів, що контролюють його катаболізм, транспорт або екскрецію, вивчали в багатьох дослідженнях. Так, результати фармакокінетичних досліджень 250 здорових дітей різних етнічних груп віком від 1 до 18 років довели, що для підвищення безпеки лікування доцільно перед початком тривалого застосування теофіліну досліджувати поліморфізм гена CYP1A2 і фенотипову активність ізоферменту CYP3A4 [27].

На підставі комплексного обстеження 215 дітей шкільного віку, хворих на БА, встановлено, що клінічні прояви тяжкості бронхообструктивного синдрому не залежать від особливостей ацетиляторного статусу, проте гомозиготність за обома алелями гена глутатіонтрансферази (GSTT1+M1+) асоціюється з більшою тяжкістю нападів, а відсутність Т-алеля у дітей з повільним ацетиляторним фенотипом — з більш частим використанням системних ГКС та дещо кращими результатами дезобструктивної терапії. Генотип GSTT1+ M1+ у хворих з прискореними процесами ацетилювання суттєво підвищував ризик недостатньої ефективності дезобструктивної терапії (відношення шансів 12,4; відносний ризик — 6,4, абсолютний ризик — 50 %) [28].

Актуальним є вивчення механізму генетичного контролю транспорту ГКС з клітини і пов'язаних з ним відмінностей в стероїдчутливості. Ген множинної лікарської стійкості (MDR1) кодує транспортний білок Р-глікопротеїн-170 (Pgp-170), який бере участь в еффлюксі ліпофільних сполук, у тому числі ГКС [29]. Встановлено, що у хворих із тяжкою резистентною БА носійство генотипу 3435CC гена MDR1 підвищує ризик розвитку потреби в системних ГКС у дозі, що перевищує середньотерапевтичну (≥ 4 таблеток) [OR = 20,89 (95 % CI 5,10–85,53)], що може призводити до ятрогенних ускладнень. Висока потреба в β_2-адреноміметиках (понад 8 разів на добу в період загострення) виявлена в хворих із тяжкою резистентною БА з генотипами 3435CC і 3435CT, на відміну від носіїв 3435TT гена MDR1 (p = 0,040).

Відомо, що в дітей з низьким астма-контролем причиною може бути асимптоматичний кислотний рефлюкс. Носії елелів *2, *3, *8, *9 або *10 генотипу CYP2C19 виявляють фенотип низького метаболізму (poor metabolizers – PM). тоді як носії 2 алелів дикого типу – екстенсивного метаболізму (extensive metabolizers – EM). У дітей з низьким метаболізмом через 6 міс лікування лансопразолом відмічається недостатній астма контроль без зв'язку з симптоматикою гастро-езофагеального рефлюксу, що пояснюють пошкодженням відповіді на респіраторну інфекцію у випадку підвищення концентрації в крові інгібіторів протонної помпи [30].

Основна концепція фармакодинамічного підходу полягає в аналізі генетичних відмінностей (зміна здатності клітин-мішеней до зв'язування або до взаємодії з лікарськими препаратами залежно від алельних варіантів генів) у групах хворих, які «відповідають» і «не відповідають» на терапію.

Фармакогеномні дослідження останніх двох десятиліть демонструють, що внаслідок поліморфізму низки генів у пацієнтів з БА змінюється відповідь на бронходилататори. Дані літературних джерел щодо ефективності β_2-агоністів при лікуванні БА неоднорідні, переважають дослідження щодо гена ADRB2, який кодує β_2-адренорецептори. Як відомо, β_2-адренорецептор – трансмембранний протеїн, який після зв'язування з агоністом активує G-протеїн, який опосередковує сигнал, що приводить у кінцевому рахунку до бронходилатації. Введений β_2-адреноміметик зв'язується з β_2-адренорецептором, що призводить до вивільнення β_2-адренорецептор-кінази, активації G-протеїну й аденілатциклази з наступним збільшенням концентрації цАМФ, який стимулює роботу кальцієвого насоса, що перерозподіляє іони кальцію в міоцитах, зі зниженням його концентрації в міофібрилах, а також активує протеїн, що фосфорилює β_2-адренорецептор і G-протеїн. У результаті відбувається розслаблення бронхів усіх калібрів, підвищується скоротливість дихальних м'язів діафрагми, збільшується мукоциліарний кліренс. За рахунок активації аденілатциклазної системи також інгібується процес вивільнення цитокінів, активації тучних клітин, гальмуючи синтез простагландинів, гістаміну.

У кодуючій частині гена ADRB2 (ген невеликий, локалізований на хромосомі 5q31 [31]) виявлено 9 поліморфізмів, 3 з яких змінюють функціональні особливості рецептора, асоційовані з астматичними фенотипами та ефективністю терапії β_2-адреноміметиками. Більшість досліджень фокусується на вивченні впливу двох загальних несинонімічних однонуклеотидних поліморфізмів Arg16Gly і Glu27Gln відповідно +46 і +79 на ADRB2 (рисунок). Частота мінорного алеля Gly16 – близько 40 % [32].

Так, проведено генотипування за Arg16Gly і Glu27Gln 190 пацієнтів з БА, які були рандомізовані на 2 групи: у першій групі пацієнти приймали короткодіючі β_2-агоністи регулярно і за вимогою, у другій – лише за вимогою. Реакція на лікувальний засіб залежала від поліморфізму Arg16Gly β_2-адренорецепторів: у пацієнтів, гомозиготних за Arg16, виявлено більш виражену бронходилатаційну відповідь, ніж у гомозигот за Gly16. Ефект зберігався й через 16 тижнів, коли всі пацієнти повернулися до прийому короткодіючих β_2-агоністів лише за вимогою. При

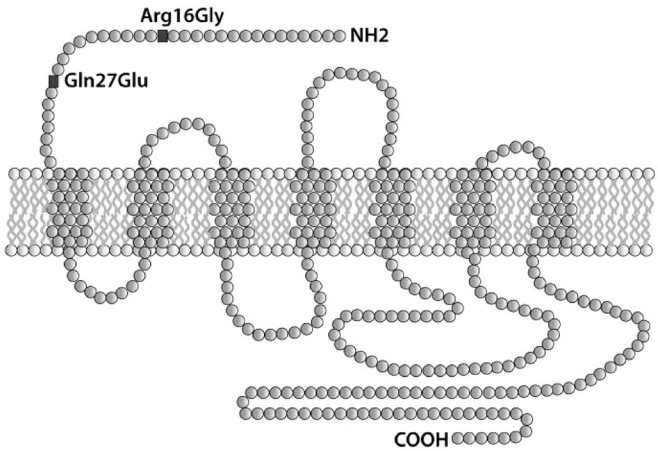


Рисунок. Поліморфізми гена ADRB2 трансмембранного β_2-адренергічного рецептора (Arg16Gly і Gln27Glu локалізуються +47 і +79 відповідно)

цьому контроль хвороби при регулярному застосуванні сальбутамолу в пацієнтів, гомозиготних за Arg16, був нижчим, ніж у гомозигот за Gly16. Так, у хворих, гомозиготних за Arg16, регулярний прийом сальбутамолу (7,2 інгаляції на день) порівняно з його прийомом за потребою (1,3 інгаляції на день) призводив до зниження ранкового та вечірнього значення пікової об'ємної швидкості видиху. У пацієнтів з алелями Gly16 і Gln27, які отримували сальбутамол регулярно або за потребою, були відсутні суттєві зміни ОФВ1 [33].

Поясненням більшої реакції в пацієнтів з генотипом Arg/Arg на одну бронходилататорну дозу сальбутамолу може бути більш висока концентрація β_2-адренорецепторів у них на початку дослідження. Ці результати призвели до першого генотип-стратифікованого, проспективного плацебо-контрольованого дослідження терапії БА [34]. У дослідженні BARGE (Beta-Adrenergic Response by Genotype) 78 пацієнтів рандомізовані на тих, хто регулярно протягом 16 тижнів приймав сальбутамол або плацебо, після чого відбувалася зворотна зміна лікування протягом ще 16 тижнів. У пацієнтів із генотипом Arg/Arg виявлено більш низькі значення пікової об'ємної швидкості видиху під час лікування з регулярним застосуванням сальбутамолу порівняно з плацебо.

Дослідження 269 дітей (у 78 відмічали епізоди свистячого дихання протягом попереднього року) показало, що діти з генотипом Arg16 у 5,3 разу частіше реагували на введення однієї дози сальбутамолу, ніж діти з генотипом Gly16. Не виявлено особливостей реакції на бронходилататор залежно від поліморфізму Glu27Gln і бронходилататорів [35].

При лікуванні тяжких загострень БА і застосуванні високих доз короткодіючих β_2-агоністів відмічена швидка десенситизація рецептора в разі Arg16, тому при даному генотипі слід використовувати інші групи бронхолітиків [36].

Останні геномні дослідження виявили нові генетичні локуси, відповідальні за відповідь на β_2-агоністи [37]. Доведено зв'язок між частотою потрапляння до стаціонару та поліморфізмом Thr164Ile гена ADRB2 [38]. Зі зменшенням експресії гена ADRB2 і бронходилатаційної відповіді асоціюється поліморфізм гена регулятора тривожності ADCYAP1R1 (rs34548976) [39]. Аналіз асоціацій 844 однонуклеотидних поліморфізмів у 111 генах-кандидатах зразків, отриманих від 209 дітей та їхніх батьків у дослідженні швидкої відповіді на інгаляцію β_2-агоністів, дозволив ідентифікувати однонуклеотидний поліморфізм гена Arginase 1 (ARG1), носійство якого достовірно асоційоване з відповіддю на бронходилататори ($p = 0,047$) [40]. Це пояснюється зменшенням кількості аргініну-1, який служить субстратом для синтезу оксиду

азоту, що в свою чергу призводить до зменшення розслаблення гладенької мускулатури бронхів [41].

З урахуванням того, що механізм дії β_2-агоністів є складним і багатофакторним, імовірно, варіабельність відповіді на препарат може визначатись поліморфізмом інших генів. Вивчення міжгенних взаємодій представляєтся перспективним з позиції визначення фармакогенетичних ефектів.

Залежно від терапевтичного ефекту ГКС пацієнтів з БА поділяють на глюкокортикоїд-резистентних і глюкокортикоїд-залежних. Одним з молекулярних механізмів розвитку стероїдрезистентності є дисбаланс ізоформ глюкокортикоїдного рецептора, який може визначати чутливість тканин-мішеней до ГКС. Як відомо, ГКС, зв'язавшись з цитоплазматичним глюкокортикоїдним рецептором, проникають в ядро й взаємодіють з іншими транскрипційними факторами, регулюючи експресію генів-активаторів [5]. Це призводить до пригнічення цитокінових та лейкотрієнових рецепторів, синтезу простагландинів, гіалуронідази, утворення макрофагами цитокінів, що забезпечує протизапальний ефект. Механізм впливу ГКС у разі БА складний і залежить не лише від гена глюкокортикоїдного рецептора, але й інших генів, що кодують Т-клітинні цитокіни (ген ІЛ-4, генний кластер ІЛ 3, 4, 5, 9 тощо).

Перші фармакогенетичні дослідження відповіді на ГКС були присвячені аналізу гена глюкокортикоїдного рецептора (NR3C1), який розташований у хромосомному регіоні 5q31. Найзначущим вважається поліморфізм Val641Asp, асоційований зі зв'язуючою здатністю [42]. Поліморфізм Ile559Asn в екзоні 5 гена NR3C1 навіть при гетерозиготності асоційований з терапевтичною резистентністю, а поліморфізми Val729Ile і Ile747Met екзона 9 поєднуються зі зниженням афінності та транскрипційної активності рецептора [42]. Також виявлено зв'язок порушення чутливості до ГКС з мутаціями гена NR3C1 в екзоні 2 Asn363Ser і Arg23Lys.

Краща реакція на ГКС виявлялася в носіїв поліморфізму rs41423247 гена глюкокортикоїдного рецептора [43].

У ряді робіт продемонстровано зв'язок глюкокортикоїд-резистентності з мутаціями в промоторной ділянці гена IL 4 (заміна C на T у положенні 590), у промоторній ділянці гена фактора некрозу пухлини (TNF a) (заміна A на G в положенні 308); з точковою мутацією Ala576Arg у гені β-імуноглобулінового рецептора тучних клітин (FCERlb). Також отримано дані щодо ефективної дії ГКС у пацієнтів з високим рівнем оксиду азоту (ген індуцибельної синтази оксиду азоту, картований у ділянці 12q24.2-q24.3). Показано, що чутливість до ГКС може визначатися специфічністю гаплотипу інтрону B гена рецептора до глюкагону (GCCR) [44].

У різних популяціях виявлено відмінності ролі поліморфізму гена глюкокортикоїд-індукованої транскрипції 1 (GLCCI1). У популяції північної Європи варіації генотипу GLCCI1 rs37972 не впливали на ефект інгаляційних ГКС [45], тоді як інші дослідники встановили, що в разі тривалого застосування інгаляційних ГКС у японців, хворих на БА, GLCCI1 поліморфізм є фактором ризику зниження легеневих функцій [46].

Також встановлено асоціацію між поліморфізмом гена CRHR1, що кодує рецептор кортикотропін-рилізинг-гормона, і відповіддю на інгаляційні ГКС. Заміна G на T в інтроні 2 гена CRHR1 асоційована з більшою чутливістю до інгаляційних ГКС і збільшенням ОФВ1 у 1,5 разу у відповідь на їхнє застосування [6]. Уважається, що CRHR1 залучений до регуляції ендогенного рівня ГКС і тому може впливати на відповідь на кортикостероїди, які вводяться екзогенно. Алель rs242941* A гена CRHR1 асоційований з необхідністю призначення високих доз інгаляційних ГКС для ефективного контролю БА [47].

Ген TBX21, що кодує транскрипційний регулятор T-bet, також може вносити вклад в ефективність інгаляційних ГКС. Встановлено, що наявність генотипу His33Gln служить предиктором зменшення бронхорелаксації на фоні терапії інгаляційними ГКС у дітей (наявність алеля G супроводжувалася найкращою відповіддю), проте поширеність даного поліморфізму в

популяції європейців досить низька (MAF ~ 0,04), і тому дослідження було виконано на маленькій популяції хворих (n = 5) [6]. В іншому, більш великому дослідженні, ці дані підтвердилися, і було продемонстровано, що поліморфізм His33Gln достовірно асоційований з більш високим контролем хвороби на тлі терапії інгаляційними ГКС. Пізніше ідентифікували ген рецептора нейрокініна 2 (NK2R), поліморфізм Gly231Glu якого асоційований з кращим досягненням контролю в разі терапії інгаляційними ГКС [48]. Механізм даної асоціації, ймовірно, полягає в модуляції активності нейрокініна А, який індукує бронхоконстрикцію та запалення.

Визначено 3 однонуклеотидних поліморфізми гена стресіндукованого фосфопротеїну 1 (STIP1) (адаптер, який регулює функцію HSP70 і бере участь у формуванні гетерокомплексу ГКР): rs4980524 (інтрон 1), rs6591838 (інтрон 1) і rs2236647 (інтрон 5), які пов'язані зі ступенем збільшення ОФВ1 на фоні терапії флунізолідом протягом 4 і 8 тижнів (n = 382). Так, у носіїв поліморфізму rs4980524 з генотипами АА, АС і СС було зареєстровано збільшення ОФВ1 через 4 тижні терапії на 5,10 ± 17,16 %, 5,40 ± 19,00 % і 11,03 ± 24,03 % відповідно (p = 0,044) [49].

Встановлено зв'язок ефективності інгаляційних ГКС з мінливістю також гена FCER2. Так, заміна А на G в інтроні 9 пов'язана з підвищеним ризиком загострень БА у дітей, яким призначали інгаляційні ГКС [50]. Дані були отримані в дослідженні, що включало 311 пацієнтів з БА. Ризик розвитку тяжких загострень у гомозигот СС за цим варіантом склав 3,62 (95 % ДІ 2,02–6,49) порівняно з іншими генотипами. Носійство алеля С асоційоване з підвищеним вмістом IgE. Пізніше ці результати були підтверджені в 2 інших більш великих дослідженнях, до яких увійшли 386 і 939 пацієнтів. Було встановлено, що С-алель асоційована з такими значущими клінічними параметрами, як потреба в медичній допомозі/госпіталізації (OR 1,91; 95% ДІ 1,08–3,40) і відсутність контролю (OR 2,64; 95 % ДІ 1,00–6,98) у популяції пацієнтів, які регулярно отримують інгаляційні ГКС [51].

Ідентифікований CRISPLD2 – ген кандидат, відповідальний за регуляцію антизапального ефекту ГКС на транскрипт гладеньком'язових клітин дихальних шляхів. Експресія CRISPLD2 супроводжується індукцією прозапального цитокіну IL1β, у подальшому підвищується IL1β індукована експресія IL6 і IL8 [52].

У пацієнтів з терапевтично резистентною та чутливою БА було проведено аналіз рівня експресії 11812 генів у мононуклеарах периферичної крові. Модель дослідження побудована на оцінці предикторної здатності профілів генної експресії щодо чутливості до інгаляційних ГКС. За результатами аналізу для 15 генів точність передбачення склала 84 %. Успіх цього дослідження продемонстрував можливість і перспективи генетичного підходу до класифікації пацієнтів за чутливістю до інгаляційних ГКС, фенотипів перебігу хвороби та розробки персоналізованих підходів до терапії [53].

Існують три основні ферменти, що беруть участь у синтезі лейкотрієнів: 5-оксиліпогеназа, LTC4-синтетаза, що відповідає за продукцію цистеніл-лейкотрієну С4, і LTA4-гідролаза, що бере участь у синтезі цистеїніл-лейкотрієну В4. 5-ліпооксигеназа (AL0X5) бере участь в утворенні всіх типів цистеїніл-лейкотрієнів. Встановлено, що при інгібуванні даного ферменту лікарськими препаратами відбувається поліпшення низки показників у хворих на БА. У промоторній області гена AL0X-5 містяться консенсусні сайти зв'язування для декількох транскрипційних факторів – Sp1, Sp3, Erg-1 та ін. Особливе значення мало виявлення G + C послідовності щодо стартового сайту трансляції. У регіонах Sp1, Erg-1 виявлені вставки однієї або делеції однієї або двох GGGCGG-послідовностей. У нормі до консенсусних сайтів зв'язування здатні приєднуватися Sp1, Erg-1 в області промотора. При наявності мутацій відбувається зміна цієї здатності, що в кінцевому підсумку позначається на продукції AL0X-5. Доведено, що в пацієнтів, які мають мутації в цьому гені

(делеції в області консенсусних сайтів зв'язування Sp1, Erg-1 – М-алель), терапія інгібіторами лейкотрієнового шляху практично неефективна і, отже, недоцільна [54].

Натепер ще не достатньо проведених рандомізованих контрольованих досліджень [55], але передбачається, що на основі фармакогенетики будуть визначені генетичні профілі для персоналізованих адаптованих підходів і це дозволить максимізувати терапевтичний ефект для окремих пацієнтів, мінімізуючи ризик побічних проявів [56].

Отже, результати фармакогенетичних досліджень з фармакокінетики та фармакодинаміки протиастматичних лікарських засобів показують широку варіабельність відповіді на них.

Персоналізована медицина – нова галузь сучасної медицини, яка передбачає розробку та застосування методів лікування, «скроєних» спеціально під конкретного пацієнта. Ідея необхідності індивідуального підходу до кожного пацієнта існувала ще на початку виникнення медицини. Висока ефективність сучасних технологій дозволяє проводити широкомасштабні генетичні дослідження та визначати роль генів кандидатів та епігенетичних факторів. Розуміння функціональної біології генетичних варіантів може допомогти визначити біомаркери фенотипів і нові медикаментозні підходи. Зокрема, потребує подальшої розробки проблема генетично зумовленої резистентності до терапії ГКС у пацієнтів з тяжкою БА.

Нові технології дозволяють уточняти причини несприятливих побічних реакцій на генетичному рівні, запобігати, знижувати витрати на лікування та суттєво підвищувати безпеку. Це формує основу для персоналізованого лікування БА і призведе до поліпшення показників здоров'я, більш економічно ефективної допомоги.

1. *Чучалин А. Г.* Мониторирование и лечение тяжелой бронхиальной астмы у взрослых: результаты национального многоцентрового исследования НАБАТ / А. Г. Чучалин, Л. М. Огородова, Ф. И. Петровский // Тер. архив. – 2005. – Т. 77, № 3. – С. 36–42.
2. *Лещенко И. В*. Возможности контроля БА на современном уровне. Актуальные проблемы / И. В. Лещенко, М. Б. Лежнина // Consilium medicum. – 2009. – Экстравыпуск. – С. 2–5.
3. Петровский В. Ф. Выбор фармакотерапии тяжелой БА / В. Ф. Петровский, Л. М. Огородова // Пульмонология. – 2008. – №3. – С. 84–89.
4. IL-4 receptor polymorphisms predict reduction in asthma exacerbations during response to an anti-IL-4 receptoraantagonist / R. E. Slager, B. A. Otulana, G. A. Hawkins [et al.]. // J Allergy Clin Immunol. – 2012. – № 130. – P. 516–522.
5. Генетические основы бронхиальной астмы / А. Ю. Асанов, Л. С. Намазова, В. Г. Пинелис [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2008. – V. 5, №4. [Електронний ресурс].– Режим доступу: http://cyberleninka.ru.
6. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids / K. G.Tantisira, S. Lake, E. S. Silverman [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2004. – № 13. – P. 1353–1359.
7. *Пузырев В. П.* Генетика бронхолегочных заболеваний / В. П. Пузырев, Л. М. Огородова. – Москва : Атмосфера, 2010. – 160 с.
8. Personalized Medicine Coalition. Retrieved 26 April 2014. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.personalizedmedicinecoalition.org/Resources/Personalized_Medicine_ 101.
9. *Кукес В. Г.* Персонализированная медицина в клинической фармакологии / В. Г. Кукес // Биомедицина. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 22–24.
10. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma / M. F. Moffatt, I. G. Gut, F. Demenais [et al.] // N Engl J. Med. – 2010. – № 363. – P. 1211–1221.
11. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse / D. G. Torgerson, E. J. Ampleford, G. Y. Chiu [et al.] // North American populations // Nat Genet. – 2011. – № 43. – P. 887–892.
12. *Kim T. H.* Respiratory reviews in asthma 2013 / T. H. Kim // Tuberc Respir Dis (Seoul). – 2014. – V. 76, № 3. – P. 105–113.
13. Asthma genetics and personalised medicine / D. A. Meyers, E. R. Bleecker, J. W. Holloway, S. T. Holgate // Lancet Respir Med. – 2014. – V. 2, № 5. – P. 405–415.
14. Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma / X. Li, T. D. Howard, W. C. Moore [et al.] // J. Allergy Clin Immunol. – 2011. – № 127. – P. 1457–1465.
15. Genome-wide association study of the age of onset of childhood asthma / E. Forno, J. Lasky-Su, B. Himes [et al.] // J. Allergy Clin Immunol. – 2012. – № 130. – P. 83–90.

16. IL4R alpha mutations are associated with asthma exacerbations and mast cell/IgE expression / S. E. Wenzel, S. Balzar, E. Ampleford [et al.] // Am J. Respir Crit Care Med. – 2007. – № 175. – P. 570–576.
17. An ADAM33 polymorphism associates with progression of preschool wheeze into childhood asthma: a prospective case-control study with replication in a birth cohort study / E. M. Klaassen, J. Penders, Q. Jöbsis [et al.]. // PLoS One. – 2015. – V. 10, № 3. – P. e0119349.
18. Single nucleotide polymorphisms of cathepsin S and the risks of asthmaattack induced by acaroid mites / C. Li, Q. Chen, Y. Jiang, Z. Liu Int // J Clin Exp Med. – 2015. – V. 8, №1. – P. 1178–1187.
19. Association between V4 polymorphism in the ADAM33 gene and asthmarisk: a meta-analysis / W. Zheng, L. Wang, X. Su, X.F. Hu // Genet Mol Res. – 2015. – V. 14, № 1. – P. 989–99.
20. The IL6R variation Asp(358)Ala is a potential modifier of lung function in subjects with asthma / G. A. Hawkins, M. B. Robinson, A. T. Hastie [et al.] // J. Allergy Clin Immunol. – 2012. – № 130. – P. 510–515.
21. BCL1 polymorphism of glucocorticoids receptor gene and bronchial asthma / Kmyta, Orlovskyi, Prystupa, Prystupa // Georgian Med News. – 2015. – № 240. – P. 51–55.
22. Association of CD14 C159T polymorphism with atopic asthmasusceptibility in children from South-eastern China: a case-control study / Y. N. Zhang, Y. J. Li, H. Li [et al.] // Genet Mol Res. – 2015. – V. 14, № 2. – P. 4311–4317.
23. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha and antioxidant enzymes in bronchial asthma / M. Despotovic, T. J. Stoimenov, I. Stankovic [et al.] // Adv Clin Exp Med. – 2015. – V. 24, № 2. – P. 251–256.
24. Association between polymorphism of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist gene and asthma risk: a meta-analysis / Y. He, S. Peng , W. Xiong [et al.] // Scientific World Journal. – 2015. – № 2015. – P. 685–684.
25. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment / A. Collison, J. Mattes, M. Plank [et al.]. // J. Allergy Clin Immunol. – 2011. – № 128. – P. 160–167.
26. Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+T cells in patients with severe asthma / E. Tsitsiou, A. E. Williams, S. A. Moschos [et al.] // J Allergy Clin Immunol. – 2012. – № 129. – P. 95–103.
27. Генетические предикторы эффективности и безопасности теофиллина при лечении бронхиальной астмы у детей / Б. И. Кантемирова, А. К. Стародубцев, Д. А. Сычёв, В. И. Григанов // Казанский медицинский журнал. – 2012. – № 5. – P. 768–772.
28. *Микалюк Л. В.* Фармакогенетичні аспекти дезобструктивної терапії нападів бронхіальної астми в школярів / Л. В. Микалюк // Здоровье ребенка. – 2013. – Т. 45, № 2. [Електронний ресурс].– Режим доступу: http://www.mif-ua.com/archive/article/35818.
29. *Farrell R. O.* Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease / R. O. Farrell, D. Kelleher // J. of Endocrinology. – 2003. – № 178. – P. 339–346.
30. Lansoprazole is Associated with Worsening Asthma Control in Children with the CYP2C19 Poor Metabolizer Phenotype / J. E.Lang, J. T. Holbrook, E. B. Mougey [et al.] // Ann Am Thorac Soc. – 2015. Apr 6. [Epub ahead of print]. [Електронний ресурс].– Режим доступу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844821
31. Polymorphisms in the ADRB2 gene and Graves disease: a case-control study and a meta-analysis of available evidence / X. Chu, Y. Dong, M. Shen [et al.] // BMC Med Genet. – 2009. – № 10. – P. 26.
32. Sequence, haplotype, and association analysis of ADRbeta2 in a multiethnic asthma case-control study / G. A. Hawkins, K. Tantisira, D. A. Meyers [et al.] // Am J. Respir Crit Care Med. – 2006. – V. 174, № 10. – P. 1101–1109.
33. The effect of polymorphisms on the b2adrenergic receptor on the response to regular use of salbuterol in asthma / E. Israel, J. M. Drazen, S. B. Liggett [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – № 162. – P. 75–80.
34. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotypestratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial / E. Israel, V. M. Chinchilli, J. G. Ford [et al.] // Lancet. – 2004. – № 364. – P. 1505–1512.
35. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing / F. D. Martinez, P. E. Graves, M. Baldini [et al.] // J. Clin Invest. – 1997. – № 100. – P. 3184–3188.
36. *Metzger N. L.* Confirmed beta-16Arg/Arg polymorphism in a patient with uncontrolled asthma / N. L. Metzger, D. R. Kockler, L. A. Gravatt // Ann. Pharmacother. – 2008. – V. 42, № 6. – P. 874–881.
37. *Ortega V. E.* Pharmacogenetics of beta2 adrenergic receptor agonists in asthmamanagement / V. E. Ortega // Clin Genet. – 2014. – V. 86, № 1. – P. 12–20.
38. *Lima J. J.* Do genetic polymorphisms alter patient response to inhaled bronchodilators? / J. J. Lima // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2014. – V. 10, № 9. – P. 1231–1240.
39. Stress and Bronchodilator Response in Children with Asthma / J. M. Brehm, S. K. Ramratnam, S. M. Tse [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2015 Apr 28. [Epub ahead of print]. [Електронний ресурс].– Режим доступу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918834.

40. ARG1 is a novel bronchodilator response gene: screening and replication in four asthma cohorts / A. A. Litonjua, J. Lasky-Su, K. Schneiter [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2008. – V. 178, № 7. – P. 688–694.
41. Arginase inhibition protects against allergeninduced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation / H. Maarsingh, A. B. Zuidhof, I. S. Bos [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2008. – V. 178, № 6. – P. 565–573.
42. *Sayers I*. Pharmacogenetic approaches in the treatment of asthma / I. Sayers, I. P. Hall Curr // Allergy Asthma Rep. – 2005. – V. 5, № 2. – P. 101–108.
43. GLCCI1 and Glucocorticoid Receptor Genetic Diversity and Response to Glucocorticoid-Based Treatment of Graft-versus-Host Disease / A. O'Meara, W. Boukouaci, M. Robin [et al.] // Biol Blood Marrow Transplant. – 2015. – Apr 3. [Epub ahead of print]. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843653.
44. *Жданова М. В.* Изучение BCLI полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора у детей с бронхиальной астмой / М. В. Жданова // Педиатрическая фармакология. – 2006. – Т. 3, № 2. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://cyberleninka.ru.
45. Pharmacogenetic analysis of GLCCI1 in three north European pediatricasthma populations with a reported use of inhaled corticosteroids / S. J. Vijverberg, R. Tavendale, M. Leusink [et al.] // Pharmacogenomics. – 2014. – V. 15, № 6. – P. 799–806.
46. *Izuhara Y.* GLCCI1 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids / Y. Izuhara, H. Matsumoto, Y. Kanemitsu // Allergy. – 2014. – V. 69, № 5. – P. 668–673.
47. *Мурзина Р. Р.* Клинико-генетическая значимость полиморфных вариантов генов, ответственных за метаболизм глюкокортикостероидов и β_2-агонистов у детей с бронхиальной астмой : автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Мурзина Р. Р. – Москва, 2014. [Електронний ресурс].– Режим доступу: http://www.dslib.net.
48. Pharmacogenetic study of the effects of NK2R G231E G>A and TBX21 H33Q C>G polymorphisms on asthma control with inhaled corticosteroid treatment / Y. M. Ye, H. Y. Lee, S. H. Kim [et al.] // J. Clin. Pharm. Ther. – 2009. – V. 34, № 6. – P. 693–701.
49. The glucocorticoid receptor heterocomplex gene STIP1 is associated with improved lung function in asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids / G. A. Hawkins, R. Lazarus, R. S. Smith [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – V. 123, № 6. – P. 1376–1383.
50. FCER2: a pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma / K. G. Tantisira, E. S. Silverman, T. J. Mariani [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – V. 120, № 6. – P. 1285–1291.
51. FCER2 T2206C variant associated with chronic symptoms and exacerbations in steroid-treated asthmatic children / E. S. Koster, A. H. Maitland-van der Zee, R. Tavendale [et al.] // Allergy. – 2011. – V. 66, № 12. – P. 1546–1552.
52. RNA-Seq transcriptome profiling identifies CRISPLD2 as a glucocorticoid responsive gene that modulates cytokine function in airway smooth muscle cells / B. E. Himes, X. Jiang, P. Wagner [et al.] // PLoS One. – 2014. – V. 9, № 6. – P. e99625.
53. Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients / H. Hakonarson, U. S. Bjornsdottir, E. Halapi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102. – P. 14789–14794.
54. Influence of leukotriene pathway polymorphisms on response to montelukast in asthma / J. J. Lima, S. Zhang, A. Grant [et al.] // Am J. Respir Crit Care Med. – 2006. – V. 173. – P. 379–385.
55. *Pijnenburg M. W.* Personalized medicine in children with asthma / M. W. Pijnenburg, S. Szefler // Paediatr Respir Rev. – 2015. – V. 16, №2. – P. 101–107.
56. *Ortega V. E.* Asthma pharmacogenetics and the development of genetic profiles for personalized medicine / V. E. Ortega, D. A. Meyers, E. R. Bleecker // Pharmgenomics Pers Med. – 2015. – № 8. – P. 9–22.

М. В. Хайтович

Фармакогенетика бронхіальної астми

Як відомо, у 10–20 % хворих на бронхіальну астму (БА) відмічається тяжкий перебіг захворювання з проявами терапевтичної резистентності, а варіабельність відповіді на низку протиастматичних препаратів залежить від генетичних особливостей організму. У половини пацієнтів виявляється CA і AA генотипи поліморфізму A734C гена CYP1A2, що супроводжується повільним метаболізмом теофіліну й зумовлює небезпеку виникнення побічних реакцій. У хворих з тяжкою резистентною БА поліморфізм 3435CC гена множинної лікарської стійкості (MDR1) підвищує ризик потреби у високих дозах (≥ 4 таблеток на добу) системних глюкокортикостероїдів. У хворих з тяжкою резистентною БА з генотипами 3435CC і 3435CT у період загострення виявлена потреба у високих дозах β_2-адреноміметиків (понад 8 разів на 1 добу).

Реакція на β_2-адреноміметики суттєво залежить від поліморфізму Arg16Gly гена β_2-адренорецепторів: у пацієнтів, гомозиготних за Arg16, відмічається більш виражена бронходилатаційна відповідь на сальбутамол, але нижчий контроль хвороби при його регулярному застосуванні.

Поліморфізм гена Arginase 1 (ARG1) також достовірно асоційований з відповіддю на бронходилататори.

Поліморфізм Ile559Asn в екзоні 5 гена глюкокортикоїдного рецептора (NR3C1) навіть за гетерозиготності асоційований з терапевтичною резистентністю при застосуванні інгаляційних глюкокортикостероїдів (ГКС), також виявлено зв'язок між порушенням чутливості до інгаляційних ГКС та поліморфізмами Asn363Ser і Arg23Lys в екзоні 2 гена NR3C1.

Заміна A на G в інтроні 9 гена β-імуноглобулінового рецептора тучних клітин (FCER2) пов'язана з ризиком загострення БА на фоні терапії інгаляційними ГКС.

Доведено, що в пацієнтів з мутаціями (делеції в області консенсусних сайтів зв'язування Sp1, Erg-1, - M-алель) у гені 5-ліпооксигенази (AL0X-5) терапія інгібіторами лейкотрієнового шляху практично неефективна. Вивчається також роль епігенетичних змін (зокрема, експресії мікроРНК) у реакції на протиастматичну терапію.

Отже, з алельними варіантами генів можуть бути пов'язані зміни метаболізму, транспорту та екскреції ЛЗ, а також зміни здатності клітин-мішеней до зв'язування або до взаємодії з ЛЗ. Вказані фармакогенетичні аспекти необхідно враховувати при фармакотерапії БА.

Ключові слова: ген, поліморфізм, фармакогенетика, бронхіальна астма

Н. В. Хайтович

Фармакогенетика бронхиальной астмы

Как известно, у 10–20 % больных бронхиальной астмой (БА) отмечается тяжелое течение заболевания с проявлениями терапевтической резистентности, а вариабельность ответа на ряд противоастматических препаратов зависит от генетических особенностей организма. У половины пациентов выявляются генотипы CA и AA полиморфизмы A734C гена CYP1A2, что сопровождается медленным метаболизмом теофиллина и обусловливает опасность возникновения побочных реакций. У больных с тяжелой резистентной БА полиморфизм 3435CC гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1) повышает риск потребности в высоких дозах (≥ 4 таблеток в 1 сутки) системных ГКС. У больных с тяжелой резистентной БА с генотипами 3435CC и 3435CT в период обострения обнаружена потребность в высоких дозах β_2-адреномиметиков (более 8 раз в 1 сутки).

Реакция на β_2-адреномиметики существенно зависит от полиморфизма Arg16Gly гена β_2-адренорецепторов: у пациентов, гомозиготных по Arg16, отмечается более выраженный бронходилатационный ответ на сальбутамол, но ниже контроль болезни при его регулярном применении. Полиморфизм гена Arginase 1 (ARG1) также достоверно ассоциирован с ответом на бронходилататоры.

Полиморфизм Ile559Asn в экзоне 5 гена глюкокортикоидного рецептора (NR3C1) даже при гетерозиготности ассоциирован с терапевтической резистентностью при применении ингаляционных ГКС (ГКС), также выявлена связь между нарушением чувствительности к ингаляционным ГКС и полиморфизмами Asn363Ser и Arg23Lys в экзоне 2 гена NR3C1.

Замена A на G в интроне 9 гена β-иммуноглобулинового рецептора тучных клеток (FCER2) связана с риском обострения БА на фоне терапии ингаляционными ГКС.

Доказано, что у пациентов с мутациями (делеции в области консенсусных сайтов связывания Sp1, Erg-1, - M-аллель) в гене 5-липооксигеназы (AL0X-5), терапия ингибиторами лейкотриенового пути практически неэффективна. Изучается также роль эпигенетических изменений (в частности экспрессии микроРНК) в реакции на противоастматическую терапию.

Итак, с аллельными вариантами генов могут быть связаны изменения метаболизма, транспорта и экскреции лекарственных средств (ЛС), а также изменения способности клеток-мишеней к связыванию или к взаимодействию с ЛС. Указанные фармакогенетические аспекты необходимо учитывать при фармакотерапии БА.

Ключевые слова: ген, полиморфизм, фармакогенетика, бронхиальная астма

M. Khaitovych

Pharmacogenetics of bronchial asthma

It is commonly known that 10–20 % patients with bronchial asthma (BA) have severe disease progression with therapeutic resistance manifestation as well as variability in responsiveness to variable antiasthmatic drugs depends on genetic traits. Genotypes CA and AA of A734C polymorphism of CYP1A2 gene occurs mainly in a half of patients with BA that associated with poor metabolism of theophylline and provides development of adverse reactions. Polymorphism 3435CC of the multidrug resistance gene MDR1 enhances a risk of necessity systemic glucocorticoids' high dosage (≥ 4 tab. 1 daily) in patients with severe resistance asthma. Genotypes 3435CC and 3435CT have also been identified to have a necessity of β2-adrenomimetics' high dosage (above 8 times a 1 day) in patients with severe resistance asthma during acute period.

β_2-adrenomimetics' response depends significantly on polymorphism Arg16Gly of β_2-adrenergic receptor gene: Arg16 homozygotes patients have a greater acute response to salbutamol bronchodilation, but they have a less disease control during its regular administration. Genetic polymorphism of Arginase 1

(ARG1) gene is also definitely associated with bronchodilation response.

Polymorphism Ile559Asn of 5 exon of glucocorticoid receptor (NR3C1) gene even in heterozygotes is associated with therapeutic resistance during inhaled glucocorticoids administration; a correlation between susceptibility impairment and polymorphisms Asn363Ser and Arg23Lys of 2 exon of NR3C2 gene was also determined.

Gene substitution A to G of 9 intron of mast cells -immunoglobulin receptor (FCER2) gene is associated with developing a risk of BA exacerbation if to follow treatment with inhaled glucocorticoids.

It has been proved that patients with gene mutations of 5-lipooxigenase AL0X-5 (deletions in consensus sites binding area - Sp1, Erg-1, - M-allele) have practically noneffective drug therapy with inhibitors of leukotriene pathway. Moreover, a role of epigenetic alterations (including microRNA expression) in antiasthmatic therapy reactions has also been elucidated.

Some changes in the metabolism, transport and excretion of drugs are also related to allele gene types as well as the abilities of target-cells to alter regarding binding or medical interaction. As already described, pharmacogenetic aspects should be taken into account in case of BA pharmacotherapy.

Key words: gene, polymorphism, pharmacogenetics, bronchial asthma

Надійшла: 16.04.2015 р.

Контактна особа: Хайтович Микола Валентинович, доктор медичних наук, професор, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 13, бульв. Т. Шевченка, м. Київ, 01601. Тел.: +38 0 44 234 85 59. Електронна пошта: nik3061@gmail.com

УДК 616.831-005.4-036.1-085.21:577.112]-092.9:599.323.4

А. В. Демченко, І. Ф. Бєленічев

Стан глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи мозку білих щурів після корекції цитиколіном модельованої хронічної ішемії

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: хронічна ішемія мозку, тіол-дисульфідна система, глутатіон, нітротирозин, цитиколін

Сьогодні для науковців актуальним є вивчення молекулярно-біохімічних аспектів розвитку церебральної ішемії та розробка ефективної фармакологічної корекції при цій патології [1]. Церебральна ішемія призводить до утворення в тканинах мозку вільних радикалів, які включають ланцюгові реакції «пошкодження» та фрагментацію мембранних фосфоліпідів. Цитотоксичність активованих форм кисню проявляється індукцією процесів ліпопероксидації, інактивацією ферментів і пошкодженням мембранних білків клітин [2]. На цьому фоні активується антиоксидантний захист клітин, одним з компонентів якого є система глутатіону.

Глутатіон відіграє найважливішу роль у життєдіяльності клітин і організму в цілому, та є ключовим внутрішньоклітинним антиоксидантом [3]. Функціонування системи глутатіону впливає на реалізацію низки найважливіших фізіологічних процесів: детоксикацію та антиоксидантний захист; біохімічні перетворення вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти й убіхінону; регуляцію тіол-дисульфідної рівноваги та синтез нуклеїнових кислот; збереження оптимального стану та функцій біологічних мембран; обмін ейкозаноїдів – простагландинів і лейкотрієнів. Глутатіон виступає й як резерв цистеїну в клітині; регулює синтез білків теплового шоку; бере участь у реалізації механізмів програмованої клітинної загибелі [3, 4].

Низкою попередніх досліджень підтверджено важливу роль глутатіону та ферментів його метаболізму в захисті головного мозку від ішемічних ушкоджень [2].

Накопичений клініко-експериментальний матеріал дозволяє виділити систему глутатіону як компонент антиоксидантного захисту та фактор впливу на формування захисних пристосувальних реакцій організму, що включаються при церебральній ішемії [3, 5].

Система глутатіону представлена відновленим глутатіоном та ферментами його метаболізму – глутатіонредуктазою (ГР), глутатіонтрансферазою (ГТ) та глутатіонпероксидазою (ГПО) і важлива для життєдіяльності клітин та організму в цілому, забезпечуючи толерантність нейронів до ішемії [3, 4]. ГПО, входячи до складу антиоксидантної системи, відіграє значну роль у захисті клітин від вільно-радикального окиснення. Позитивний вплив ГПО при церебральній ішемії підтверджують досліди з трансгенними мишами з гіперекспресією ГПО, у яких зростала стійкість до ішемії [5]. При інгібуванні глутатіонзалежних ферментів ГР і ГТ за умов церебральної ішемії відбувається окиснювальна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну і, як наслідок, порушення транспорту оксиду азоту з утворенням його цитотоксичних дериватів, які ще більше посилюють окиснення тіолів. Наявність у нейроні достатньо активної тіолової антиоксидантної системи, яка здатна регулювати транспорт оксиду азоту, забезпечує стійкість клітин до нітрозуючого стресу – найраннішнього нейро-деструктивного механізму за умов ішемії [6].

Відомо, що глутатіон, окрім антиоксидантних властивостей, здатний регулювати процеси синаптичної пластич-

© Колектив авторів, 2015

ності та інгібувати нейродегенерацію в щурів, опосередковано забезпечувати процеси сприйняття, інтеграції та формування короткотривалої пам'яті [7].

Одним з перспективних методів лікування ішемічних ушкоджень мозку є патогенетично обґрунтоване використання препаратів з антиоксидантними (для нормалізації енергетики клітин мозку) та нейрометаболічними (для корекції рецепторної функціональної активності) властивостями [1, 8].

Таким чином, пошук і розробка методів фармакологічної корекції порушень антиоксидантного статусу у разі церебральної ішемії з урахуванням метаболізму системи глутатіону є важливим і перспективним напрямом сучасної фармакології.

Серед сучасних нейропротекторів виділяють препарат, що активує холінергічну трансмісію – цитиколін. Цитиколін відомий також як цитидин-5'-дифосфохолін (ЦДФ-холін), являє собою мононуклеотид, що складається з рибози, цитозину, пірофосфату й холіну. Він є донором холіну при біосинтезі ацетилхоліну та збільшує його вивільнення з холінергічних нервових закінчень, що призводить до покращання уваги, навчання та пам'яті. Крім рецепторного, для цитиколіну характерний і метаболітотропний механізм ноотропної та нейропротективної дії, що пришвидчує регенерацію пошкодженої клітинної оболонки та мітохондріальних мембран, тим самим сприяє підтриманню клітинної цілісності та біоенергетичної ємності; знижує вміст фосфоліпаз, що запобігає апоптотичну та некротичну загибель нейроцитів; стабілізує ліпідні рафти, які несуть глутаматні транспортні білки, що прискорює видалення ексайтотоксичного нейромедіатору глутамату з синаптичної щілини; посилює синтез фосфоліпідів і репарацію нейронів; зменшує тяжкість апоптозу та дегенерації нейронів гіпокампу, а також покращує пам'ять у експериментальних тварин. У доклінічних дослідженнях показана ефективність цитиколіну в зменшенні вираженості ішемічного ураження головного мозку, тяжкості апоптозу та дегенерації нейронів гіпокампу, а також у покращанні пам'яті експериментальних тварин [9,10].

Тому перспективним завданням сучасної фармакології є розробка методів терапевтичної корекції порушень антиоксидантного статусу нейрону при хронічній ішемії мозку (ХІМ) з урахуванням метаболізму глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи.

Мета дослідження – вивчення впливу цитиколіну на стан глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи тканини головного мозку та когнітивні функції білих щурів за умов модельованої ХІМ.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих щурах обох статей масою 180–200 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин склала 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини з оцінкою поведінки й загального стану. Тварини перебували в стандартних умовах віварію при вільному доступі до води та стандартного гранульованого корму. Усі експериментальні процедури здійснювали згідно з нормативом «Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях».

Оскільки метою дослідження є оцінка активності антиоксидантних ферментів глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи за результатом дії нейропротектора цитиколіну (Цераксон, FerrerInternacional, S.A.) за умов церебральної ішемії, як модель експериментальної патології головного мозку, яка б відповідала клінічним ситуаціям при ХІМ, використовували незворотну двосторонню перев'язку загальних сонних артерій експериментальним тваринам з урахуванням видових анатомо-фізіологічних особливостей кровопостачання головного мозку білих щурів. При цьому спостерігали відповідний неврологічний дефіцит, когнітивні порушення, біохімічні зміни тканини головного мозку [11].

Експеримент проводили в операційній після кварцювання та обробки антисептиками за температури 19–20 °С. Шерсть у місці операції виголювали, операційне поле обробляли діамантовим

зеленим. Двосторонню перев'язку загальних сонних артерій виконували під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), з використанням хірургічного доступу, виділенням сонних артерій, одночасного накладення на них шовкових лігатур. Псевдооперованим тваринам розрізали й ушивали шкіру. Враховуючи високу смертність після відтворення експериментальної моделі, оперували таку кількість тварин, щоб на 21 добу в кожній групі було до 15 тварин.

Нейропротективну активність цитиколіну оцінювали за активністю ферментів глутатіонового ланцюга кори головного мозку у відновний період після експериментального порушення мозкового кровообігу.

Тварин було розподілено на 3 експериментальні групи:

1) основна – тварини з ХІМ, які отримували цитиколін у дозі 250 мг/кг внутрішньоочеревинно 1 раз на 1 добу [1], починаючи з першого дня, після перев'язки загальних сонних артерій, протягом 21 доби (n = 15);
2) контрольна – тварини з ХІМ, які отримували фізіологічний розчин – 2 мл/кг протягом 21 доби (n = 15);
3) псевдооперовані тварини (n = 15).

Тварин виводили з експерименту на 21 добу спостереження під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг).

Досліджували показники глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи: активність ГР, ГПО, ГТ, концентрацію відновленого глутатіону, відновлених SH-груп тіолів [11]. Активність досліджуваних ферментів та вміст тіолів розраховували на 1 г білка. Для біохімічних досліджень використовували гомогенат тканини головного мозку, який отримували на холоді. Тканину головного мозку гомогенізували в 0,25 М сахарозному буфері за допомогою гомогенізатора SilentCrusher S фірми Heidolph. Уміст білка визначали прямою спектрофотометрією при $\lambda = 280$ нм [12]. Також визначали концентрацію маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину. Нітротирозин визначали в цитозольній фракції гомогенату кори головного мозку твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISAKit (Cat.№ HK 501-02) фірми HycultBiotech.

Наприкінці спостереження у відновному періоді після експериментального порушення мозкового кровообігу (на 20 добу) проводили навчання за тестом «Умовно рефлекторне пасивне уникнення» (УРПУ) [13]. Ця методика заснована на природженому норковому рефлексі щура – прагненні до обмеженого темного простору. Навчання умовному рефлексу проводили в двокамерній установці, що складається з двох відсіків – світлого та темного. Щура спочатку поміщали у світлий відсік хвостом до закритих дверцят, потім відкривали дверцята та тварина переходила в темний відсік (фіксували час переходу в темний відсік – латентний період 1), де тварина отримувала удар током та вибігала до світлого відсіку. Через 24 год проводили тестування виробленого досвіду. Для цього тварин поміщали в освітлений відсік при відкритих дверцятах і фіксували час переходу тварини в темний відсік (латентний період 2). Про ступінь запам'ятовування електрошоку тваринами судили за різницею латентних періодів переходу їх у темну камеру при виробленні рефлексу за тестом УРПУ і при тестуванні його збереження.

Результати дослідження оброблені з застосуванням статистичного пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., США, № AXXR712D833214FAN5). Статистичну обробку проводили із застосуванням U-критерія Мана-Уїтні. Результати наведено у вигляді медіани значень та 25–75 % міжквартильного інтервалу. Попарне порівняння показників двох зв'язаних вибірок проводили за допомогою парного непараметричного Т-критерію Вілкоксона. Статистично значимою вважали різницю при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. За результатами проведеного дослідження встановлено, що експериментальна ХІМ у білих щурів призводить до зниження активності антиоксидантних ферментів глутатіонового ланцюга тіолдисульфідної системи, умісту відновленого глутатіону та відновлених SH-груп (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Активність ферментів глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи в корі головного мозку тварин з хронічною ішемією мозку (n = 15)

Показник	Група тварин		
	Основна (ішемія + цитиколін)	Контрольна (ішемія)	Псевдооперовані
Глутатіонредуктаза, мкмоль/(хв • г білка)	8,53 (5,64–9,87)*	4,29 (3,30–5,36)#	14,85 (11,54–18,88)
Глутатіопероксидаза, ммоль/(хв • г білка)	2,41 (1,72–3,72)*	1,26 (0,77–1,74)#	6,06 (4,38–8,01)
Глутатіонтрансфераза, мкмоль/(хв • г білка)	8,05 6,48–9,55)*	5,64 (4,39–6,44)#	10,91 (10,06–13,61)

*Примітка. Тут і в табл. 2: *p < 0,001 відносно контрольної групи тварин, #p < 0,0001 відносно групи псевдооперованих тварин.*

Таблиця 2

Показники тіол-дисульфідної системи та вміст нітротирозину в корі головного мозку тварин з хронічною ішемією мозку

Показник	Група тварин		
	Основна (ішемія + цитиколін)	Контрольна (ішемія)	Псевдооперовані
Відновлені тіоли, мкмоль/г білка	15,39 (13,54–16,86)*	6,46 (4,72–8,00)#	29,85 (27,17–35,79)
Глутатіон відновлений, мкмоль/г білка	1,03 (0,87–1,14)*	0,68 (0,56–0,74)#	3,91 (3,72–4,15)
Нітротирозин, нмоль/г білка	11,41 (9,79–12,97)*	23,56 (17,77–31,67)#	7,02 (5,81–8,22)

Також встановлено збільшення в 3,4 разу кількості нітротирозину – нейротоксичного маркера нітрозуючого стресу (табл. 2). Наведені зміни свідчать про наявність оксидантного та нітрозуючого стресів у тканині мозку експериментальних тварин з ХІМ.

Проведеним експериментальним дослідженням встановлено, що призначення цитиколіну білим щурам упродовж 21 доби призвело до підвищення активності ферментів глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи – ГР, ГПО та ГТ порівняно з показниками тварин з ХІМ (табл. 1).

Позитивний вплив цитиколіну був відмічений і на стан компонентів глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи: збільшувалася кількість SH-груп, відновленого глутатіону. Також спостерігали вірогідне зниження вмісту нітротирозину – основного маркера нітрозуючого стресу (табл. 2).

У контрольній групі тварин з модельованою ХІМ спостерігали порушення запам'ятовування, визначене за тестом УРПУ, що свідчило про розвиток когнітивного дефіциту внаслідок ішемічного ушкодження мозкової тканини. Різниця латентних періодів ($Л_2$–$Л_1$) заходу тварин у темний відсік зменшилася на 92,2 % ($p < 0,001$) за тестом УРПУ порівняно з псевдооперованими тваринами.

Після терапії цитиколіном відмічено збільшення показника $Л_2$–$Л_1$ на 82,0 % порівняно з контролем (ХІМ) ($p < 0,001$), що свідчило про покращання когнітивних функцій та процесу запам'ятовування в експериментальних тварин.

Таким чином, проведення експериментальної нейропротективної терапії на тлі модельованої ХІМ у білих щурів сприяло зниженню інтенсивності оксидантного та нітрозуючого стресів у мозковій тканині та покращанню когнітивних функцій.

Висновки

1. За умов експериментальної ХІМ спостерігали активацію оксидантного та нітрозуючого стресів, що проявлялося зниженням активності антиоксидантних ферментів глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи та підвищенням вмісту нітротирозину в корі головного мозку білих щурів.
2. У разі введення цитиколіну експериментальним тваринам з модельованою ХІМ підвищувалася активність антиоксидантних ферментів – ГР, ГПО та ГТ, уміст відновленого глутатіону й відновлених тіольних груп, а також знижувався вміст нітротирозину, що свідчило про гальмування препаратом основних механізмів вторинного ураження головного мозку в разі ХІМ – оксидантного та нітрозуючого стресу, що дає змогу забезпечити стійкість мозкової тканини за церебральної ішемії.
3. За результатами поведінки тварин у тесті умовно-рефлекторного пасивного уникнення цитиколін достовірно покращував процес запам'ятовування в експериментальних тварин з модельованою ХІМ.

1. *Беленичев И. Ф.* Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник. – Донецк : Изд. Дом «Заславский», 2009. – 261 с.
2. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск : «АРТА», 2008. – 284 с.
3. *Кулинский В. И.* Глутатион ядра клетки и его функции / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, Вып. 6. – С. 657–662.
4. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease / H. Liu, H. Wang, S. Shenvi [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Ski. – 2004. – V. 1019. – P. 346–349.
5. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-1 transgenic mouse in response to ischemia/reperfiision injury / P. J. Crack, J. M. Taylor, J. B. Haan [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2003. – V. 23, № 1. – P. 19–22.
6. *Dhar-Mascareño M.* Hypoxia-reoxygenation induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibitedby vitamin C / M. Dhar-Mascareño, J. M. Carcamo, D. W. Golde // Free Radic Biol Med. – 2005. – № 38. – P. 1311–1322.
7. Transitory glutathione deficit during brain development induces cognitive impairment in juvenile and adult rats: relevance to schizophrenia / J. Cabungcal, D. Preissman, C. Delseth, K. Do // Neurobiology of Disease. – 2007. – V. 26. – P. 634–645.
8. *Путилина М. В.* Особенности комбинированной нейропротекторной терапии острых нарушений мозкового кровообращения / М. В. Путилина // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17, № 4. – С. 261–267.
9. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Л. А. Громов [и др.] // Метод. рекомендации ГФЦ МЗ Украины. – Киев, 2010. – 81 с.
10. *Adibhafla R. M.* Citidine 5-diphosphocholine (CDP-Choline) in stroke and ofher CNS disorders / R. M. Adibhafla, J. F. Hatcher // Neurochemica Research. – 2005. –V. 30. – P. 15–23.
11. *Alonsode Lecinana M.* Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke / M. Alonsode Lecinana, M. Gutierrez, J. M. Rodaetal. // J. NeurolSci. – 2006. – V. 247. – P. 121–129.
12. *Меньшиков В. В.* Лабораторные методы исследования в клинике. – Москва : Медицина, 1987. – 368 с.
13. *Буреш Я.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – Москва : Высшая школа, 1991. – 527 с.

А. В. Демченко, І. Ф. Бєленічев

Стан глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи мозку білих щурів після корекції цитиколіном модельованої хронічної ішемії

З метою вивчення нейропротективних властивостей та впливу на когнітивні функції за умов модельованої хронічної ішемії мозку цитиколіну проведено дослідження з використанням біохімічних, імуноферментних, фармакологічних та статистичних методів.

Дослідження проводили на 45 білих щурах обох статей масою 180–200 г. Тварин перед початком дослідження було розподілено на 3 групи: 1) тварини з хронічною ішемією мозку (ХІМ), які отримували цитиколін (Цераксон) у дозі 250 мг/кг (n = 15); 2) контрольні – тварини з ХІМ, які отримували фізіологічний розчин (2 мл/кг) протягом часу спостереження (n = 15); псевдооперовані тварини (n = 15). Цитиколін вводили внутрішньоочеревинно 1 раз на 1 добу впродовж 21 доби, починаючи з першої, відразу після виходу тварин з наркозу. Тварин виводили з експерименту на 21 добу спостереження під

тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Досліджували показники глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи в тканині кори головного мозку: активність глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази, концентрацію відновленого глутатіону, відновлених (SH)-груп тіолів. Когнітивний дефіцит експериментальних тварин оцінювали за їхньою здатністю до навчання та запам'ятовування аверсивного стимулу в тесті «Умовно рефлекторного пасивного уникнення» (УРПУ).

Встановлено, що хронічна ішемія мозку призводить до зниження активності антиоксидантних ферментів глутатіонового ланцюга та змін тіол-дисульфідної рівноваги клітини у вигляді зменшення вмісту відновлених форм. Відмічено збільшення вмісту нейротоксичного маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину. В експериментальній групі тварин з модельованою хронічною ішемією мозку (контроль) спостерігали розвиток когнітивного дефіциту за тестом УРПУ.

У роботі доведено здатність цитиколіну позитивно впливати на молекулярно-біохімічні зміни в головному мозку ішемізованих експериментальних тварин, що проявилося збільшенням активності глутатіонзалежних ферментів тіол-дисульфідної системи, встановленням тіол-дисульфідної рівноваги та зниженням вмісту маркера нейродеструкції – нітротирозину. Також відмічено збільшення різниці латентних періодів за тестом УРПУ.

Результати дослідження свідчать про зниження інтенсивності процесів оксидантного та нітрозуючого стресів, а також покращання когнітивних функцій у експериментальних тварин після нейропротективної дії цитиколіну (Цераксону).

Ключові слова: хронічна ішемія мозку, тіол-дисульфідна система, глутатіон, нітротирозин, цитиколін

А. В. Демченко, И. Ф.Беленичев

Состояние глутатионового звена тиол-дисульфидной системы мозга белых крыс после коррекции цитиколином моделированной хронической ишемии

С целью изучения нейропротекторных свойств цитиколина и влияния на когнитивные функции в условиях моделированной хронической ишемии мозга (ХИМ) проведено исследование с использованием биохимических, иммуноферментных, фармакологических и статистических методов.

Исследование проведено на 45 белых крысах обоего пола массой 180–200 г. Животные перед началом исследования были распределены на три группы: 1) основная – животные с ХИМ, которые получали цитиколин (Цераксон) в дозе 250 мг/кг (n = 15); 2) контрольная – животные с ХИМ, которые получали физиологический раствор (2 мл/кг) в течение периода наблюдения (n = 15); 3) ложнооперированные животные (n = 15). Цитиколин вводили внутрибрюшинно 1 раз в 1 сутки в течение 21 суток, начиная с первых, сразу после выхода животных из наркоза. Животных выводили из эксперимента на 21 сутки наблюдения под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Исследовали показатели глутатионового звена тиол-дисульфидной системы в коре головного мозга: активность глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, концентрацию восстановленного глутатиона, восстановленных (SH)-групп тиолов. Когнитивный дефицит экспериментальных животных оценивали по их способности к обучению и запоминанию аверсивного стимула в тесте «Условно рефлекторного пассивного избегания» (УРПИ).

Установлено, что моделированная хроническая ишемия мозга приводит к снижению активности антиоксидантных ферментов глутатионового звена и смещению тиол-дисульфидного равновесия в сторону снижения содержания восстановленных форм. Установлено увеличение содержания нейроксического маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина. В экспериментальной группе животных с моделированной хронической ишемией мозга (контроль) наблюдали развитие когнитивного дефицита по тесту УРПИ.

В работе представлена способность цитиколина положительно влиять на молекулярно-биохимические изменения в головном мозге ишемизированных экспериментальных животных, что проявилось увеличением активности глутатионзависимых ферментов тиол-дисульфидной системы, установлением тиол-дисульфидного равновесия и снижением содержания маркера нейродеструкции – нитротирозина. Также отмечено увеличение разницы латентных периодов по тесту УРПИ.

Результаты исследования свидетельствуют о снижении интенсивности процессов оксидантного и нитрозирующего стрессов, а также об улучшении когнитивных функций у экспериментальных животных после нейропротекторного действия цитиколина.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, тиол-дисульфидная система, глутатион, нитротирозин, цитиколин

A. V. Demchenko, I. F. Belienichev

Glutathione link state of thiol disulfide system of white rats brain after tratment by citicoline of simulated chronical ischemia

The aim of this study was to evaluate citicoline (ceraxon) neuroprotector properties and its influence on cognitive functions in conditions of simulated chronical cerebral ischemia. It has been performed in experiments on 45 white rats with average weight 180–200 g using biochemical, immunoenzyme, pharmacological and statistic methods.

All animals were divided into 3 groups: 1) animals with chronical cerebral ischemia treated with citicoline (ceraxon) in dose of 250 mg/kg (n = 15); 2) control – animals with chronical cerebral ischemia which were treated with physiological solution in dose 2ml/kg (n = 15); 3) pseudo-operated animals (n = 15). Citicoline was injected intraperitoneally one time per twenty-four hours during 21 day and was administered from the first day immediately after animals had been recovered from anesthesia. Animals were took out from the experiment on 21st day of observation using thiopental anaesthetic (40 mg/kg). Rates of thiol disulfide system glutathione link were studied: activity of glutathione transferase, glutathione reduced and glutathione peroxidase; concentration of reduced glutathione, renovated (SH)-groups thiols. Cognitive deficit of laboratory animals was estimated due to their ability to study and to remember aversive stimulus using test «Conditional passive avoidance reflex » (PASR).

The data obtained suggest that chronical cerebral ischemia causesd decreasing in activity of glutathione link antioxidant enzymes and changes of thiol-disulfide cell balance as well its reduced forms contents. The increase of nitrosative stress neurotoxic marker (nitrotyrosine) has been observed. In the experimental group of animals with simulated chronical cerebral ischemia (control) development of cognitive deficit, has been observed due to the PASR test.

Thus, citicoline positive influence on molecular and biochemical changes in brain of laboratory animals suffered from ischemia was established. This influence was due to an increase of glutathione-dependent enzymes activity, the establishment of thiol-disulfide balance and the reduction of neurodestructive marker contents – nitrotyrosine. Citicoline neuroprotector therapy led to an increase of latent period time, due to the PASR test.

The results of this study indicate a reduction of oxidative and nitrosative stresses intensity and the improvement of cognitive functions of laboratory animals after citicoline administration.

Key words: chronical cerebral ischemia, thiol disulfide sysytem, glutathione, nitrotyrosine, neuroprotectors, citicoline (ceraxon)

Надійшла: 02.03.2015 р.

Контактна особа: Бєленічев Ігор Федорович, професор, доктор медичних наук, кафедра фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 67 976 44 86.
Електронна пошта: ibf1914@mail.ru

УДК 615.213 : 615.015.4

О. Д. Мовчан

Протисудомна активність підвищених доз антиконвульсантів на тлі сформованої толерантності

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

Ключові слова: фенобарбітал, карбамазепін, вальпроат натрію, топірамат, толерантність, терапевтична резистентність, підвищені дози антиконвульсантів

Проблема ефективного лікування епілепсії залишається однією з найактуальніших і складних проблем неврології та психіатрії. Незважаючи на значні успіхи у вивченні етіології, патогенезу, клініки та лікування епілепсії, понад 30 % хворих виявляють резистентність до фармакотерапії через розвиток толерантності (набута резистентність) [1–3].

У випадках, коли розвивається терапевтична резистентність до дії протисудомних препаратів, у клініці часто йдуть шляхом підвищення дози антиконвульсанта до максимально переносної. У той самий час сьогодні відсутнє експериментальне обґрунтування зазначеного підходу, у першу чергу, стосовно лікування малих клінічних форм епілепсії, експериментальним еквівалентом яких є хемоконвульсантні моделі судомних станів.

Мета дослідження – експериментальна перевірка протисудомної активності антиконвульсантів у дозах, які на 50 % перевищують ефективні протисудомні, на тлі сформованої толерантності до них. Полуторна доза була обрана виходячи з того, щоб вона не була заздалегідь токсичною чи малоефективною.

Матеріали та методи. Експерименти проведені на нелінійних білих мишах масою 18–20 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс». Утримання лабораторних тварин здійснювали відповідно до чинних вимог [4]. Усі дослідження проводили відповідно до правил «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою метою» (м. Страсбург, 1986 р.) [5] за погодженням з Комісією з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Судомні стани моделювали внутрішньоочеревинним (в/о) введенням коразолу в дозі 100 мг/кг (у випадку вивчення фенобарбіталу, карбамазепіну та вальпроату натрію) або тіосемікарбазиду в дозі 20 мг/кг (у випадку вивчення топірамату).

Для формування толерантності антиконвульсанти вводили внутрішньоочеревинно (в/о) в ефективних протисудомних дозах щоденно протягом 7 (фенобарбітал – 20 мг/кг) або 14 днів (карбамазепін – 125 мг/кг, вальпроат натрію – 155 мг/кг, топірамат – 300 мг/кг) [6, 7]. Тестування проводили через 1 добу після формування толерантності (на 8 день у разі застосування фенобарбіталу та на 15 день у разі застосування інших антиконвульсантів). У день тестування як нетолерантні, так і толерантні тварини одноразово отримували в ефективних або підвищених на 50 % протисудомних дозах фенобарбітал, карбамазепін або вальпроат натрію за 1 год до введення коразолу, а у випадку сформованої толерантності до топірамату – ефективну або підвищену дозу препарату одночасно з введенням конвульсанта тіосемікарбазиду. Реєстрували кількість загиблих тварин, кількість тварин з наявністю судом у відсотках та оцінювали вираженість судомного синдрому за 5-бальною шкалою [8].

Результати експериментів піддавали статистичній обробці за допомогою програми STATISTICA 6.0 з використанням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$ [9, 10].

© О. Д. Мовчан, 2015

Результати та їх обговорення. Фенобарбітал (20 мг/кг), карбамазепін (125 мг/кг), вальпроат натрію (155 мг/кг) повністю попереджують розвиток коразолових судом у нетолерантних тварин (контроль II) (табл. 1–3). Проте в тих самих дозах антиконвульсанти не чинять протисудомної дії у випадках, коли їх вводили толерантним тваринам (табл. 1–3).

У разі підвищення дози фенобарбіталу на 50 %, тобто до 30 мг/кг, також не виявлено достовірного протисудомного ефекту на тлі сформованої толерантності до фенобарбіталу (табл. 1). У цьому випадку спостерігається лише тенденція до зменшення кількості тварин з наявністю судом і зниження вираженості судомного синдрому. Летальність склала 28,6 %, тобто загинуло 2 тварини з 7.

У разі підвищення дози карбамазепіну в 1,5 разу (з 125,0 до 187,5 мг/кг) також не спостерігали протисудомного ефекту в толерантних до дії карбамазепіну тварин (табл. 2). Крім того, у толерантних тварин реєстрували більш високу летальність, оскільки

Таблиця 1

Протисудомна ефективність фенобарбіталу

Умова досліду	Кількість тварин з наявністю судом*	Кількість тварин з наявністю судом, %	Вираженість судомного синдрому, бал
Коразол, 100 мг/кг, в/о (контроль I)	9/10	90	4,0 ± 0
Фенобарбітал, 20 мг/кг, в/о + коразол, 100 мг/кг(контроль II)	0/10	0	0 ± 0
Фенобарбітал, 20 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії фенобарбіталу + коразол, 100 мг/кг	7/7	100	3,2 ± 0,4◊
Фенобарбітал, 30 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії фенобарбіталу + коразол, 100 мг/кг	5/7	71,4	3,0 ± 0,6◊

*Примітка. Тут і в табл. 2–4: *У чисельнику – кількість тварин з наявністю судом, у знаменнику – кількість тварин у досліді, ◊p < 0,05 відносно контролю II.*

Таблиця 2

Протисудомна ефективність карбамазепіну

Умова досліду	Кількість тварин з наявністю судом*	Кількість тварин з наявністю судом, %	Вираженість судомного синдрому, бал
Коразол, 100 мг/кг, в/о (контроль I)	9/10	90	4,0 ± 0
Карбамазепін, 125 мг/кг, в/о + коразол, 100 мг/кг (контроль II)	0/8	0	0 ± 0
Карбамазепін, 125 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії карбамазепіну + коразол, 100 мг/кг	7/7	100	4,0 ± 0◊
Карбамазепін, 187,5 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії карбамазепіну + коразол, 100 мг/кг	7/7	100	4,0 ± 0◊

в цій групі загинуло 6 тварин з 7 (тобто 85,7 %) за відсутності загибелі в групі нетолерантних тварин.

У толерантних до вальпроату натрію тварин підвищення дози антиконвульсанта (з 155,0 до 232,5 мг/кг) також неефективне з летальністю 85,7 % (табл. 3).

У нетолерантних тварин топірамат у дозі 300 мг/кг повністю попереджує розвиток тіосемікарбазидних судом (табл. 4). Препарат, уведений у такій самій дозі толерантним тваринам, не попереджує розвиток судом. Але в разі його застосування знижується вираженість судомного синдрому з (4,0 ± 0) бала в нетолерантних тварин до (2,8 ± 0,3) бала в толерантних ($p < 0,05$). Проте наявність судом та їхня вираженість достовірно відрізняються від таких у групі нетолерантних тварин, яким топірамат вводили в дозі 300 мг/кг (табл. 4). Аналогічну картину спостерігали в разі підвищення дози топірамату в 1,5 разу, тобто до 450 мг/кг. У толерантних тварин ця доза препарату також не попереджала розвиток тіосемікарбазидних судом, хоча й знижувала

Таблиця 3

Протисудомна ефективність вальпроату натрію

Умова досліду	Кількість тварин з наявністю судом*	Кількість тварин з наявністю судом, %	Вираженість судомного синдрому, бал
Коразол, 100 мг/кг, в/о (контроль I)	9/10	90	4,0 ± 0
Вальпроат натрію, 155 мг/кг, в/о + коразол, 100 мг/кг (контроль II)	0/10	0	0 ± 0
Вальпроат натрію, 155 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії вальпроату натрію + коразол, 100 мг/кг	7/7	100	4,0 ± 0$^{\lozenge}$
Вальпроат натрію, 232,5 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії вальпроату натрію + коразол, 100 мг/кг	7/7	100	4,0 ± 0$^{\lozenge}$

Таблиця 4

Протисудомна ефективність топірамату

Умова досліду	Кількість тварин з наявністю судом*	Кількістьтварин з наявністю судом, %	Вираженість судомного синдрому, бал
Тіосемікарбазид,20 мг/кг, в/о (контроль I)	10/10	100	4,0 ± 0
Топірамат, 300 мг/кг, в/о + тіосемікарбазид, 20 мг/кг (контроль II)	0/10	0	0 ± 0
Топірамат, 300 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії топірамату + тіосемікарбазид, 20 мг/кг	7/7	100	2,8 ± 0,3$^{\#\lozenge}$
Топірамат, 450 мг/кг, в/о, введений тваринам, толерантним до дії топірамату + тіосемікарбазид, 20 мг/кг	7/7	100	2,5 ± 0,6$^{\#\lozenge}$

Примітка. $^{\#}p < 0,05$ *відносно контролю I.*

їхню вираженість з (4,0 ± 0) бала в контролі до (2,5 ± 0,6) ($p < 0,05$) у досліді (табл. 4). Загинула 1 тварина з 7, що становить 14,3 %.

Висновки

1. Підвищені на 50 % відносно ефективних протисудомні дози фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію й топірамату не попереджують розвиток судомного синдрому в толерантних тварин.
2. Даний підхід не може бути застосований для подолання терапевтичної резистентності з метою підвищення ефективності фармакотерапії малих клінічних форм епілепсії.

1. *Громов Л. А.* Толерантность (терапевтическая резистентность) к действию лекарственных препаратов / Л. А. Громов // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 12. – С. 39–41.
2. *Литовченко Т. А.* Резистентные эпилепсии: причины и методы лечения / Т. А. Литовченко // НейроNews. – 2010. – № 6. – С. 21–26.
3. Comparative efficacy and tolerability of anti-epileptic drugs for refractory focal epilepsy: systematic review and network meta-analysis reveals the need for long term comparator trials / P. N. Bodalia, A. M. Grosso, R. Sofat [et al.] // Br J. Clin Pharmacol. – 2013. – V. 76 (5). – P. 649–667.
4. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ, 2002. – 155 с.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. – Strasbourg, 1986 – 53 p.
6. *Гацура В. В.* Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – Москва : Медицина, 1974. – 142 с.
7. *Macdonald R. L.* Principles of antiepileptic drug action // Antiepileptic drugs : Ed. R. H. Levy, R. H. Mattson, B. S. Meldrum / R. L. Macdonald, B. S. Meldrum. – New York : Raven Press, Ltd, 1995. – P. 61–77.
8. *Крыжановский Г. Н.* Киндлинг как модель формирования эпилептической активности / Г. Н. Крыжановский, А. А. Шандра, Л. С. Годлевский // Успехи физиол. наук. – 1988. – Т. 19, № 4. – С. 12–32.
9. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А. Халафян. – Москва : Бином-Пресс, 2007. – 512 с.
10. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – Киев : Морион, 2001. – 314 с.

О. Д. Мовчан

Протисудомна активність підвищених доз антиконвульсантів на тлі сформованої толерантності

При формуванні терапевтичної резистентності до дії протисудомних засобів у клініці часто йдуть шляхом підвищення дози антиконвульсантів до максимально переносної. У той самий час сьогодні відсутнє експериментальне обґрунтування зазначеного підходу, у першу чергу, стосовно лікування малих клінічних форм епілепсії, експериментальним еквівалентом яких є хемоконвульсантні моделі судомних станів.

Мета дослідження – проведення експериментальної перевірки протисудомної активності антиконвульсантів у дозах, які на 50 % перевищують ефективні протисудомні, на тлі сформованої толерантності до них.

Досліди проводили на білих мишах, нетолерантних та толерантних до дії антиконвульсантів. Судомні стани моделювали введенням відомих консультантів (коразолу, 100 мг/кг) або тіосемікарбазиду (20 мг/кг). Реєстрували кількість тварин з наявністю судом та вираженість судомного синдрому.

Встановлено, що підвищені дози фенобарбіталу (30,0 мг/кг), карбамазепіну (187,5 мг/кг), вальпроату натрію (232,5 мг/кг) та топірамату (450,0 мг/кг) не попереджують розвиток судомного синдрому в толерантних тварин. Це свідчить про те, що збільшення дози протисудомного засобу в разі сформованої до нього толерантності не забезпечує терапевтичного ефекту.

Ключові слова: фенобарбітал, карбамазепін, вальпроат натрію, топірамат, толерантність, терапевтична резистентність, підвищені дози антиконвульсантів

Е. Д. Мовчан

Противосудорожная активность повышенных доз антиконвульсантов на фоне сформированной толерантности

При формировании терапевтической резистентности к действию противосудорожных средств в клинике часто идут по пути повышения дозы антиконвульсантов к максимально переносимой. В то

же время на сегодня отсутствует экспериментальное обоснование указанного подхода, в первую очередь, относительно лечения малых клинических форм эпилепсии, экспериментальным эквивалентом которых являются хемоконвульсантные модели судорожных состояний.

Цель исследования – проведение экспериментальной проверки противосудорожной активности антиконвульсантов в дозах, которые на 50 % превышают эффективные противосудорожные, на фоне сформированной толерантности к ним.

Опыты проводили на белых мышах, нетолерантных и толерантных к действию антиконвульсантов. Судорожные состояния моделировали введением известных конвульсантов (коразола, 100 мг/кг) или тиосемикарбазида (20 мг/кг). Регистрировали количество животных с наличием судорог и выраженность судорожного синдрома.

Установлено, что повышенные дозы фенобарбитала (30,0 мг/кг), карбамазепина (187,5 мг/кг), вальпроата натрия (232,5 мг/кг) и топирамата (450,0 мг/кг) не предупреждают развитие судорожного синдрома у толерантных животных. Это свидетельствует о том, что увеличение дозы противосудорожного средства при сформировавшейся к нему толерантности не обеспечивает терапевтический эффект.

Ключевые слова: фенобарбитал, карбамазепин, вальпроат натрия, топирамат, толерантность, терапевтическая резистентность, повышенные дозы антиконвульсантов

O. D. Movchan

The anticonvulsant action of increased doses of antiepileptic drugs on the background of formed tolerance

An increased doses of anticonvulsant to the maximum tolerated are often used in the clinic if formation the therapeutic resistance to its action. Meanwhile, today there is no experimental basis to such approach primarily as to the treatment of petit mal seizures. Their equivalents are the experimental models of convulsive states using a chemoconvulsants.

The aim of the research was to verify experimentally an anticonvulsant action of drugs in doses which 50 % exceeded the effective anticonvulsant doses. The experiments were performed on white mice, intolerant and tolerant to the action of anticonvulsants. There was formed tolerance to anticonvulsant drugs previously. Convulsive states were modeled by intraperitoneal injection of the known convulsant (corazol, 100 mg/kg), or thiosemicarbazide (20 mg/kg).The number of animals with the presence of seizures and its severity were recorded.

It was found that increased doses of phenobarbital (30,0 mg/kg); carbamazepine (187,5 mg/kg); depakine (232,5 mg/kg) and topiramate (450,0 mg/kg) didn't prevent the development of seizures in tolerant animals. This suggest that an increased doses of anticonvulsant drugs don't provide a therapeutic effect when therapeutic resistance has been formed.

Key words: phenobarbital, carbamazepine, depakine, topiramate, tolerance, therapeutic resistance, higher doses of anticonvulsant drugs

Надійшла: 25.03.2015 р.

Контактна особа: Мовчан О. Д., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

УДК 616.8-009.12.83:616.89-008.45/.48:612.822/.823-092.9:576.385

Н. П. Шастун[1], В. И. Опрышко[1], С. В. Павлов[2], Н. В. Бухтиярова[2]

Сравнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндлинга

[1]ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МЗ Украины»
[2]Запорожский государственный медицинскоий университет

Ключевые слова: антиконвульсанты, сенсомоторная кора, нейропротективный эффект, коразоловый киндлинг

Эпилепсия представляет собой большую группу заболеваний, которым подвержено около 1 % взрослого населения [1]. Известно, что тяжесть эпилепсии определяется не только количеством и характером ее пароксизмов, но и степенью психических изменений у больного. Нарушения когнитивных функций разной степени выраженности обнаруживают у 40–54 % больных эпилепсией [2]. Среди множества причин когнитивной дисфункции основными являются: этиология эпилептического синдрома, собственно эпилептические припадки и влияние противоэпилептических препаратов [3]. Лечение больных с этим заболеванием включает длительную, чаще всего пожизненную терапию антиконвульсантами. Поэтому при выборе противосудорожной терапии следует учитывать не только ликвидацию припадков, но и влияние антиконвульсантов на когнитивные функции больных. Несмотря на большое количество противосудорожных препаратов, внедренных в медицинскую практику, в настоящее время продолжается интенсивное изучение их механизмов действия и побочных эффектов [4]. Длительный прием противосудорожных препаратов, особенно в больших дозах, или сочетание нескольких антиконвульсантов приводит к нарушению памяти, внимания, речи, мышления и исполнительной функций [5].

На различных моделях эпилепсии на животных показано, что эпилептогенез сопровождается многочисленными метаболическими нарушениями в нейронах, включающими изменения экспрессии генов, кластеризации и свойств различных рецепторных комплексов, в частности, ГАМК- и глутаматных, изменением проводимости ионных каналов, а также морфологическими перестройками, приводящими к гипервозбудимости нейрональных сетей [6], поэтому правильный выбор лекарственных средств является необходимым звеном в рациональной терапии эпилепсии.

Цель исследования – экспериментальное изучение влияния антиконвульсантов с разным механизмом действия на мнестические функции в тесте УРПИ без амнезирующего фактора и морфофункциональные показатели сенсомоторной коры у животных на фоне коразолового киндлинга.

Материалы и методы. Исследования проведены на 334 нелинейных крысах обоего пола весом 180–220 г (исследование влияния антиконвульсантов на когнитивные процессы проведено на 180 животных, оценка морф-функциональных изменений в условиях коразолового киндлинга – на 154 животных). Все экспериментальные процедуры осуществляли согласно «Положению об использовании животных в биомедицинских исследованиях» [7].

© Колектив авторів, 2015

В исследовании использовали следующие антиконвульсанты: вальпроат натрия («Депакин», таблетки по 300 мг, производства «Sanofi Winthrop Industria», Франция) в дозе 155 мг/кг; карбамазепин («Карбамазепин-Дарница», таблетки по 200 мг, производства «Дарница», Украина) в дозе 125 мг/кг; топирамат («Топиромакс», таблетки по 100 мг, производства «Фарма Старт» Украина) в дозе 304 мг/кг; габапентин («Габагама», капсулы по 300 мг, производства Вьорваг Фарма ГмбХ, Германия) в дозе 100 мг/кг; ламотриджин («Ламиктал», таблетки по 100 мг, производства Глаксо Смит Кляйн Фармасьютикалз С. А., Польша) в дозе 50 мг/кг. Все препараты вводили внутрижелудочно в дозах, вызывающих нейротоксические эффекты [8, 9].

Влияние антиконвульсантов на когнитивные процессы изучали на модели однократного обучения – условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) без применения амнезирующего фактора [10]. В первой серии экспериментов с целью изучения действия препаратов на начальные фазы обработки памятного следа (обучение) крысам вводили внутрижелудочно исследуемые препараты в соответствующих дозах за 60 мин до обучения, контрольной группе вводили дистиллированную воду.

Эффект исследуемых препаратов оценивали по их способности увеличивать или уменьшать количество животных с УРПИ при формировании пассивно-оборонительного навыка через 1 ч после введения препарата, а также по разнице латентного периода захода в темный отсек до и после обучения. Для оценки влияния препаратов на консолидацию памятного следа животным после формирования пассивно-оборонительного навыка вводили исследуемые препараты в соответствующих дозах. Эффект препаратов оценивали по их способности уменьшать количество животных с утратой навыка через 1 ч после однократного введения антиконвульсантов и по разнице латентного периода захода в темный отсек. Во 2 серии опытов для оценки действия антиконвульсантов на процессы воспроизведения энграмм памяти животным через 72 ч после выработки УРПИ однократно вводили противосудорожные средства за 60 мин до проверки сохранности выработанного навыка [11, 12].

Для оценки нейропротективного действия антиконвульсантов использовали коразоловый киндлинг [13]. В работе использовали коразол производства «Нижфарм» (Россия) и Sigma-Aldrich (USA). Препараты вводили профилактически ежедневно 1 раз в 1 сутки (11 введений) внутрижелудочно (за 60 мин до введения коразола) в терапевтических дозах: топирамат – 100,0 мг/кг; вальпроат натрия – 60 мг/кг; ламотриджин – 50 мг/кг; габапентин – 50 мг/кг; карбамазепин – 125 мг/кг [14, 15]. Следует отметить, что карбамазепин в дозе 125 мг/кг проявляет как терапевтическое (противосудорожное), так и нейротоксическое действие [19]. На 11 сутки животных выводили из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации [16]. Головной мозг экспериментальных животных помещали на 1 сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парафин. Для изучения морфологии нейронов на ротационном микротоме изготавливали срезы сенсомоторной коры толщиной 5 мкм. Срезы сенсомоторной коры депарафинировали и окрашивали для определения нуклеиновых кислот галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Морфометрические исследования проводили на микроскопе Axioskop (Ziess, Германия), увеличение х 40. Изображение нейронов в области зоны сенсомоторной коры, получаемые на микроскопе, с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS, разработанную профессором кафедры патофизиологии, доктором медицинских наук А. В. Абрамовым. Анализ изображений проводили в полуавтоматическом режиме. Определение содержания bcl-2 белков проводили методом иммуноблотинга [16]. Для определения антиапоптотического белка Bcl-2 срезы (15 мкм) инкубировали с первичными поликлональными

антителами Bcl-2 мыши IgG1 (1:500) (C-2 #sc7382) производства Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA) и с вторичными антителами козы к фрагменту IgG кролика, конъюгированными с флюоресцентным красителем (FITC) фирмы Sigma-Aldrich (кат. № F 2266). На флюоресцентном микроскопе Axioskop (Ziess, Germany) определяли интенсивность экспресссии bcl-2 по плотности bcl-2-позитивных клеток в срезах с помощью видеокамеры COHU-4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronic, Germany) [16].

Полученный цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с помощью программы статистического анализа Stat Plus, Analyst Soft. Версия 2006. (http://www.analystsoft. com/ru/) на персональном компьютере «Intel Pentium-IV». Полученные результаты представляли в виде среднеарифметического (M) и стандартной ошибки (m). Достоверность различия средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и критерия χ^2.

Результаты и их обсуждения. В первой серии экспериментов при исследовании влияния антиконвульсантов на обучаемость животных в тесте УРПИ без амнезирующего фактора было показано, что внутрижелудочное введение карбамазепина достоверно уменьшает латентный период захода в темный отсек при воспроизведении навыка по сравнению с контролем. Это свидетельствует о негативном влиянии карбамазепина на обучаемость животных. Количество обученных животных при введении карбамазепина до выработки УРПИ составило лишь 40 % (табл. 1).

Достоверных отличий латентного времени захода в темный отсек по сравнению с контролем при воспроизведении навыка в группах животных, которым вводили ламотриджин, топирамат, габапентин и вальпроат натрия, выявлено не было. Однако следует отметить, что у животных, которым вводили топирамат, ламотриджин, габапентин и вальпроат натрия, латентный период захода в темный отсек при воспроизведении УРПИ значительно возрастал по сравнению с этими же показателями при обучении, что свидетельствует о сохранности у крыс навыка пассивного избегания.

При анализе влияния исследуемых препаратов на консолидацию памятного следа (табл. 2), латентный период

Таблица 1

Показатели обучаемости животных при выполнении животными условной реакции пассивного избегания под влиянием антиконвульсантов (без действия амнезирующего фактора)

Условие опыта	Количество животных	Количество обученных животных, %	Длительность латентного периода, с	
			при обучении	при воспроизведении
Контроль	10	90	12,40 ± 1,95	172,60 ± 7,40
Ламотриджин (50 мг/кг)	10	90	9,10 ± 1,98	174,40 ± 5,60**
Карбамазепин (125 мг/кг)	10	40	52,90 ± 10,79*	77,50 ± 27,90*
Топирамат (304 мг/кг)	10	70	17,80 ± 5,03	129,00 ± 25,96**
Габапентин (100 мг/кг)	10	70	22,20 ± 6,90	140,30 ± 20,58**
Вальпроат натрия (155 мг/кг)	10	80	9,10 ± 1,98	169,10 ± 7,82**

*Примечание. *p < 0,05 по отношению к контролю, **p < 0,05 по отношению к показателю длительности латентного периода при обучении.*

Таблица 2

Показатели консолидации памятного следа при выполнении животными условной реакции пассивного избегания под влиянием антиконвульсантов (без действия амнезирующего фактора)

Условие опыта	Количество животных	Количество обученных животных, %	Длительность латентного периода, с	
			при обучении	при воспроизведении
Контроль	10	100	9,03 ± 2,02	170,90 ± 9,10
Ламотриджин (50 мг/кг)	10	90	8,10 ± 1,53	169,60 ± 10,4*
Карбамазепин (125 мг/кг)	10	70	79,00 ± 1,12	128,70 ± 26,12
Топирамат (304 мг/кг)	10	80	12,30 ± 4,02	145,80 ± 22,80*
Габапентин (100 мг/кг)	10	90	22,20 ± 6,90	140,30 ± 20,58*
Вальпроат натрия (155 мг/кг)	10	80	7,80 ± 1,19	163,10 ± 16,90*

*Примечание. *$p < 0,05$ по отношению к показателю длительности латентного периода при обучении.*

захода в темный отсек во всех группах статистически значимо не отличался. Однако следует отметить, что процент обученных животных при введении карбамазепина остается по-прежнему ниже, чем при введении других антиконвульсантов.

Показано достоверно значимое увеличение латентного времени захода в темный отсек при воспроизведении УРПИ по сравнению с показателями, полученными при обучении, в группах животных, получавших ламотриджин, габапентин, вальпроат натрия, топирамат.

Латентный период пребывания животного в светлом отсеке камеры при тестировании является показателем, характеризующим степень запоминания крысой отрицательного опыта – удара током, который она приобрела в темном отсеке камеры во время первого ее посещения при обучении. Введение животным ламотриджина, габапентина, вальпроата натрия и топирамата после обучения не повлияло на память об отрицательном опыте, то есть латентный период пребывания животных в светлом отсеке не уменьшился.

В серии опытов по оценке влияния антиконвульсантов на воспроизведение энграмм памяти показано, что наименьшее влияние оказывает ламотриджин, при его введении количество животных с сохраненным навыком составило 90 % ($p < 0,001$) (табл. 3). Введение карбамазепина 125 мг/кг существенно уменьшало количество животных с сохраненным навыком – 60 % ($p < 0,001$), что указывает на его отрицательное влияние на воспроизведение энграмм памяти.

Вальпроат натрия, топирамат и габапентин снизили обучаемость животных на 30 % и 20 % ($p < 0,001$) соответственно. Таким образом, видно, что наибольшее негативное влияние на процессы воспроизведения энграмм памяти оказывает карбамазепин, наименьшее – ламотриджин.

При изучении действия антиконвульсантов на морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры в условиях коразолового киндлинга было установлено, что хроническое введение коразола приводит к снижению плотности нейронов сенсомоторной коры с 1234 до 1087 клеток на 1 мм^2 (табл. 4). Профилактическое курсовое введение ламотриджина, топирамата, вальпроата натрия и габапентина приводило к достоверному повышению плотности нейронов сенсомоторной коры. Лидером в этом виде действия был ламотриджин, на втором

Таблица 3

Воспроизведение энграмм памяти при выполнении животными условной реакции пассивного избегания под влиянием антиконвульсантов (без действия амнезирующего фактора)

Условие опыта	Количество обученных животных	Количество животных с сохраненным навыком, %
Контроль	10	100
Карбамазепин (125 мг/кг)	6	60*
Вальпроат натрия (60 мг/кг)	7	70*
Топирамат (100 мг/кг)	7	70*
Габапентин (50 мг/кг)	8	80*
Ламотриджин (50 мг/кг)	9	90*

*Примечание. *$p < 0,001$ по отношению к контролю по критерию χ^2*

месте – вальпроат натрия, за третье место конкурировали топирамат и габапентин. Карбамазепин оказывал незначительное действие на этот показатель.

Изучаемые антиконвульсанты не только снижали гибель нейронов, но и сохраняли их функциональную активность, о чем свидетельствовало повышение под их влиянием уровня РНК в нейронах коры. Так, на фоне введения коразола содержание РНК в нейронах уменьшилось с 9,62 до 8,12. Вальпроат натрия и габапентин достоверно повышали уровень РНК в нейронах сенсомоторной коры.

В исследовании впервые получены данные об инициировании апоптоза при коразоловом киндлинге и антиапоптотическом действии антиконвульсантов (табл. 5).

Введение профилактическим курсом антиконвульсантов приводило к снижению плотности апоптотических клеток и повышению антиапоптотического белка bcl-2 по сравнению с контролем (табл. 5).

Лидером по антиапоптотическому действию был ламотриджин, на втором месте – вальпроат натрия, за третье место конкурировали топирамат и габа-

Таблица 4

Характеристики нейронов IV-V слоев сенсомоторной коры головного мозга крыс с коразоловыми припадками при курсовом профилактическом введении антиконвульсантов

Экспериментальная группа	Количество животных	Плотность нейронов, клеток/мм^2	Площадь тел нейронов, мкм^2	Содержание РНК в нейронах, $E_{оп}$
Интактные животные	10	1232 ± 21	70,80 ± 0,52	9,62 ± 0,07
Коразоловые припадки (контроль)	10	1087 ± 8	68,50 ± 0,31	8,12 ± 0,08
Коразоловые припадки + ламотриджин (50 мг/кг)	10	1192 ± 26*	69,80 ± 0,28	8,89 ± 0,10
Коразоловые припадки + вальпроат натрия (60 мг/кг)	10	1176 ± 13*	68,10 ± 0,44	9,11 ± 0,11*
Коразоловые припадки + топирамат (100 мг/кг)	10	1161 ± 9*	68,40 ± 0,53	8,12 ± 0,03
Коразоловые припадки + габапентин (50 мг/кг)	10	1158 ± 18*	71,40 ± 0,81*	11,23 ± 0,12 *
Коразоловые припадки + карбамазепин (125 мг/кг)	10	1097 ± 11	68,10 ± 0,37	8,11 ± 0,11

*Примечание. Здесь и в табл. 5: *$p < 0,05$ по отношению к контролю.*

Таблица 5

Показатели апоптоза нейронов IV–V слоев сенсомоторной коры головного мозга крыс с коразоловыми припадками при курсовом профилактическом введении антиконвульсантов

Экспериментальная группа	Количество животных	Плотность bcl-2-позитивных клеток	Плотность апоптотически измененных клеток на 1 мм^2
Интактные животные	10	274,2 ± 32,4	74 ± 3
Коразоловые припадки (контроль)	10	167,2 ± 15,3	127 ± 10
Коразоловые припадки + ламотриджин (50 мг/кг)	10	207,2 ± 17,2*	80 ± 5*
Коразоловые припадки + вальпроат натрия (60 мг/кг)	10	281,3 ± 19,2*	87 ± 7*
Коразоловые припадки + топиромат (100 мг/кг)	10	188,2 ± 17,8*	93 ± 3*
Коразоловые припадки + габапентин (50 мг/кг)	10	186,0 ± 15,5*	95 ± 8*
Коразоловые припадки + карбамазепин (125 мг/кг)	10	168,5 ± 19,4	121 ± 11

пентин. Следует отметить, что ламотриджин превосходил вальпроат натрия по степени снижения плотности апоптотических клеток, что и дает полную характеристику антиапоптотического действия [16], но уступал ему по степени повышения плотности bcl-2-позитивных клеток. По всей видимости, в антиапоптотическом действии ламотриджина присутствуют не только молекулярные, bcl-2-опосредованные механизмы, но и, возможно, антиоксидантные механизмы ингибирования реакций апоптоза [8, 15, 16]. Нейропротективное действие вальпроата натрия напрямую связано с подавлением нейроапоптоза, что согласуется с выявленным нами повышением экспрессии антиапоптического белка bcl-2. Известно, что вальпроат натрия способен подавлять апоптоз за счет угнетения экспрессии проапоптотических молекул (каспазы-3, -8, -9, и Bax) [9]. Каспаза-3 является ключевым медиатором апоптоза нейронов и быстро активируется при судорожных припадках, ишемии, нейродегенеративных заболеваниях, депрессии.

Исследованием установлено, что коразоловый киндлинг приводит к повышению плотности апоптотически измененых нейронов сенсомоторной коры, которая коррелирует с депрессией bcl-2. Нейропротективное действие вальпроата натрия при эпилепсии, по мнению ряда исследователей, может включать и другие молекулярные механизмы [17, 18]. Вальпроат натрия может модулировать экспрессию генов-мишеней, регулируя экспрессию транскрипционных факторов по механизму гиперацелирования [19]. Известен факт повышения под действие вальпроата натрия белка CREB, который регулирует память, поведение, влияет на рост и выживаемость нейронов [19, 20]. Некоторыми исследованиями показано, что CREB регулирует экспрессию как Bcl-2, так и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) [20]. Нами впервые установлено, что ламотриджин, возможно, за счет позитивной регуляции ацетилирования гистонов повышает активность промотера bcl-2 и вносит дополнительный антиапоптотический эффект в нейропротективное действие при коразоловом киндлинге. Таким образом, антиконвульсанты, проявляющие наибольшую нейропротективную и антиапоптотическую активность, обладают наименьшим негативным влиянием на когнитивные функции ЦНС.

Выводы

1. Внутрижелудочное введение антиконвульсантов (карбамазепина в дозе 125 мг/кг, ламотриджнина – 50 мг/кг, вальпроата – 155 мг/кг, габапентина – 100 мг/кг, топирамата – 304 мг/кг) оказывало влияние на когнитивные процессы у интактных крыс: карбамазепин негативно влиял на обучаемость и воспроизведение энграмм памяти, уменьшая количество животных с сохраненным навыком до 60 % ($p < 0,001$); ламотриджин, вальпроат натрия, габапентин и топирамат не оказывали отрицательного эффекта на консолидацию памятного следа; ламотриджин оказывал положительный эффект при воспроизведении энграмм памяти (90 % $p < 0,001$ животных с сохраненным навыком). Наибольший негативный эффект на процессы обучения и памяти был выявлен у карбамазепина, а наименьший – у ламотриджина.

2. Курсовое внутрижелудочное введение животным антиконвульсантов (карбамазепина в дозе 125 мг/кг, ламотриджнина – 50 мг/кг, вальпроата – 60 мг/кг, габапентина – 50 мг/кг, топирамата – 100 мг/кг) в условиях коразолового киндлинга оказывает нейропротективное и антиапоптотическое действие, повышая плотность нейронов сенсомоторной коры, увеличивая содержание в них РНК, снижая плотность апоптотически измененных нейронов и повышая плотность bcl-2-позитивных нейронов. Наибольшим нейропротективным и антиапоптотическим действием обладает ламотриджин, а наименьшим – габапентин и топирамат.

3. Установлена некоторая зависимость в действии антиконвульсантов на когнитивные процессы в норме и на выживаемость нейронов – препараты, обладающие наиболее высоким нейропротективным и антиапоптотическим действием, не оказывают негативного действия на процессы обучения и памяти.

4. Впервые были получены данные об инициировании апоптоза при коразоловом киндлинге и антиапоптотическом действии аниконвульсантов. По антиапоптотическому действию противосудорожных препаратов их можно расположить в следующей последовательности: ламотриждин > вальпроат натрия > топирамат = габапентин > карбамазепин.

1. *Baker G. A.* Newly diagnosed epilepsy: cognitive outcome after 12 months / Baker G. A., Taylor J., Aldenkamp A. P. // Epilepsia.– 2011. – V. 52. – P. 1084–91.
2. Значение оценки когнитивных функций у больных эпилепсией / Елисеева Н. Г., Войтенков В. Б., Борисова Е. В. [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2008. – № 8 (4). – С. 59–63.
3. Willie's Treatment of Epilepsy. Principles and Practice / [Wyllie E.,Cascino G. D., Gidal B. E., Goodkin H. P.]. –5b Ed. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
4. Neurocognitive effects of brivaracetam, levetiracetam, and lorazepam / Meador K. J., Gevins A., Leese P. T. [et al.] // Epilepsia. – 2011. –P. 264–72.
5. Влияние противосудорожной терапии на когнитивное функционирование больных эпилепсией / Марценковский И. А., Мартынюк В. Ю., Швейкина В. Б. [и др.] // Здоров'я України. – 2009. – № 15/1. – С. 43–45.
6. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline / Hermann B. P., Seidenberg M., Lee E. J. [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – V. 13. – P. 12–20.
7. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
8. Effects of conventional anticonvulsant drugs on generalized tonic-clonic seizures in Noda epileptic rats / Inoue M., Yamamoto A., Kaneko Y. [et al.] // Epilepsy Res. – 2014. – V. 108 (7). – P. 1158 –67.
9. *Luo Z.* The effects of antiepileptic drug valproic acid on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats / Luo Z., Fang Y., Zhang L. // Pak J. Pharm Sci. – 2015. – V. 28 (1 Suppl). –P. 319–24.
10. *Воронина Т. А.* Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Воронина Т. А., Островская Р. У. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р. У. Хабриева. – [2-е изд.].– Москва : ОАО Изд-во «Медицина», 2005. – С. 308–320.
11. *Бородкин Ю. С.* Нейрохимические и функциональные основы долговременной памяти / Ю. С. Бородкин, Ю. В. Зайцев. – Ленинград : Медицина, 1982. – 216 с.
12. *Bures J.* Cortical spreading depression as a memory disturbing factor / Bures J., Buresude O. // J. comp. and phisiol. – 1963. – V. 56, № 2. – P. 268–272.
13. *Шандра А. А.* Киндлинг и эпилептическая активность / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. – Одесса : Атсропринт, 1999. – 270 с.

14. Effects of gabapentin and topiramate in primary rat astrocyte cultures / V. Cardile, A. Pavone, M. Renis [et al.] // Neuroreport. – 2001. –V. 12. – P. 1705–1708.
15. *Halonen T.* Effect of lamotrigine treatment on status epilepticus-induced neuronal damage and memory impairment in rat / Halonen T., Nissinen J., Pitkinen A. // Epilepsy Res. – 2001. – V. 46. – P. 205–23.
16. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Л. А. Громов, И. Ф. Беленичев // Метод. реком. Государственного фармакологического центра МОЗ Украины. – Киев, 2010. – 81 с.
17. The cognitive effects of oxcarbazepine versus carbamazepine or valproate in newly diagnosed children with partial seizures / Seizure. –2007. – V. 16. – P. 670–679.
18. Lipid peroxidation in adult epileptic patients treated with valproic acid / Martinez B. C., Pita C. E., Sinchez G. Y., Rodriguez L. C. M. // Rev Neurol. – 2004. –V. 38. – P. 101–6.
19. *Tarun A.* Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats / Tarun A., Ashish K. Mehta // Nordic Pharmacological Society. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. – V. 106. – P. 372–377.
20. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / M. Padurariu, A. Ciobica, L. Hritcu [et al.] // Neurosci. – 2010. – Lett, 469. – P. 6–10.

Н. П. Шастун, В. И. Опрышко, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова

Сравнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндлинга

Цель исследования – экспериментальное изучение влияния антиконвульсантов с разным механизмом действия на мнестические функции в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) без амнезирующего фактора, морфофункциональной характеристики сенсомоторной коры у животных на фоне коразолового киндлинга.

Было установлено, что введение внутрижелудочно карбамазепина (125 мг/кг) негативно влияет на обучаемость животных в тесте УРПИ, достоверно уменьшая латентный период захода в темный отсек при воспроизведении навыка по сравнению с контролем. Введение животным ламотриджина (50 мг/кг), габапентина (100 мг/кг), вальпроата натрия (155 мг/кг) и топирамата (304 мг/кг) не оказало негативного эффекта на консолидацию памятного следа в тесте УРПИ без амнезирующего фактора. Наименьшее влияние на воспроизведение энграмм памяти, оказывает ламотриджин, при его введении количество животных с сохраненным навыком составило 90 % ($p < 0,001$).

При изучении морфофункциональных характеристик сенсомоторной коры установлено, что введение профилактическим курсом ламотриджина (50 мг/кг), топирамата (100 мг/кг), вальпроата натрия (60 мг/кг) и габапентина (50 мг/кг) приводило к достоверному повышению плотности нейронов сенсомоторной коры. В исследовании впервые получены данные об инициировании апоптоза при коразоловом киндлинге и антиапоптотическом действии антиконвульсантов. Лидером по антиапоптотическому действию был ламотриджин.

Таким образом, установлено, что наибольшее негативное влияние на когнитивные процессы в эксперименте оказывает карбамазепин, а наиболее высоким нейропротективным и антиапоптотическим эффектом обладает ламотриджин. По антиапоптотическому действию противосудорожные препараты можно расположить в следующей последовательности: ламотриджин > вальпроат натрия > топирамат = габапентин > карбамазепин.

Ключевые слова: антиконвульсанты, сенсомоторная кора, нейропротективный эффект, коразоловый киндлинг

Н. П. Шастун, В. І. Опришко, С. В. Павлов, Н. В. Бухтіярова

Порівняльна оцінка антиконвульсантів різних груп на когнітивні процеси в нормі, морфофункціональні характеристики нейронів сенсомоторної кори та нейроапоптоз за умов коразолового кіндлінгу

Мета дослідження – екпериментальне вивчення впливу антиконвульсантів з різним механізмом дії на мнестичні функції в тесті умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ) без амнезуючого фактора та морфофункціональні показники сенсомоторної кори в тварин на тлі коразолового кіндлінгу.

Встановлено, що введення внутрішньошлунково карбамазепіну (125 мг/кг) негативно впливає на здатність до навчання тварин у тесті УРПУ, достовірно зменшуючи латентний період заходу в темний відсік при відтворенні навику порівняно з контролем. Введення тваринам ламотриджину (50 мг/кг), габапентину (100 мг/кг), вальпроату натрію (155 мг/кг) і топірамату (304 мг/кг) не вплинуло негативно на консолідацію пам'ятного сліду в тесті УРПУ. Найменший вплив на відтворення

енграм пам'яті виявляє ламотриджин, при його введенні кількість тварин зі збереженим навиком склала 90 % (p < 0,001).

При вивченні морфофункціональних змін сенсомоторної кори встановлено, що введення профілактичним курсом ламотриджину (50 мг/кг), топірамату (100 мг/кг), вальпроату натрію (60 мг/кг) і габапентину (50 мг/кг) призводило до достовірного підвищення щільності нейронів сенсомоторної кори. Вперше отримано дані щодо ініціювання апоптозу в разі коразолового кіндлінгу та антиапоптотичної дії антиконвульсантів. Лідером за антиапоптотичним ефектом був ламотриджин.

Таким чином, встановлено, що найнегативніший вплив на когнітивні процеси в експерименті виявляє карбамазепін, а найбільший нейропротективний ефект має ламотриджин. За антиапоптотичною дією протисудомні препарати можна розташувати в наступній послідовності: ламотриджин > вальпроат натрію > топірамат = габапентин > карбамазепін.

Ключові слова: антиконвульсанти, сенсомоторна кора, нейропротективний ефект, коразоловий кіндлінг

N. P. Shastun, V. I. Oprishko, S. V. Pavlov, N. B. Buhtiarova

Comparative assessment of different groups of anticonvulsants impact on cognitive processes in normal, morphological and functional characteristics of neurons of the sensorimotor cortex and neuroapoptosis under pentylenetetrazole-kindling

The purpose of the study – experimental research of the effect of anticonvulsants with different mechanisms of action on cognitive function and morphometric changes in the sensorimotor cortex in animals due to pentylentetrazole-kindling.

It was established that intragastrical introduction of carbamazepine (125 mg/ kg) adversely affects the learning ability of animals in the passive avoidance test, significantly reducing the latency period entrance into the dark compartment when playing skill compared to controls. Introduction of lamotrigine (50 mg/ kg), gabapentin (1000 mg/ kg), sodium valproate (155 mg/ kg) and topiramate (304 mg/ kg) did not affect negatively the consolidation of memorable track in the passive avoidance test. The smallest effect on reproduction memory engrams was influenced by lamotrigine; with its introduction the percentage of animals preserving skill was 90 % (p < 0,001).

When researching the morphological changes in the sensorimotor cortex, it was established that the introduction of prophylactic course of lamotrigine (50 mg/kg), topiramate (100 mg/kg), sodium valproate (60 mg/kg) and gabapentin (50 mg / kg) led to a significant increase in the density of neurons in the sensorimotor bark. We first obtained data on initiation of apoptosis under pentylenetetrazole-kindling and anti-apoptosis effect of anticonvulsants. The leader of the anti-apoptosis effect was lamotrigine.

Thus, it was established that the greatest negative impact on cognitive processes in the experiment was caused by carbamazepine, and the highest neuroprotective effect has lamotrigine. For anti-apoptosis effect anticonvulsants can be arranged in the following order: lamotrigine > sodium valproate > topiramate = gabapentin > carbamazepine.

Key words: anticonvulsants, sensorimotor cortex, neuroprotective effect, pentylenetetrazole-kindling

Надійшла: 03.04.2015 р.

Контактна особа: Опришко В. І., доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, клінічної фармакології та фармакоекономікии, ДУ «Дніпропетровська державна медична академія», буд. 9, вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49600. Тел.: + 38 0 95 785 32 95.
Електронна пошта: mailvalentina_pharma@mail.ru

УДК 577.127:616-092.9

O. Kharchenko

Long-term alcohol consumption provokes oxidative and nitrosative stress in albino rats brain

Taras Shevchenko National University of Kyiv

Key words: long-term alcohol consumption, brain, rats

Introduction. At present alcohol has become an important socio-medical problem due to its massive uncontrollable consumption in the world. Chronic alcohol consumption causes serious consequences for entire nervous system functioning and, particularly, the brain [1], associated with metabolic processes complex violations [2]. In adult human chronic alcoholics, brain damage is characterized by cerebral and cerebellar atrophy, and impaired neuronal function within the hippocampus and frontal cortex. Besides specific alcohol-related disorders, such as Wernicke–Korsakoff syndrome, hepatic encephalopathy and pellagra, heavy alcohol consumers exhibit cognitive and motor impairments, cholinergic deficits and dementia [3]. It is estimated that 50–75 % of long-term alcoholics show cognitive impairment and structural damage to the brain, making chronic alcoholism the second leading cause of dementia behind Alzheimer's disease [3]. Neuropathological analyses have provided evidence for loss of neurons in certain regions of the brain of alcoholics [4].

Among several proposed mechanisms of brain damage at chronic alcoholism, should be mentioned accumulation of DNA damages in the absence of repair processes, resulting in genomic instability and death of neurons [3]. The processes of alcohol metabolism are also connected with generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) via induction of NADPH/xanthine oxidase, nitric oxide synthase (NOS), and cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) [5, 6]. Additionally, ethanol activates and recruits toll-like receptors (TLR)4 within the lipid rafts of glial cells, triggering the production of inflammatory mediators and causing neuroinflammation [7].

It is very important to note that synaptic changes promoted by ethanol are mediated directly and indirectly by acetylcholine, dopamine, serotonin, glutamate, GABA and other neurotransmitters [8].

However, despite of intensive investigation of alcoholism consequences for nervous system, the full complex of such metabolic alterations remains unknown, as soon as limiting and regulating factors of alcohol metabolism in brain [9]. Based on these facts and considering that alcoholism is chronic disease highly prevalent in the world population, the present work reports the influence of chronic ethanol consumption on rats' brain NO-synthase activities, and pro- and antioxidant system parameters.

Material and methods. Wistar albino male rats, body weight (b.w.) of 150 g to 170 g, were used in the study. They were kept under a controlled temperature (from 22 °C to 24 °C), relative humidity of 40 % to 70 %, lighting (12 h light-dark cycle), and on a standard pellet feed diet («Phoenix» Ltd., Ukraine). The study was performed in accordance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. The «Principles of laboratory animal care» (NIH publication № 85–23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws where applicable. All experiments have been examined and approved by the bioethics committee of theEducational and Scientific Centre «Institute of Biology», Taras Shevchenko National University of Kyiv. For the experimental (chronic alcoholism) model, reproducing male rats were selected

© O. Kharchenko, 2015

according to the method for measuring voluntary alcohol self-administration in rats, which provides a continuous choice between an alcohol solution and water (two bottle preference test) [10]. The six selected rats were used for chronic alcoholism modeling by replacing water with a 15 % ethanol solution during 150 days. Six intact male rats (of the same age and weight) were used as a control. From the beginning of the experiment, they were kept in the same conditions as experimental animals but were given only water ad libitum.

After 150 days, both the experimental and control rats were sacrificed by decapitation under a mild ether anesthesia. Their brains were used for investigation.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activities measure in brains were performed by spectrophotometric method [11]. Concentration of protein in brain fractions was determined by the Bradford protein assay using bovine serum albumin as a standard.

Lipid peroxidation was investigated as the rate of ascorbate-induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation [12], superoxide dismutase activity (SOD) was determined in accordance to Chevary [13], catalase activity was detected using the colorimetric ammonium molybdate method [14].

The obtained data were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) and expressed as the mean ± standard error of the mean (M ± S.E.M.). Data were compared using Tukey test. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0,05$.

Results and discussions. Increased cellular oxidative stress and altered antioxidant pool have been implicated at alcoholism. Our data on state of brain's pro- and antioxidant system at alcoholism coincide with data of other authors. Ethanol enhances ROS production in brain through a number of pathways including increased generation of hydroxyl ethyl radicals, induction of CYP2E1, alteration of the cytokine signaling pathways for induction of iNOS and secretory phospholipase A_2 ($sPLA_2$), and production of prostanoids through the PLA_2/COX pathways. Excess of free oxygen radicals could cause brain tissue damage not only via lipid peroxydation, but also proteins denaturation, enzymes inactivation, nucleic acids damage, Ca^{2+} release and cytoskeleton destruction. Influence of free radicals mediates blood-brain barrier functions violations, endothelial dysfunctions with constant vasodilatation [15].

Results on brain nitric oxide synthases activities following 150 days alcohol administration are demonstrated in table. The level of iNOS in ethanol-treated rat's brain was within the normal limits. At the same times cNOS activity was raised 2,8 times as compared with control.

Our results on cNOS activity rates at alcoholism are in good correspondence with other authors data [16]. According to their results glutamatergic system is directly involved into mediating acute and chronic alcohol effects. Its receptors are included into NO signal way, as N-methyl-D-aspartate (NDMA) glutamatergic receptors stimulation caused Ca^{2+} exit from the depot with further calmodulin binding and neuronal NOS (nNOS) activation. nNOS gene is of key importance for regulation behavioral effects of alcohol [16].

As it was reviewed, brain tissue is most vulnerable to oxidative damage caused by its high consumption of oxy-

Table

Levels of iNOS and cNOS activities in rat's brain after 150 days 15% ethanol consumption, M ± S.E.M (n = 6)

Indices	Animal groups	
	Control	Chronic alcoholism
iNOS activity, nM $NO_2^- \cdot min^{-1} \cdot$ mg of protein^{-1}	3,53 ± 0,62	3,32 ± 0,89
cNOS activity, nM $NO_2^- \cdot min^{-1} \cdot$ mg of protein^{-1}	1,92 ± 0,36	5,45 ± 0,31*

**p < 0,05 statistically significant in comparison with control*

gen, a high metabolic rate, and low levels of antioxidant enzymes, such as SOD, glutathione peroxidase, and catalase. A large increase of lipid peroxidation levels is caused by an increase in ROS, because of the brain's high content of polyunsaturated fatty acids that are highly susceptible to oxidation [17].

Data on brain pro- and antioxidant system state are shown in figure.

Compared with the unaffected animals, ethanol-treated rats showed brain pro- and antioxidant system alteration. The chronic 15 % ethanol administration led to increase of TBARS rate formation (42 %). Under this condition the activities of antioxidant enzymes SOD and catalase were decreased 19 % and 25 % respectively.

In the current study the increased TBARS levels in ethanol-exposed rats' brain evidenced oxidative stress development. Several studies have examined the role of oxidative stress in alcohol-mediated neurotoxicity, possibly via the formation of free radicals [18–20]. The free radicals interact with other cell components, such as proteins, DNA, and lipids, to form multiple catabolic products.

An example of these is lipid peroxidation resulting in lipid hydroperoxides and aldehydes that interact with the sulfhydryl groups of proteins causing the loss of protein functionality and thus perpetuating cell damage. The increased levels of calcium and nitric oxide stimulate the production of inflammatory interleukins causing gliosis and increasing the state of oxidative stress causes damage and cell death [21], thus establishing a cycle through a chain of oxidative reactions that could involve both neurons and glia. At the conditions of our experiment we have established the increase of brain biomolecules oxidation with simultaneous decrease in the activity of antioxidant system, which could be evidence of redox balance loosing. It is known that the fate of a synapse depending in part on the redox balance means that if the oxidant-environmental cell produces an oxidative-stressed state and the reactive oxygen species (ROS) cause elimination of spines [22].

Ethanol can react with the OH• radical to form the alpha-hydroxyethyl radical, which is considered to be less toxic. It also can stimulate H_2O_2 degradation through catalase activation [23]. In mammalian brain catalase is the main enzyme that catalyzes the peroxidatic oxidation of ethanol to acetaldehyde, and its inhibition is associated with functional and metabolic disturbances of the central nervous system (CNS) [24, 25]. The information concerning brain catalase activity following experimental chronic alcohol intoxication is insufficient and contradictory. At these circumstances different researchers indicated increase [26], decrease [27] and absence of changes [24] in catalase activity. It could be a result of different animals' models using. We observed decrease

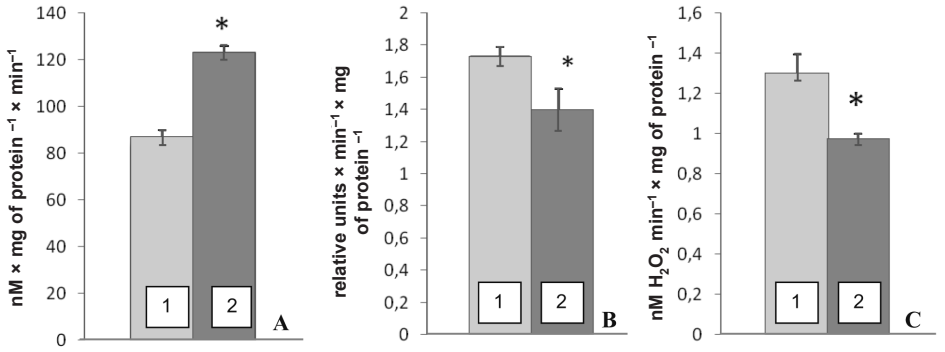


Figure. Rat brain pro- and antioxidant system state after 150 days 15% ethanol consumption (A – TBARS content, B – SOD activity, C – catalase activity; 1 – control, 2 – chronic alcoholism) (M ± S.E.M., n = 6 for each group)

**P < 0,05 statistically significant in comparison with control*

of brain catalase activity in rats chronically exposed to 15 % ethanol solution. Other authors suggest that catalase is likely to be a more major contributor to ethanol oxidation in the brain [28]. Inhibition of brain catalase activity in mice inhibits many of the pharmacologic effects of ethanol, and inhibition or stimulation of catalase activity, respectively, reduces or increases the formation of acetaldehyde in brain homogenates [28].

In our experiments chronic ethanol self-administration significantly decreased SOD activitiy in the brain of experimental animals. Such inhibition of SOD activity by ethanol may allow an accumulation of cytotoxic O^{2-} radicals; this may account for nervous system disorders during alcohol intoxication [29].

We suggest that the decrease in SOD and catalase activities may indicate an oxidative modification of the enzymatic proteins caused by free radicals which are generated during ethanol and acetaldehyde metabolism.

Thus, in the brain of rats due to chronic alcohol intoxication, as a result of the accumulation of reactive oxygen and nitrogen, and antioxidant system depletion, the oxidative stress is developed. Such changes are of particular importance for brain cells characterized by low contents of external and endogenous antioxidants as compared with other tissues. These alterations (together with high levels of polyunsaturated fatty acids) make CNS extremely susceptible to free radical damage.

1. Impairments of brain and behavior the neurological effects of alcohol / Oscar-Berman M., Shagrin B., Evert D. L., Epstein C. // Alcohol Health Res World. –1997. – V. 21 (1). – P. 65–75.
2. Role of plasma amino acids and gaba in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease – a pilot study / Mukherjee S., Vaidyanathan K., Vasudevan D. M. and Das S. K. // Indian J. Clin.Biochem. – 2010. – V. 25 (1). – P. 37–42.
3. *Kruman I. I.* DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse / Kruman I. I., Henderson G. I., Bergeson S. E. // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2012. – V. 237 (7). – P. 740–747. doi:10.1258/ebm.2012.011421
4. *Harper C.* The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? / C. Harper. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 1998. – V. 57. – P. 101–110.
5. Mechanism of alcohol-induced stress and neuronal injury / Haorah J., Ramírez S. H., Floreani N. [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – V. 45. – P. 1542–1550.
6. *Josá S-C M.* Distribution and Differential Induction of CYP2E1 by Ethanol and Acetone in the Mesocorticolimbic System of Rat / Josá S-C M. , Hipólito L., Guerri C. // Alcohol & Alcoholism. –2008. – V. 43 (4). – P. 401–407.
7. *Fernandez-Lizarbe S.* Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells / Fernandez-Lizarbe S., Montesinos J., Guerri C. // J. Neurochem. – 2013. – V. 126 (2). – P. 261–273. doi: 10.1111/jnc.12276.
8. *Olney J. W.* Alcohol damage to the brain. In: Ramachandran VS ed. Encyclopedia of the human brain / J. W. Olney. – USA : Academic press/Elsevier Science, 2002.
9. *Cederbaum A. I.* Alcohol metabolism / Cederbaum A. I. // Clin. Liver Dis. – 2012. – V. 16 (4). – P. 667–685.
10. *Richter C. P.* Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats / Richter C. P., Campbell K. H. // Science. –1940. – V. 91 (2369). – P. 507–508.
11. Inactivation of macrophage nitric oxide synthase activity by NG-methyl-L-arginine / Olken N. M., Rusche K. M., Richards M. K., Maretta M. A. // Biochem.Biophys. Res. Commun. – 1991. – Jun 14. – V. 177 (2). – P. 828–833.
12. *Stalnaya I. D.* Method for malonedialdehyde determination with thiobarbituric acid, in Modern Methods in Biology (Orechovich VN eds) / I. D. Stalnaya, T. G. Gharishvili. – Moscow : Medicine, 1977. – P. 66–68.
13. *Chevary S.*The role of superoxide dismutase in cellular oxidation and methods of its determination in biologic material / Chevary S., Chaba I., Serei I. // Lab. Delo. – 1985. – № 11. – P. 678–681.
14. A method for measuring catalase activity / Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., Tokarev V. E. // Lab. Delo. – 1988. – № 1. – P. 16–19.
15. *Fuchs J.* Environmental Stressors in Health and Disease / J. Fuchs, L. Packer. –New York : Marcel Dekker, Inc., 2001.
16. Nicotine improves ethanol-induced impairment of memory: possible involvement of nitric oxide in the dorsal hippocampus of mice / Raoufi N., Piri M., Moshfegh A., Shahin M. S. // Neuroscience. – 2012. – Sep 6. – № 219. – P. 82–91.

17. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions / Hermida-Ameijeiras Á., Méndez-Álvarez E., Sánchez-Iglesias S. [et al.] // Neurochemistry International. – 2004. – № 45. – P. 103–116.
18. Alcohol-induced oxidative/nitrosative stress alters brain mitochondrial membrane properties / Reddy V. D., Padmavathi P., Kavitha G. [et al.] // Mol. Cell Biochem. – 2013. – V. 375 (1–2). – P. 39–47.
19. *Qin L.* Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration / Qin L., Crews F. T. // J. Neuroinflammation. – 2012. – № 9. – P. 130.
20. *Qin L*. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration / Qin L., Crews F. T. // J. Neuroinflammation. – 2012. – № 9. – P. 5.
21. Mechanisms of cell death in oxidative stress / Ryter S. W., Kim H. P., Hoetzel A. [et al.] // Antiox. Redox Signal. – 2007. – № 9. – P. 49–89.
22. Chronic alcohol consumption and cerebral indices of oxidative stress: is there a link? / Götz M. E., Janetzky B., Pohli S. [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2001. –№ 25 (5). – P. 717–725.
23. Ethanol can modify the effects of certain free radical-generating systems on astrocytes / Gonthier B., Signorini-Allibe N., Soubeyran A. [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2004. – V. 28 (4). – P. 526–534.
24. *Rhoads D. E.* Brain Levels of Catalase Remain Constant through Strain, Developmental, and Chronic Alcohol Challenges / Rhoads D. E., Contreras C., Fathalla S. // Enzyme Research. – 2012. – P. 1–6.
25. Expression of Catalase mRNA and Protein in Adult Rat Brain: Detection by Nonradioactive In Situ Hybridization with Signal Amplification by Catalyzed Reporter Deposition (ISH–CARD) and Immunohistochemistry (IHC)/ Immunofluorescence (IF) / Schad A., Fahimi H.D., Völkl A., Baumgart E. // The J. of Histochemistry&Cytochemistry. – 2003. – V. 51 (6). – P. 751–760.
26. *Omodeo-Sale F.* Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Rat Brain: Effect of Chronic Alcohol Consumption / Omodeo-Sale F., Graminga D., Campaniello R. // Neurochemical Research. – 1997. – V. 22 (5). – P. 577–582.
27. *Jaya D. S.* Role of lipid peroxides, glutathione and antiperoxidative enzymes in alcohol and drug toxicity / Jaya D. S., Augstine J., Menon V. P. // Indian J. Exp. Biol. – 1993. – V. 31 (5). – P.4 53–459.
28. Oxidation of ethanol in the rat brain and effects associated with chronic ethanol exposure / Wang J., Du H., Jiang L. [et al.] // PNAS. – 2013. –V. 110 (35). – P. 14444–14449.
29. *Ledig M.* Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication / Ledig M., M'Paria J. R., Mandel P. // Neurochen Res. –1981. – V. 6 (4). – P. 385–390.

O. Kharchenko

Long-term alcohol consumption provokes oxidative and nitrosative stress in albino rats brain

Despite of intensive investigation of alcoholism consequences for nervous system, the full complex of such metabolic alterations in brain remains unknown. *The aim of present work* was to study the influence of chronic ethanol consumption on rats' brain NO-synthase activities, and pro- and antioxidant system parameters.

Wistar albino male rats (body weight 160–200 g) were divided into two groups: I – experimental chronic alcoholism, II – intact animals.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activities measure in brains were performed by spectrophotometric method. Lipid peroxidation was investigated as the rate of ascorbate-induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation, superoxide dismutase activity (SOD) was determined in accordance to Chevary, catalase activity was detected using the colorimetric ammonium molybdate method.

Results of the study suggest that under chronic alcohol consumption during 150 days in rats brain cNOS activity increased 2,8 times and TBARS formation rates rose 42 %. At the same time SOD and catalase activities decreased 19 % and 25 % respectively.

Thus, in the brain of rats due to chronic alcohol consumption, as a result of the accumulation of reactive oxygen and nitrogen, and antioxidant system depletion, the oxidative stress is developed. Such changes are of particular importance for brain cells characterized by low contents of external and endogenous antioxidants as compared with other tissues. These alterations (together with high levels of polyunsaturated fatty acids) make central nervous system extremely susceptible to free radical damage.

Key words: long-term alcohol consumption, brain, rats

О. Харченко

Розвиток оксидативного та нітрозативного стресу в мозку білих щурів за умов тривалого споживання алкоголю

Незважаючи на інтенсивне дослідження наслідків алкоголізму для нервової системи, повний комплекс метаболічних змін у головному мозку залишається остаточно не з'ясованим.

Мета дослідження – вивчення впливу хронічного споживання етанолу на активність NO-синтази та показники про- і антиоксидантної системи в мозку щурів.

Щури-самці лінії Вістар масою 160–200 г були розподілені на дві групи: I – експериментальний хронічний алкоголізм, II – інтактні тварини.

Вимірювання індуцибельної NO-синтази (iNOC) та конститутивної NO-синтази (cNOC) у мозку проводили спектрофотометричним методом. Перекисне окиснення ліпідів було досліджено за швидкістю аскорбат-індукованого утворення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти), активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за Чеварі, активність каталази визначали колориметричним методом з молібдатом амонію.

У результаті проведених досліджень було показано, що за умов хронічного споживання алкоголю протягом 150 днів у мозку щурів зростала активність cNOC у 2,8 разу та швидкість утворення ТБК-реактантів на 42 % порівняно з інтактними тваринами. При цьому активність СОД та каталази знижувалися на 19 і 25 % відповідно.

Таким чином, внаслідок тривалого споживання алкоголю відбувається розвиток оксидативного стресу в мозку щурів у результаті як накопичення активних форм кисню та азоту, так і виснаження антиоксидантних систем. Особливе значення ці зміни становлять для клітин мозку, що характеризуються низьким вмістом екзогенних і ендогенних антиоксидантів порівняно з іншими тканинами, що в поєднанні з високим рівнем поліненасичених жирних кислот робить центральну нервову систему виключно сприйнятливою до вільнорадикального ушкодження.

Ключові слова: тривале споживання алкоголю, мозок, щури

О. Харченко

Развитие оксидативного и нитрозативного стресса в мозге белых крыс при длительном потреблении алкоголя

Несмотря на интенсивные исследования последствий алкоголизма для нервной системы, полный комплекс метаболических изменений в головном мозге остается окончательно не выясненным.

Цель исследования – изучение влияния хронического потребления этанола на активность NO-синтазы и показатели про- и антиоксидантной системы в мозге крыс.

Крысы-самцы линии Вистар массой 160–200 г были разделены на две группы: I – экспериментальный хронический алкоголизм, II – интактные животные. Измерение индуцибельной NO-синтазы (iNOC) и конститутивной NO-синтазы (cNOC) в мозге проводили спектрофотометрическим методом. Перекисное окисление липидов исследовали по скорости аскорбат-индуцированного образования продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактанты), активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по Чевари, активность каталазы – колориметрическим методом с молибдатом аммония.

В результате проведенных исследований было показано, что в условиях хронического потребления алкоголя в течение150 дней в мозге крыс увеличилась активность cNOC в 2,8 раза и скорость образования ТБК-реактантов на 42 % по сравнению с интактными животными. При этом активность СОД и каталазы снижались на 19 и 25 % соответственно.

Таким образом, в результате хронического потребления алкоголя происходит развитие оксидативного стресса в мозге крыс в результате как накопления активных форм кислорода и азота, так и истощения антиоксидантных систем. Особое значение эти изменения представляют для клеток мозга, характеризующихся низким содержанием экзогенных и эндогенных антиоксидантов по сравнению с другими тканями, что в сочетании с высоким уровнем полиненасыщенных жирных кислот делает центральную нервную систему исключительно восприимчивой к свободнорадикальному повреждению.

Ключевые слова: длительное потребление алкоголя, мозг, крысы

Надійшла: 01.04.2015 р.

Контактна особа: Харченко Ольга Іванівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, ННЦ «Інститут біології», кафедра біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, буд. 64/13, вул. Володимирська, м. Київ, 01601. Тел.: +38 0 44 521 35 98. Електронна пошта: 77olgaz@gmail.com

УДК 615.276:547.583.5:547.459.5

**С. М. Дроговоз, М. В. Зупанец,
А. В. Кононенко, Ж. У. Абдурахмонов**

Антиартритные препараты природного происхождения – альтернатива НПВС

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: густой экстракт листьев рябины обыкновенной, глюкозамина гидрохлорид, N-фенилантраниловая кислота, коллаген-индуцированный артрит

Основное место среди воспалительных заболеваний принадлежит патологии суставов, при которой наблюдаются все стадии воспаления [1]. Воспаление суставов встречается у 20–45 % населения во всех странах мира [2]. Артрит чаще встречается у людей среднего возраста, в отличие от артроза, которым в большей мере подвержены пожилые люди. Поэтому социальная опасность артрита состоит в том, что со временем более 15 % больных артритом становятся инвалидами [7]. В связи с этим в последнее десятилетие все большее внимание уделяется усовершенствованию лечение артрита. Современная терапия большинства заболеваний опорно-двигательного аппарата и, в частности, артрита невозможна без применения нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Эти препараты при всем их разнообразии и эффективности могут повреждать слизистую оболочку желудка и кишечника, вызывать высокий риск развития желудочно-кишечных кровотечений, а также оказывать негативное влияние на печень и почки [5]. Поэтому по-прежнему является актуальным поиск новых эффективных и безопасных антиартритных препаратов природного происхождения [3].

Глюкозамин (по своей природе – аминосахарид), являясь физиологическим компонентом суставного хряща, активирует синтез протеогликанов в синовиальной жидкости, угнетает ферменты – фосфолипазу A_2 и коллагеназу, уменьшает образование супероксидных радикалов, снижает активность лизосомальных ферментов [4]. Существует более 50 вариаций хондропротекторов, в состав которых входит глюкозамин. В работах профессоров С. М. Дроговоз и И. А. Зупанца доказана противовоспалительная активность производных глюкозамина [4, 5, 7].

N-фенилантраниловая кислота (химическая основа гепатопротектора антраль) обладает противовоспалительным, анальгетическим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим, жаропонижающим, гепатозащитным действием [2, 8, 12].

Из данных литературы известно, что с давних времен в народной медицине рябина обыкновенная применяется при лечении различных заболеваний благодаря содержанию в листьях этого растения веществ, оказывающих противовоспалительное (фенольные соединения, антоцианы), антиоксидантное (антоцианы, аскорбиновая кислота), репаративное действие (каротиноиды) [9–11, 14].

В связи с тем, что терапия заболеваний опорно-двигательного аппарата требует длительного применения лекарств, актуальным является создание малотоксичных НПВС природного происхождения. Последние являются перспективным источником для создания современных противовоспалительных препаратов, так как обладают меньшей токсичностью и выраженным противовоспалительным действием.

Цель исследования – сравнение антиартритной активности двух перспективных субстанций с референс-препаратом (натрия диклофенаком): производное глюкозамина и N-фенилантраниловой кислоты (D-(+)-глюкозиламмониевая соль 5-нитро-N-фенилантраниловой кислоты, шифр 1-БИСГ) и густой экстракт листьев рябины обыкновенной (шифр ГЭЛРО), с доказанной противовоспалительной, ангиоксидантной, мембрано-

© Колектив авторів, 2015

стабилизирующей и репаративной активностями [12, 14].

Материалы и методы. Исследование влияния 1-БИСГ и ГЭЛРО на ход коллаген-индуцированного артрита (КИА) проведено на 50 белых крысах обоего пола массой 180–200 г, которые были распределены на 5 опытных групп по 10 животных в каждой. Первая группа – интактный контроль, вторая группа – контрольная патология; третья и четвертая группы – животные с КИА, получавшие 1-БИСГ в дозе 11 мг/кг, что является эквимолекулярной дозой по отношению к дозе натрия диклофенака (8 мг/кг), и ГЭЛРО в дозе 100 мг/кг, доза которого была определена как условно-терапевтическая на моделях карагенинового и зимозанового отеков у крыс [12–14]. Референс-препаратом был выбран «золотой стандарт» НПВС – натрия диклофенак в дозе 8 мг/кг (Вольтарен, «Novartis Pharma S.A.S.», табл. по 25 мг) [13].

В ходе эксперимента у крыс 2, 3, 4 и 5 групп воспроизводили аутоиммунный артрит путем подкожного введения в основание хвоста эмульгированной смеси 0,2 % раствора бычьего коллагена II типа («Sigma-Aldrich», США) в 0,1 М уксусной кислоте и полного адъюванта Фрейнда («Sigma-Aldrich», США) в соотношении 1:1 в дозе 2 мг/кг по коллагену [6]. Через 1 неделю для потенцирования аутоиммунного процесса повторно вводили иммунизирующую смесь в такой же дозе. Начиная с 14 дня и в течение последующих дней до 28 дня эксперимента 3 и 4 группе крыс внутрижелудочно вводили исследуемые субстанции (БИСГ-1 и ГЭЛРО) в виде водных суспензий 1 раз в 1 сутки, а 5 группе, в таком же терапевтическом режиме, вводили референтный препарат.

В ходе исследования измеряли объем задней правой лапы крысы при помощи цифрового плетизмометра IITC Life Science (США) на 14 и 28 сутки артрита и высчитывали величину отека [4].

На 28 сутки эксперимента животных подвергали декапитации под эфирным наркозом, ампутированные конечности фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Суставы подвергали декальцинации в 5 % растворе муравьиной кислоты, погружали в целлоидин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и проводили морфологические исследования. Для объективизации полученных данных производили морфометрические измерения. С помощью окуляр-микрометра на микропрепаратах определяли толщину хряща, которая измерялась в 3 точках – центральная часть головки, верхний и нижний край. Толщину суставного хряща выражали в условных единицах. Также подсчитывали плотность расположения хондроцитов в условной единице площади [15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента с помощью компьютерных программ STATISTICA 7.0 и MS Exel 2007 и представляли в виде сравнительных таблиц с результатами различных групп [16].

Результаты и их обсуждение. После моделирования КИА у животных наблюдали развитие полиартрита, проявлением которого была гиперемия, отек конечностей с увеличением их объема и болезненностью при нажатии. На 10–14 день эксперимента наблюдали максимальное проявление признаков полиартрита. У животных снижалась подвижность в течение дня, потребление пищи и воды.

На фоне моделированного КИА на 14 день опыта (пик патологии) разница объема лап по отношению к интактному контролю составляла (0,88 ± 0,04) мл. На 28 день эксперимента в группе крыс КИА наибольшую противовоспалительную активность отмечали на фоне применения натрия диклофенака – 54 %. Антиэксудативную активность наблюдали и при применении 1-БИСГ и ГЭЛРО – 42,1 и 35,5 % соответственно (табл. 1).

На 28 сутки у животных группы контрольной патологии в различных тканях коленного сустава выявлены отчетливые морфопатологические изменения (табл. 2).

Патологический процесс характеризуется развитием гиперпластических воспалительных и деструктивных явлений.

Таблица 1

Сравнение антиэксудативной активности БИСГ-1 и ГЭЛРО на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс (n = 10)

Исследуемая группа	Разница объема лапы крысы, мл		Антиэксудативная активность на 28 день, %
	14 день	28 день	
Контрольная патология (КП)	0,88 ± 0,04	0,83 ± 0,03	–
1-БИСГ, 11,0 мг/кг	0,86 ± 0,06	0,54 ± 0,02*/**	42,1
ГЭЛРО, 100 мг/кг	0,80 ± 0,07	0,61 ± 0,02*/**	35,5
Натрия диклофенак, 8,0 мг/кг	0,85 ± 0,02	0,44 ± 0,02*/**	54,0

*Примечание. *p < 0,001 по отношению к КП на 28 день, **p < 0,001 по отношению к 14 дню эксперимента.*

Таблица 2

Морфометрические показатели суставного хряща крыс в условиях коллаген-индуцированного артрита и влияния БИСГ-1 и ГЭЛРО

Группа	Толщина хряща, у.е.	Клеточная плотность, у. е.
Интактный контроль	11,480 ± 0,290	27,15 ± 0,94
Контрольная патология	8,510 ± 0,520*	23,33 ± 1,09*
1-БИСГ, 11,0 мг/кг	9,580 ± 0,520*	25,17 ± 1,09*
ГЭЛРО, 100 мг/кг	8,530 ± 0,370*	27,16 ± 0,98**
Натрия диклофенак, 8,0 мг/кг	8,140 ± 0,721	24,66 ± 1,70

*Примечание. *Достоверно (p ≤ 0,5) относительно интактного контроля, **достоверно (p ≤ 0,5) относительно контрольной патологии.*

В частности, поверхность суставного хряща была неровная, разъеденная, расплавленная. Нарушена зональная организация хряща, во внешней зоне местами отсутствуют хондроциты. Сама хрящевая пластинка истончена по сравнению с интактным контролем (на 26 %), кое-где в ней встречаются пустые капсулы без хондроцитов, плотность расположения клеток на стандартной площади микрометрической сетки снижена на 14 % (табл. 2, рис. 1). У большинства крыс гиперплазированная синовиальная оболочка «наползает» на боковую суставную поверхность, срастаясь с ней, образуя так называемый паннус (рис. 1 б).

Положительное лечебное влияние исследуемых субстанций на течение КИА было подтверждено морфологическими исследованиями. Введение БИСГ-1 в течении 14 дней (с 14 по 28 день) на фоне развития КИА предотвращает развитие выраженных деструктивных процессов в хрящевой ткани. Суставной хрящ – с ровной поверхностью, имеет выраженную многослойность,

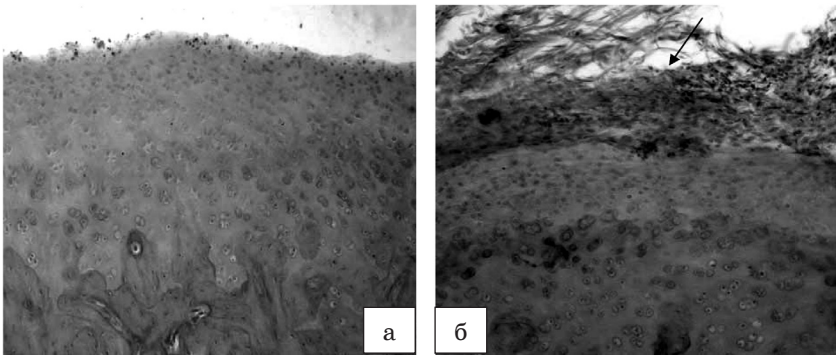


Рис. 1. Коленный сустав крысы на 28 день коллаген-индуцированного артрита. Поверхность суставного хряща неровная, разъеденная, расплавленная, плотность хондроцитов уменьшена, × 400 (а); сростание паннуса (гиперплазированной синовиальной оболочки) с хрящом, × 200 (б). Гематоксилин и эозин.

разнородный характер хондроцитов на разных уровнях структуры. Толщина суставного хряща увеличена относительно хряща животных группы контрольной патологии, но еще не достигает уровня интактного контроля. Плотность расположения хондроцитов на стандартной площади микрометрической сетки несколько выше, чем у нелеченых крыс (табл. 2). У большей части крыс синовиальная оболочка суставов имеет нормальное строение. Периартикулярная ткань, как и у интактных животных, представлена рыхлой волокнистой тканью (рис. 2).

В группе животных, леченных ГЭЛРО, синовиальная оболочка с признаками пролиферативного синовита формирует паннус и наползает на боковую поверхность хряща, но, в отличие от нелеченых животных, полной инвазии синовии в хрящевую ткань не отмечено. Лишь иногда встречаются непротяженные участки, на которых соединительная ткань плотно срастается с хрящевой тканью, имеются единичные дистрофически измененные хондроциты в местах контакта хряща с соединительной тканью (рис. 3а). Редко встречаются незначительные по протяженности бесклеточные участки и участки с очень узким хрящом, где ходроциты расположены лишь в 2–3 ряда (рис. 3 б). Как следствие, толщина хряща, сниженная на 25,7 % в среднем по группе, не отличается от показателей контрольной патологии. Однако показатель клеточной плотности возрастает до уровня интактного контроля (табл. 2). Хондроциты в суставных хрящах животных этой группы лежат густо и не всегда упорядочено.

Применение референтного препарата диклофенака натрия снижает выраженность воспалительно-пролиферативных процессов в периартикулярных тканях. Мягкотканная структура инфильтрирована лейкоцитами, содержит гранулемы, мышцы очагово лизированы. Признаки синовита отмечают-

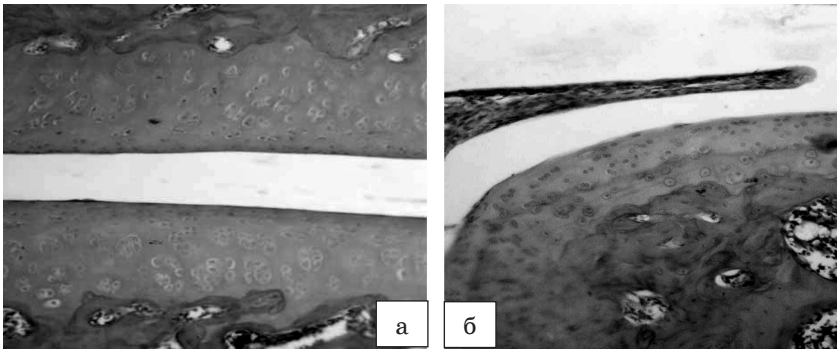


Рис. 2. Голеностопный сустав крысы на 28 день коллаген-индуцированного артрита после лечения БИСГ-1. Нормальная структура суставного хряща (а). Синовиальная оболочка не изменена (б). Гематоксилин и эозин, × 200.

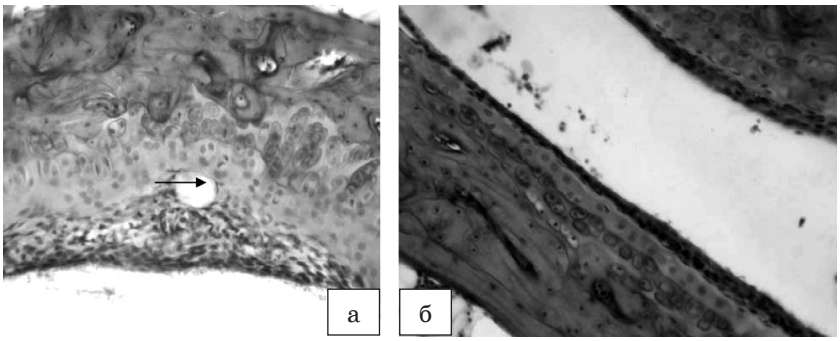


Рис. 3. Голеностопный сустав крысы на 28 день коллаген-индуцированного артрита после лечения ГЭЛРО. Соединительная ткань, плотно сросшаяся с хрящевой поверхностью. Дистрофически измененный ходроцит (стрелка). Густо расположенные хондроциты (а). Участок очень узкого хряща (б). Гематоксилин и эозин, × 200.

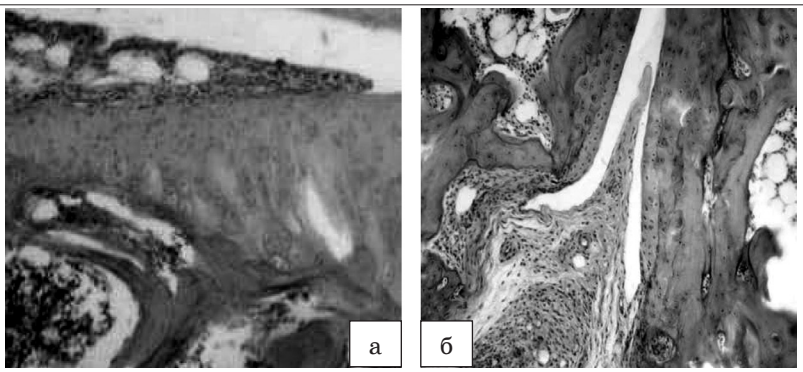


Рис. 4. Голеностопный сустав крысы на 28 день коллаген-индуцированного артрита после лечения диклофенаком натрия. Узкий паннус плотно прилегает к поверхности хряща, × 200 (а). Синовий без краевой пролиферации синовиоцитов, хрящ не изменен, × 150 (б). Гематоксилин и эозин.

ся, но синовиальные оболочки несколько спокойнее, чем в группе крыс контрольной патологии. В случае, когда пролиферативные процессы локализованы только в субсиновиальном слое, а краевые синовиоциты лежат в 1–2 слоя, синовит лежит в суставном пространстве, не касаясь хрящевой поверхности, и хрящ при этом не изменен (рис. 4). Кроме того, суставные поверхности с полностью инвазированным хрящом не встречаются. Толщина хряща не восстанавливается, однако плотность расположения хондроцитов повышается на 9 % (табл. 2).

Выводы

Результаты проведенных фармакологических и морфологических исследований позволяют сделать следующие выводы:

- под влиянием иммунизации крыс с помощью коллагена II типа и полного адъюванта Фрейнда в коленных суставах животных возникают выраженные морфологические признаки аутоиммунного артрита, который на 28 сутки исследования имеет признаки продуктивного синовита, формирования паннуса, выразительных деструктивных явлений хрящевой ткани с полной потерей структуры и замещением пораженных участков грануляционной тканью; объем сустава увеличен в среднем на 90 %;
- 1-БИСГ и натрия диклофенак оказывают выраженное нормализующее влияние на патологические изменения в строении суставов крыс с КИА: деструкция хряща и гиперплазия покровных тканей выражена слабо; под влиянием 1-БИСГ наблюдались только остаточные явления в синовиальных оболочках;
- ГЭЛРО оказывает также нормализующее влияние на состояние кроющих тканей сустава, снижается выраженность синовита, в результате чего не было выявлено хрящевых поверхностей с полностью инвазированными и разрушенными синовиальными оболочками;
- под влиянием ГЭЛРО повышается до интактных величин такой показатель, как клеточная плотность хондроцитов;
- 1-БИСГ более активно снижает деструктивные процессы в тканях, в отличие от ГЭЛРО, хондропротекторное влияние которого выражено слабее, но уступает ему по влиянию на показатель клеточной плотности хондроцитов;
- антиэксудативная активность изучаемых препаратов располагается в следующем ряду: диклофенак натрия (54 %) > 1-БИСГ (42,1 %) > ГЭЛРО (35,5 %).

Таким образом, исследуемые субстанции (БИСГ-1 и ГЭЛРО) следует рекомендовать для углубленного доклинического изучения с перспективой создания на их основе препаратов для комплексной терапии воспалительных заболеваний суставов, в частности, артритов.

1. EULAR evidence based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis / W. Zhang, M. Doherty, G. Peat [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2009. – V. 68, № 13. – P. 141.
2. *Fleischman R. M.* Is there a need for new therapies for rheumatoid arthritis / R. M. Fleischman // J. Rheumatol. – 2005. – V. 32, Suppl. 73. – P. 3–7.
3. *Кононенко А. В.* Вивчення протизапальної активності густого екстракту горобини звичайної на моделі ад'ювантного артриту у щурів / А. В. Кононенко, С. М. Дроговоз, К. Г. Щокіна // Вісник фармації. – 2013. – № 1. – С. 70–73.
4. *Зупанець І. А.* Експериментальне вивчення протизапальної активності композиції глюкозаміну гідрохлориду та диклофенаку натрію на моделі карагенінового набряку / Зупанець І. А., Попов С. Б., Отрішко І. А. // Клінічна фармація. – 2002. – Т. 6, № 2. – С. 48–50.
5. *Зупанець І. А.* Фармакологічне дослідження аналгетичної активності препаратів терафлекс і терафлекс аванс / І. А. Зупанець, С. К. Шебеко // Здоровье Украины. – 2008. – С. 70–71.
6. *Тулякова В. О.* Розробка протиартрозних препаратів з хондропротекторною, протизапальною та аналгетичною дією на основі аміноцукору глюкозаміну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра фарм. наук ; В. О. Тулякова. – Харків, 2008. – 36 с.
7. *Keller L.* Glucosamine for arthritis / L. Keller // Adv. Nurse Pract. – 2003. – V. 11, № 6. – P. 19–21.
8. *Ісаєв С. Г.* Синтез і дослідження біологічної активності 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот / С. Г. Ісаєв, О. Л. Чикіна, Г. П. Жегунова // Мед. хімія. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 13–17.
9. *Кононенко А. В.* Листя горобини звичайної – перспективна сировина для отримання препаратів з антиартритною дією / А. В. Кононенко, С. М. Дроговоз, О. В. Криворучко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 2 (33). – С. 51–55.
10. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Sweet Rowanberries / A. T. Hukkanen, S. S. Pölönen, S. O. Kärenlampi, H. I. Kokko // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – V. 54, № 19. – P. 7193–7199.
11. *Olszewska M. A.* Variation in the phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of Sorbus aucuparia leaf extracts during vegetation / M. A. Olszewska // Acta Pol Pharm. – 2011. – V. 68. – P. 937–44.
12. *Дроговоз С. М.* Перспективы создания противовоспалительных средств на основе производных D-(+)-глюкозиламмониевых солей 3-оксамоилзамещенных N-фенилантраниловых кислот и экстракта листьев рябины обыкновенной / С. М. Дроговоз, М. В. Зупанец, А. В. Кононенко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 2 (3). – С. 64–67.
13. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
14. *Кононенко А. В.* Дослідження антиексудативної активності екстракту листя горобини звичайної на моделях зимозанового та карагенінового набряків / А. В. Кононенко, С. М. Дроговоз, К. Г. Щокіна // Український біофармацевтичний журнал. – 2012. – № 3 (20). – С. 39–43.
15. *Меркулов Г. А.* Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Москва : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
16. *Лапач С. М.* Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Exel / С. М. Лапач, А. В. Чубенко, П. М. Бабіч. – Київ : Моріон, 2001. – 408 с.

С. М. Дроговоз, М. В. Зупанец, А. В. Кононенко, Ж. У. Абдурахмонов

Антиартритные препараты природного происхождения – альтернатива НПВС

Основное место среди воспалительных заболеваний принадлежит патологии суставов, при которой наблюдаются все стадии воспаления. В связи с тем, что терапия заболеваний опорно-двигательного аппарата требует длительного применения лекарств, актуальным является создание малотоксичных нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) природного происхождения. Последние являются перспективным источником для создания современных противовоспалительных препаратов, так как обладают меньшей токсичностью и, при этом, выраженным противовоспалительным действием.

Цель исследования – сравнение антиартритной активности двух перспективных субстанций: производного глюкозамина и N-фенилантраниловой кислоты (шифр 1-БИСГ) и густого экстракта листьев рябины обыкновенной (шифр ГЭЛРО) с доказанной противовоспалительной, антиоксидантной, мембраностабилизирующей и репаративной активностями.

Исследование влияния 1-БИСГ и ГЭЛРО на течение коллаген-индуцированного артрита (КИА) проведено на 50 белых крысах обоего пола массой 180–200 г, которые были распределены на 5 опытных групп по 10 животных в каждой. На 28 сутки эксперимента животных подвергали декапитации под эфирным наркозом, ампутированные конечности фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Для объективизации полученных данных производили морфометрические измерения.

После моделирования КИА у животных наблюдали развитие полиартрита, проявлением которого была гиперемия, отек конечностей с увеличением их объема и болезненностью при нажатии. Положительное лечебное влияние исследуемых веществ на течение КИА было подтверждено морфологическими исследованиями.

Результаты проведенных фармакологических и морфологических исследований позволяют сделать следующие выводы, что 1-БИСГ и натрия диклофенак оказывают выраженное нормализующее влияние на патологические изменения в строении суставов крыс с КИА в отличие от ГЭЛРО, хондропротекторное влияние которого выражено слабее. Таким образом, исследуемые субстанции

(БИСГ-1 и ГЭЛРО) следует рекомендовать для углубленного доклинического изучения с перспективой создания на их основе препаратов для комплексной терапии воспалительных заболеваний суставов, в частности, артритов.

Ключевые слова: густой экстракт листьев рябины обыкновенной, глюкозамина гидрохлорид, N-фенилантраниловая кислота, коллаген-индуцированный артрит

С. М. Дроговоз, М. В. Зупанець, А. В. Кононенко, Ж. У. Абдурахмонов

Антиартритні препарати природного походження – альтернатива НПЗЗ

Основне місце серед запальних захворювань належить патології суглобів, при якій спостерігаються всі стадії запалення. У зв'язку з тим, що терапія захворювань опорно-рухового апарату вимагає тривалого застосування ліків, актуальним є створення малотоксичних нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) природного походження. Останні є перспективним джерелом для створення сучасних протизапальних препаратів, тому що мають меншу токсичність і, при цьому, виражену протизапальну дію.

Мета дослідження – порівняння антиартритної активності двох перспективних субстанцій: похідного глюкозаміну та N-фенілантранілової кислоти (шифр 1-БИСГ) і густого екстракту листя горобини звичайної (шифр ГЕЛГЗ) з доведеною протизапальною, антиоксидантною, мембраностабілізуючою і репаративною активностями.

Дослідження впливу 1-БИСГ і ГЕЛГЗ на перебіг колаген-індукованого артриту (КІА) проведено на 50 білих щурах обох статей масою 180–200 г, які були розподілені на 5 дослідних груп по 10 тварин у кожній. На 28 добу експерименту тварин піддавали декапітації під ефірним наркозом, ампутовані кінцівки фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну. Для об'єктивізації отриманих даних проводили морфометричні вимірювання.

Після моделювання КІА у тварин спостерігали розвиток поліартриту, проявом якого була гіперемія, набряк кінцівок зі збільшенням їхнього об'єму й хворобливістю при натисканні. Позитивний лікувальний вплив досліджуваних речовин на перебіг КІА було підтверджено морфологічними дослідженнями.

Результати проведених фармакологічних та морфологічних досліджень дозволяють зробити висновки, що 1-БИСГ і натрію диклофенак проявляють виражений нормалізуючий вплив на патологічні зміни в будові суглобів щурів з КІА на відміну від ГЕЛГЗ, хондропротекторний вплив якого виражений слабше. Таким чином, досліджувані субстанції (БИСГ-1 і ГЕЛГЗ) слід рекомендувати для поглибленого доклінічного вивчення з перспективою створення на їхній основі препаратів для комплексної терапії запальних захворювань суглобів, зокрема, артритів.

Ключові слова: густий екстракт листя горобини звичайної, глюкозаміну гідрохлорид, N-фенілантранілова кислота, колаген-індукований артрит

S. M. Drogovoz, M. V. Zupanets, A. V. Kononenko, J. U. Abduraxmonov

Antiarthritic drugs of natural origin – alternative NSAID

The main place among inflammatory diseases belongs joint pathology in which there are all the stages of inflammation. Because of the long-term treatment of such diseases the creation of low-toxic nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) of natural origin is relevant. The latter are a promising source for the creation of modern anti-inflammatory drugs, because has a lower toxicity and anti-inflammatory effect.

The aim of this work was to compare an antiarthritic activity of two promising substances: salts of glucosamine and N-phenylanthranilic acid (code 1 BISG) and thick leaf extract of mountain ash (code TLEMA), with proven anti-inflammatory, antioxidant, membrane stabilizing and reparative activities.

Investigation of the effect of 1-BISG and TLEMA on the course of collagen-induced arthritis (CIA) was performed on 50 white rats of both sexes weighing 180–200 g, divided into 5 experimental groups of 10 animals each. On the 28 day of the experiment, the animals were decapitated under ether anesthesia, amputated limbs were fixed in 10 % neutral formalin. For objectification of the data was performed morphometric measurements.

After modeling CIA there were observed polyarthritis develop in animals, which manifestated by redness, swelling of extremities with an increase in their volume and tenderness when pressed. Positive therapeutic effect of test substances under CIA was confirmed by morphological studies.

The results of the pharmacological and morphological studies suggest the following conclusions that 1-BISG and diclofenac sodium have expressed a normalizing effect on the pathological changes in the structure of the joints of rats with CIA, unlike TLEMA, chondroprotective effect of which is less pronounced. Thus, the study substances (BISG-1 and TLEMA) should be recommended for in-depth pre-clinical study with a view to create on their basis the drugs for the complex therapy of inflammatory diseases of the joints, such as arthritis.

Key words: thick extract of leaves of mountain ash, glucosamine hydrochloride, N-phenylanthranilic acid, collagen-induced arthritis

Надійшла: 27.03.2015 р.

Контактна особа: Дроговоз Світлана Мефодіївна, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: farmacol@nuph.edu.ua

УДК 616 – 056. 52 – 06: 616 – 008.9 – 053.2

А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, А. І. Шкапо

Модулюючий вплив сибутраміну на зміни метаболізму, зумовлені експериментальною інсулінорезистентністю в щурів

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: інсулінорезистентність, ожиріння, метаболічний синдром, цукровий діабет II типу, ендотеліальна дисфункція, сибутрамін

Відповідно до епідеміологічних досліджень останніх років спостерігається тенденція до неухильного зростання числа хворих на цукровий діабет II типу, метаболічний синдром, ожиріння та інші патології, що відносять до хвороб цивілізації [1–2]. Зазначені захворювання характеризуються високими показниками поширеності в популяції та смертності, що, у першу чергу, зумовлено наявністю факторів розвитку та прогресування кардіоваскулярних ускладнень на їхньому фоні [3–4]. За даними ВООЗ, серцево-судинні захворювання посідають перше місце серед причин смертності населення індустріально розвинених країн [5–7].

В основі патогенезу таких патологій лежить синдром інсулінорезистентності (ІР), що базується на зниженні афінності клітин до дії інсуліну з порушенням вуглеводного та ліпідного видів обміну та негативними змінами практично всіх метаболічних ланок організму [8–10].

Згідно з даними наукової літератури, перспективним напрямом корекції інсулінорезистентності є фармакологічний вплив на ожиріння – один з тригерних факторів ІР [4, 10–11]. Взаємозв'язок ожиріння та ІР залишається не до кінця з'ясованим, проте передбачається, що в разі надлишкової маси тіла порушується співвідношення процесів ліполізу/ліпогенезу та секреція жировою тканиною гормонів, що підвищують чутливість тканин до дії інсуліну (адипокінів – наприклад, адипонектину) [12–14]. Одночасно збільшується продукція факторів, що проявляють протилежну дію – наприклад, резистину, вісфатину та ін. Крім того, жирова тканина продукує хемокіни, що активують макрофаги, які накопичуються в жировій і м'язовій тканинах та негативно впливають на чутливість клітин до інсуліну [10, 14–15]. Таким чином, вплив на ожиріння є невід'ємним компонентом ефективної фармакотерапії захворювань, що асоційовані з синдромом ІР.

На фармацевтичному ринку України представлений лише один препарат, що впливає на центральні механізми формування ожиріння – 1-(4-хлорфеніл)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропіл) циклобутанметанамін (сибутрамін), подвійний механізм дії якого полягає в селективному інгібуванні зворотного захоплення серотоніну та норадреналіну й активуючому впливі на β_3-адренорецептори бурої жирової тканини [16]. Такі особливості фармакодинаміки зумовлюють нормалізацію харчової поведінки та активацію термогенезу, що проявляється корекцією надмірної ваги [17]. Відповідно до даних літератури, тривала (понад 1 рік) терапія сибутраміном супроводжується достовірним зростанням частоти розвитку кардіоваскулярних ускладнень, зокрема, інфаркту міокарда та інсульту [16, 18–19]. Вважається, що причиною цього явища може бути адренергічна активність препарату, проте достовірні механізми залишаються не до кінця з'ясованими. Серед причин розглядають зростання вмісту катехоламінів, проте точні механізми потребують подальшого вивчення.

Мета дослідження – вивчення впливу 1-(4-хлорфеніл)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропіл)циклобутанметанаміну

© Колектив авторів, 2015

(сибутраміну) на показники вуглеводного та ліпідного обміну, антиоксидантно-прооксидантного статусу й ендотеліальної функції за експериментальної інсулінорезистентності в щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wistar, масою 160–200 г. Інсулінорезистентність моделювали шляхом тривалого внутрішньоочеревинного введення низьких доз синтетичного глюкокортикоїду дексаметазону (KRKA, Словенія) протягом 5 тижнів (модифікований метод Severino C. та співавт., 2002 р.) [20]. Тварин розподілили на 3 експериментальні групи (по 10 щурів у кожній), а саме: інтактний контроль (здорові тварини); контрольна патологія – тварини, яким протягом 5 тижнів вводили внутрішньоочеревинно дексаметазон у дозі 1,5 мг/кг; тварини, яким на фоні введення дексаметазону, починаючи з 4 тижня введення дексаметазону, вводили внутрішньошлунково сибутрамін за допомогою металевого зонда в ефективній терапевтичній дозі – 10 мг/кг (з урахуванням індексу видової чутливості) протягом 3 тижнів (2 тижні вводили сибутрамін одночасно з дексаметазоном, 1 тиждень – після припинення ін'єкцій дексаметазону). Лікувальну ефективність сибутраміну оцінювали за наступними показниками: вміст глюкози, імунореактивного інсуліну (ІРІ), вільних жирних кислот (ВЖК), холестеролу (ХС), тріацилгліцеролів (ТАГ), розраховували показник інсулінорезистентності (індекс HOMA-IR). Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом; вміст ВЖК, ХС і ТАГ визначали за допомогою стандартних наборів реактивів фірми «Фелісіт-Діагностика» (Україна) та «Lachema» (Чехія). Рівень ІРІ визначали за допомогою стандартного набору «рио-ИНС-ПГ-125I» (Білорусь) методом радіоімунологічного аналізу *in vitro*. Показник інсулінорезистентності (індекс HOMA-IR) розраховували шляхом визначення співвідношення рівнів глюкози та ІРІ у сироватці крові. Оцінювали вплив препарату на показники антиоксидантно-прооксидантної системи організму, для чого визначали вміст ТБК-реагуючих сполук та відновленого глутатіону (ВГ) у гомогенаті печінки. Уміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) визначали спектрофотометрично за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою, ВГ визначали спектрофотометрично за реакцією з алоксаном [21–22]. У сироватці крові визначали вміст ендотеліну (ЕТ) -1 імуноферментним методом за допомогою набору реактивів (DRG, Німеччина). Уміст стабільних метаболітів NO – S-нітрозотіолів визначали спектрофлюориметричним методом [23].

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoftInc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу для кількох незалежних груп (ANOVA).

Дослідження проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), що узгоджені з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.) та Етичним Кодексом Всесвітньої Медичної асоціації (Гельсінська декларація, 1964 р.).

Результати та їх обговорення. Введення низьких доз дексаметазону протягом 5 тижнів супроводжувалося розвитком метаболічних порушень, що характерні для синдрому ІР (табл. 1). У щурів групи контрольної патології (КП) спостерігалося достовірне зростання рівнів глюкози та ІРІ у сироватці крові в 1,93 та 1,49 разу відповідно порівняно з інтактними тваринами. Індекс HOMA-IR збільшувався в 1,69 разу. На фоні цих змін спостерігали достовірне зростання вмісту ВЖК у 3,19 разу, що було зумовлено інтенсивним вивільненням останніх з жирової тканини внаслідок зменшення інгібуючого впливу інсуліну на ліполіз. Це призводило до надходження значної кількості ВЖК до інсулінзалежних тканин: у першу чергу печінки та м'язів. У печінці ВЖК порушували зв'язування інсуліну з рецепторами гепатоцитів, формуючи інсулінорезистентність останніх. На тлі цього відбувалося активування процесів глюконеоге-

незу, субстратом яких були ВЖК, підвищувалася продукція глюкози печінкою та знижувалася швидкість екскреції інсуліну, що призводило до прогресування гіперглікемії та гіперінсулінемії. У м'язовій тканині відбувалося порушення обміну глюкози (суттєво знижувалася швидкість гліколізу та глікогенезу), поглинання глюкози цією тканиною з крові відбувалося менш інтенсивно, що робило внесок у поглиблення та обтяження гіперглікемії та опосередковано – гіперінсулінемії. У разі ожиріння збільшення вмісту ВЖК у значній мірі чинить негативний вплив на всі метаболічні ланки за рахунок порушення метаболізму жирової тканини, що сприяє розвитку синдрому ІР [11].

Інтенсивне вивільнення ВЖК можна вважати одним із ключових проявів проатерогенних змін, які розвивалися в тварин групи контрольної патології та супроводжувалися порушенням обміну ліпідів і ліпопротеїнів. За умов експериментів спостерігали достовірне, майже дворазове (у 1,89 разу) підвищення вмісту ТАГ у сироватці крові відносно показника інтактних тварин. Така динаміка може розглядатися як один з провідних факторів формування атерогенної дисліпідемії на фоні ІР. За умов зростання концентрації ВЖК та їхнього інтенсивного надходження до печінки з кров'яного русла, останні використовуються для ресинтезу ТАГ, що відбивалося виникненням гіпертріацилгліцеролемії [10]. Як було продемонстровано в ряді досліджень, збільшення показника ТАГ корелює зі зменшенням вмісту ХС у складі ліпопротеїнів високої щільності (ЛВЩ) та накопиченням ліпопротеїнів низької щільності В (ЛНЩВ), які мають високий ступінь атерогенності. Зростання вмісту у клітинах знов синтезованих ТАГ призводить до активної секреції ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛДНЩ). На тлі ІР та внутрішньоклітинного збільшення концентрації ТАГ відбувається активна ліпідація пре-ЛДНЩ за участю фосфоліпази D [15].

У сироватці крові щурів спостерігали зростання вмісту ХС, що було опосередковано патологічними змінами в метаболізмі ліпідів та ліпопротеїнів, які спостерігалися за умов розвитку ІР. Згідно з даними літератури, гіпертріацилгліцеролемія спричиняє порушення зворотного транспорту ХС за допомогою ЛВЩ. Вищезазначені патологічні зміни призводять до формування стану атерогенної дисліпідемії, яку розглядають як ключовий фактор обтяження перебігу ІР та асоційованих з нею захворювань.

Введення досліджуваного препарату – Сибутраміну мало лікувальний вплив за умов експериментальної ІР у щурів. Спостерігали достовірне зниження рівнів глюкози та ІРІ у 1,20 та 1,19 разу відповідно порівняно з тваринами, яким вводили дексаметазон і не лікували (табл. 1). Підтвердженням терапевтичного впливу сибутраміну було зниження у 1,24 разу індексу HOMA-IR відносно показника щурів з ІР. Оскільки препарат усував прояви гіперглікемії та гіперінсулінемії, закономірно знижувався вміст ВЖК (у 1,59 разу порівняно з тваринами групи контроль-

Таблиця 1

Показники вуглеводного та ліпідного обміну в щурів за експериментальної інсулінорезистентності та впливу сибутраміну, M ± m (n = 10)

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сибутрамін
Глюкоза, ммоль/л	5,800 ± 0,440	11,200 ± 0,390*	9,360 ± 0,360**
ІРІ, пмоль/л	92,500 ± 2,305	138,280 ± 2,406*	115,800 ± 3,205**
ХС, ммоль/л	1,150 ± 0,010	1,532 ± 0,064*	1,210 ± 0,020**
ТАГ, ммоль/л	1,950 ± 0,055	3,680 ± 0,146*	2,480 ± 0,037**
ВЖК, ммоль/л	0,450 ± 0,020	1,438 ± 0,023*	0,904 ± 0,120**
Показник ІР (HOMA-IR)	1,78	3,02	2,44

*Примітка. Тут і в табл. 2–3: *Зміни достовірні відносно показників інтактного контролю ($p \le 0,05$), **зміни достовірні відносно показників контрольної патології ($p \le 0,05$).*

ної патології) за рахунок збереження блокуючої дії інсуліну на ліполіз. За таких умов не відбувалося інтенсивної продукції (ресинтезу) ТАГ у печінці, що підтверджувалося достовірним зменшенням цього показнику в 1,48 разу порівняно з тваринами групи контрольної патології. Уміст ХС зменшувався в 1,27 разу, що свідчило про зниження виразності атерогенності за умов моделювання ІР.

Механізм терапевтичного впливу сибутраміну базується на впливі на центральні ланки формування ожиріння [16]. Ожиріння є одним з провідних факторів формування синдрому ІР, оскільки характеризується патологічним дисбалансом процесів ліполізу та ліпогенезу, що тягне за собою низку патологічних змін метаболізму у жировій тканині [9]. Відповідно до даних літератури, сибутрамін знижує продукцію прозапальних цитокінів – фактора некрозу пухлини альфа (ФНП-α), інтерлейкіну 6 (ІЛ-6), резистину, С-реактивного протеїну (СРП), що опосередковується зниженням надмірної ваги і як наслідок – нормалізацією функціональної активності жирової тканини, усунення проявів ліпотоксичності [11]. У той самий час даний препарат підвищує вміст адипонектину, який позитивно впливає на чутливість клітин до дії інсуліну (зростає афінітет) [18]. Сибутрамін усуває гіперлептинемію, що розвивається за умов ожиріння, і робить значний внесок у формування ІР (лептин стимулює секрецію інсуліну за зниженої чутливості клітин до дії останнього) [17]. Таким чином, терапевтична ефективність досліджуваного препарату на моделі ІР у щурів може опосередковуватися за рахунок впливу на центральні механізми формування ожиріння і як наслідок – нормалізуючого впливу на обмін адипокінів, що проявляється позитивною динамікою відповідних показників вуглеводного та ліпідного обміну.

Відомо, що за умов розвитку ІР відбувається дисбаланс антиоксидантно-прооксидантної рівноваги в організмі у бік збільшення продукції прооксидантних факторів на фоні зниження вмісту антиоксидантів [23]. Результатом цього є оксидативні пошкодження ліпопротеїнів на тлі ІР, що є однією з ключових ланок патогенезу атеросклерозу, який розвивається при захворюваннях, асоційованих зі зниженням чутливості клітин до дії інсуліну [4].

За умов введення низьких доз дексаметазону в печінці тварин контрольної групи спостерігали зростання вмісту МДА у 3,7 разу порівняно зі здоровими тваринами, що свідчило про активацію процесів вільнорадикального окиснення (ВРО). При цьому рівень антиоксиданту – відновленого глутатіону зменшувався в 1,67 разу, що може бути пояснено зниженням активності системи антиоксидантного захисту на тлі формування ІР (табл. 2).

Уведення досліджуваного препарату значною мірою попереджало зростання вмісту ТБК-реактантів, який достовірно відрізнявся від аналогічного маркера в тварин групи контрольної патології. Така динаміка можливо опосередкована зниженням надмірної ваги та як наслідок – зменшенням виразності запалення внаслідок пригнічення продукції прозапальних адипокінів, які сприяють інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). При цьому не спостерігали достовірних позитивних змін вмісту ВГ, що може бути пов'язано з відсутністю безпосередньої антиоксидантної активності в сибутраміну (табл. 2).

Така динаміка показників антиоксидантно-прооксидантного статусу свідчить

Таблиця 2

Показники антиоксидантно-прооксидантного статусу в печінці щурів за експериментальної інсулінорезистентності та впливу сибутраміну, M ± m (n = 10)

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сибутрамін
ТБК-АП, мкмоль/г	0,960 ± 0,045	3,564 ± 0,160*	2,220 ± 0,086**
ВГ, мг/г	0,250 ± 0,030	0,150 ± 0,010*	0,160 ± 0,004

про здатність препарату опосередковано попереджати атерогенні зміни, характерні для синдрому ІР, можливо шляхом пригнічення процесів ПОЛ.

Згідно з даними літератури, однією з ключових ланок патогенезу ускладнень серцево-судинних захворювань є формування ендотеліальної дисфункції [6–7, 19]. Саме тому представлялося доцільним оцінити функціональний стан ендотелію шляхом визначення вмісту вазоконстрикторних (ендотелін-1) та вазодилатуючих факторів (стабільних метаболітів NO – S-нітрозотіолів) на тлі інсулінорезистентності та при введенні сибутраміну (табл. 3).

Отримані дані свідчать про достовірне зростання (у 2,5 разу) вмісту ЕТ-1 у сироватці крові щурів групи контрольної патології, у той час як вміст вазодилатуючого фактора – S-NO достовірно знижувався (у 3,2 разу) відносно показників здорових тварин. Розрахунок коефіцієнта ЕТ-1/S-NO у тварин з ІР свідчив про розвиток ендотеліальної дисфункції (ЕД). За умов ІР розвиток ЕД є закономірним і може реалізуватися декількома механізмами. Гіперглікемія та гіперінсулінемія разом з активацією вільнорадикальних процесів впливають на активність NO-синтазної системи, що, зокрема, було показано в попередніх дослідженнях та узгоджується з даними літератури [10, 14, 19]. Крім того, гіперглікемія опосередковує дисбаланс антиоксидантно-прооксидантних факторів у бік зменшення вмісту антиоксидантів, а вільні радикали є додатковими факторами пошкодження ендотелію. Збільшення вмісту ендотеліну також може розглядатися як маркер гіпоксичного стану, що характерний для проатерогенезу. Одними з індукторів синтезу даного цитокіну також є окиснені ЛДНЩ, зростання рівня яких показане за умов наших експериментів. Таким чином, можна відзначити, що викликані зміни є свідченням розвитку ендотеліальної дисфункції за умов інсулінорезистентності.

При введенні досліджуваного препарату – сибутраміну спостерігали подібну, хоча й менше виразну зміну показників ендотеліальної функції (достовірні відмінності як від показників здорових тварин, так і від показників щурів з ІР). Такі зміни можна пояснити, з одного боку, лікувальним впливом препарату на виразність ІР, що підтверджувалося відповідними показниками вуглеводного та ліпідного обміну. Разом з тим, на фоні застосування сибутраміну спостерігали дисбаланс вазоконстрикторних і вазодилатуючих факторів та зміну співвідношення ЕТ-1/S-NO. Останнє, імовірно, зумовлено впливом сибутраміну на активність NO-синтаз (індуцибельної та ендотеліальної), які визначають вміст NO і відповідно – S-NO. Отримані результати свідчать про суттєвий внесок препарату в розвиток ендотеліальної дисфункції, яка є предиктором розвитку кардіоваскулярних ускладнень, і може бути основою для подальших досліджень сибутраміну щодо виявлення його побічних ефектів та протипоказань.

Висновки

1. Тривале протягом 5 тижнів введення низьких доз дексаметазону щурам супроводжувалося патологічними змінами, характерними для синдрому ІР. Відбувалося збільшення в крові щурів рівнів глюкози та ІРІ у 1,93 та 1,49 разу відповідно, індекс HOMA-IR збільшувався в 1,69 разу, у 3,0 разу зроста-

Таблиця 3

Показники ендотеліальної функції в сироватці крові щурів за експериментальної інсулінорезистентності та впливу сибутраміну, M ± m (n = 10)

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сибутрамін
Ендотелін-1, пкг/мл	2,29 ± 0,14	5,91 ± 0,23*	4,82 ± 0,15*/**
S-нітрозотіоли, ммоль/л	0,49 ± 0,03	0,15 ± 0,04*	0,24 ± 0,01*/**
Ендотелін-1/S-нітрозотіоли	4,67 ± 0,13	39,40 ± 1,05*	20,10 ± 0,25*/**

ла концентрація ВЖК, значно збільшувався вміст ТАГ та ХС порівняно з показниками інтактних тварин.

2. Розвиток ІР супроводжувався патологічними змінами в антиоксидантно-прооксидантному статусі організму тварин – відбувалося накопичення продуктів ПОЛ (ТБК-реактантів) на тлі зменшення рівня антиоксиданту – відновленого глутатіону, що свідчить про активацію процесів вільнорадикального окиснення.

3. На тлі ІР виникав дисбаланс вазоконстрикторних та вазодилатуючих факторів – ендотеліну-1 і стабільних метаболітів NO - S-нітрозотіолів, порушувалося їхнє співвідношення, що може вказувати на формування ендотеліальної дисфункції.

4. Внутрішньошлункове введення тваринам з ІР сибутраміну в ефективній терапевтичній дозі значно зменшувало виразність патологічних змін вуглеводного та ліпідного обміну. У крові тварин знижувалися показники глікемії та вмісту ІРІ, індекс HOMA-IR зменшувався в 1,24 разу, нормалізувалися рівні ВЖК, ТАГ, ХС.

5. Під дією сибутраміну відбувалася часткова корекція показників антиоксидантно-прооксидантної рівноваги – достовірно зменшувався рівень ТБК-реактантів, що свідчить про здатність препарату попереджати окисне ушкодження ліпопротеїнів. При цьому не відбувалося зростання рівня ВГ.

6. При введенні сибутраміну порушувалося співвідношення ендотеліну-1 та S-нітрозотіолів у бік збільшення вазоконстрикторних факторів, але ці зміни були менш виразні, ніж у тварин групи контрольної патології. Розвиток дисфункції ендотелію, імовірно, є однією з ланок патогенезу кардіоваскулярних ускладнень у разі тривалого застосування сибутраміну.

7. Враховуючи терапевтичну ефективність сибутраміну на моделі ІР у щурів, перспективне подальше дослідження механізмів лікувального впливу препарату при захворюваннях, що асоційовані з синдромом ІР.

1. *Bloomgarden Z. T.* The 1st world congress on the insulin resistance syndrome / Bloomgarden Z. T. // Diabetes Care. – 2004. – V. 27, № 2. – P. 602–609.
2. *Gallagher E. J.* The metabolic syndrome – from insulin resistance to obesity and diabetes / Gallagher E. J., LeRoith D., Karnieli E. // Medical Clinics of North America. – 2011. – V. 95, № 5. – P. 855–873.
3. A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance / Goldfine A. B.[et al.] // Diabetologia. – 2013. – V. 56, № 4. – P. 714–723.
4. *Rains J. L.* Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes / Rains J. L., Jain S. K. // Free Radical Biology and Medicine. – 2011. – V. 50, № 5. – P. 567–575.
5. Reaven G. M. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease / Reaven G. M. // Medical Clinics of North America. – 2011. – V. 95, № 5. – P. 875–892.
6. The role of insulin resistance in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease: an updated review / Reddy K. J. [et al.] // Journal of Cardiovascular Medicine. – 2010. – V. 11, № 9. – P. 633–647.
7. Relationships among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardiometabolic risk / Salazar M. R. [et al.] // Diabetes and Vascular Disease Research. – 2011. – V. 8, № 2. – P. 109–116.
8. *Henriksen E. J.* Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes / Henriksen E. J., Diamond-Stanic M. K., Marchionne E. M. // Free Radical Biology and Medicine. – 2011. – V. 51, № 5. – P. 993–999.
9. *Karpe F.* Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation / Karpe F., Dickmann J. R., Frayn K. N. // Diabetes. – 2011. – V. 60, № 10. – P. 2441–2449.
10. *Romeo G. R.* Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation–mechanisms and therapeutic targets / Romeo G. R., Lee J., Shoelson S. E. // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2012. – V. 32, № 8. – P. 1771–1776.
11. *Ивашкин В. Т.* Липотоксичность и метаболические нарушения при ожирении / Ивашкин В. Т., Маевская М. В. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 4–13.
12. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond / Lu J. Y. [et al.] // Journal of biomedical science. – 2008. – V. 15, № 5. – P. 565–576.
13. *Ziemke F.* Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research / Ziemke F., Mantzoros C. S. // The American journal of clinical nutrition. – 2010. – V. 91, № 1. – P. 258S–261S.
14. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta analysis and systemic review / Chang Y. H. [et al.] // Diabetes/metabolism research and reviews. – 2011. – V. 27, № 6. – P. 515–527.

15. Зміни метаболізму ліпідів у печінці сирійських хом'ячків з експериментальним метаболічним синдромом / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко, Н. С. Красова // Мед. Хімія. – 2005. – Т. 3, № 7. – С. 11–16.
16. A review of the metabolic effects of sibutramine / Filippatos T. D.[et al.] // Current Medical Research and Opinion®. – 2005. – V. 21, № 3. – P. 457–466.
17. Sibutramine and L-carnitine compared to sibutramine alone on insulin resistance in diabetic patients / Derosa G. [et al.] // Internal Medicine. – 2010. – V. 49, № 16. – P. 1717–1725.
18. Sibutramine improves insulin sensitivity without alteration of serum adiponectin in obese subjects with Type 2 diabetes / Hung Y. J. [et al.] // Diabetic Medicine. – 2005. – V. 22, № 8. – P. 1024–1030.
19. *Загайко А. Л.* Вплив 1-(4-Хлорфеніл)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропіл)циклобутанметанаміну (сибутраміну) на формування ендотеліальної дисфункції у щурів за експериментальної інсулінорезистентності / Загайко А. Л., Брюханова Т. О., Шкапо А. І. // Укр. біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 3.
20. Інформаційний лист «Модифікація методу моделювання експериментальної інсулінорезистентності у щурів» // А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, А. І. Шкапо. – № 86. – Київ, 2015. – 7 с.
21. *Стальная И. Д.* Метод определения ТБК-АП с помощью тиобарбитуровой кислоты / Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биологии: под ред. В. Н. Ореховича. – Москва : Медицина, 1977. – С. 66–68.
22. *Путилина Ф. Е.* Определение содержания восстановленного глутатиона / Путилина Ф. Е. // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): под. ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 183–185.
23. *Ковалева О. М.* Диагностика эндотелиальной функции – оценка вазоактивного пула оксида азота / О. М. Ковалева, Т. В. Горбач, Г. В. Демиденко. – Київ, 2009. – 19 с.

А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, А. І. Шкапо

Модулюючий вплив сибутраміну на зміни метаболізму, зумовлені експериментальною інсулінорезистентністю в щурів

Епідеміологічні дані свідчать про неухильні темпи поширення патологій, в основі патогенезу яких лежить синдром інсулінорезистентності (ІР). У зв'язку з цим актуальним є пошук нових ефективних методів лікування захворювань, асоційованих з ІР.

Мета дослідження – вивчення впливу 1-(4-хлорфеніл)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропіл)циклобутанметанаміну (сибутраміну) на показники вуглеводного та ліпідного обміну, антиоксидантно-прооксидантного статусу, ендотеліальної функції за експериментальної інсулінорезистентності в щурів.

ІР у щурів моделювали тривалим введенням низьких доз дексаметазону, що супроводжувалося патологічними змінами, характерними для цього синдрому – збільшенням рівнів глюкози та ІРІ, зростанням індексу HOMA-IR у 1,69 разу, 3-разовим зростанням концентрації ВЖК, значним збільшенням вмісту ТАГ та ХС у крові тварин. Розвиток модельної патології супроводжувався активацією процесів вільнорадикального окиснення, що підтверджувалося зростанням концентрації продуктів ПОЛ – ТБК-реактантів та одночасним зниженням вмісту антиоксиданту – відновленого глутатіону. У тварин з ІР відбувалося формування ендотеліальної дисфункції, що відбивалося достовірним зростанням вмісту ендотеліну-1 на фоні зниження вмісту S-нітрозотіолів у 3,2 разу, зміною їхнього співвідношення в бік збільшення вазоконстрикторних факторів.

Введення досліджуваного препарату – сибутраміну тваринам з ІР призводило до нормалізації показників вуглеводного та ліпідного обміну, зменшення вмісту ТБК-реактантів, що свідчить про здатність препарата пригнічувати інтенсивність процесів ПОЛ.

На фоні застосування сибутраміну порушувалося співвідношення між рівнями ендотеліну-1 та стабільних метаболітів NO у бік ендотеліну-1. Слід зазначити, що ці зміни були менш виражені, ніж у тварин групи контрольної патології, але й достовірно відрізнялися від показників здорових тварин, що може розглядатися як компонент патогенезу кардіоваскулярних ускладнень при лікуванні сибутраміном.

Ключові слова: інсулінорезистентність, ожиріння, метаболічний синдром, цукровий діабет 2 типу, ендотеліальна дисфункція, сибутрамін

А. Л. Загайко, Т. А. Брюханова, А. И. Шкапо

Модулирующее влияние сибутрамина на изменения метаболизма, обусловленные экспериментальной инсулинорезистентностью у крыс

Эпидемиологические данные свидетельствуют о высоких темпах распространения патологий, в основе патогенеза которых лежит синдром инсулинорезистентности (ИР). В связи с этим актуален поиск новых эффективных методов лечения заболеваний, ассоциированных с состоянием ИР.

Цель исследования – изучить влияние 1-(4-хлорфенил)-N,N-диметил-альфа-(2-метилпропил) циклобутанметанамина (сибутрамина) на показатели углеводного и липидного обмена, антиоксидантно-прооксидантного равновесия, эндотелиальной функции при экспериментальной инсулинорезистентности у крыс.

ИР моделировали на крысах путем длительного введения низких доз дексаметазона, что сопровождалось патологическими изменениями, характерными для этого синдрома, – увеличением уровней глюкозы и ИРИ, ростом индекса HOMA-IR в 1,69 раз, 3-кратным увеличением концентрации СЖК, значительным увеличением содержания ТАГ и ХС в крови животных. Развитие модельной патологии сопровождалось активацией процессов свободнорадикального окисления, что подтверждалось увеличением содержания продуктов ПОЛ – ТБК-реактантов при одновременном снижении содержания антиоксиданта – восстановленного глутатиона. У животных с ИР происходило формирование эндотелиальной дисфункции, что проявлялось достоверным увеличением содержания эндотелина-1 на фоне снижения содержания S-нитрозотиазолов в 3,2 раза, изменением их соотношения с преобладанием вазоконстрикторных факторов.

Введение исследуемого препарата – сибутрамина животным с ИР в значительной степени нормализовало показатели углеводного и липидного обмена, приводило к снижению содержания ТБК-реактантов, что свидетельствует о способности препарата уменьшать интенсивность процессов ПОЛ.

На фоне применения сибутрамина нарушалось соотношение между уровнем эндотелина-1 и стабильных метаболитов NO с преобладанием эндотелина-1. Следует отметить, что эти изменения были менее выражены, чем у животных группы контрольной патологии, но при этом достоверно отличались от показателей здоровых животных, что может рассматриваться как компонент патогенеза кардиоваскулярных осложнений при лечении сибутрамином.

Ключевые слова: инсулинорезистентность, ожирение, метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, эндотелиальная дисфункция, сибутрамин

A. L. Zagayko, T. O. Briukhanova, A. I. Shkapo

Sibutramine modulating effects on metabolic changes associated with experimental insulin resistance in rats

Epidemiological data indicate high rates of diseases which pathogenesis based on insulin resistance syndrome (IR). These trends require new effective methods of correction of the diseases that are associated with the state of IR.

The purpose of this work was to study effects of the 1-(4-chlorophenyl)-N,N-dimethyl-α-(2-methylpropyl)cyclobutylmethanamine (sibutramine) on carbohydrate and lipid metabolism, markers of antioxidant-prooxidant balance, and endothelial function in rats with experimental insulin resistance.

Therapeutic effects of sibutramine on selected indicators of carbohydrate and lipid metabolism in serum and markers of prooxidant-antioxidant status in liver homogenate were studied on the rats with experimental IR. IR was modeled by prolonged administration of dexamethasone low doses.

Prolonged administration of low-dose dexamethasone was accompanied by a number of pathological changes typical for IR syndrome. Hyperglycemia and hyperinsulinemia mediated 3-fold increase of FFA concentrations, causing increase of TAG and cholesterol content. The development of the model pathology was accompanied by activation of free radical oxidation, which was confirmed by the increase of lipid peroxidation (LPO) marker – TBA-RP while decrease the content of reduced glutathione. In animals with IR the formation of endothelial dysfunction was detected as a reliable increase in the content of endothelin-1 on the background of reducing in the content of S-NO (3.2 times), as well as changes in their ratio towards vasoconstrictor factors prevalence.

Administration of sibutramine normalized pathological changes in carbohydrate and lipid metabolism, the contents of FFA, TAG and cholesterol were decreased. Inhibitory effect of the drug on the content of TBA-RP suggested the ability of sibutramine to prevent excessive lipid peroxidation processes. On the background of sibutramine administration a shift of endothelin-1 and the NO stable metabolites ratio towards endothelin-1 was observed.

Key words: insulin resistance, obesity, metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2, endothelial function, sibutramine

Надійшла: 26.03.2015 р.

Контактна особа: Брюханова Тетяна Олександрівна, аспірант, кафедра біохімії, Національний фармацевтичний університет. Тел. + 38 050 211 21 11.
Електронна пошта: tatyana_bruhanova@mail.ru

УДК 615.322; 615.076.7

О. В. Кузнєцова[1], Г. Й. Лавренчук[2], В. Є. Буцька[3] , І. В. Сімонова[1]

Фармакобіологічні властивості екстракту шроту темних сортів винограду

[1]ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ
[2]ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», м. Київ
[3]Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ

Ключові слова: екстракт шроту темних сортів винограду, диференціація, міобласти, міосимпласти, іонізуюче випромінювання

В Україні зберігається тенденція щодо підвищення потреби фармацевтичного ринку в доступних, безпечних та ефективних фітопрепаратах для лікуванні різних захворювань. Необхідність оновлення асортименту вітчизняних фітопрепаратів не викликає сумнівів [1].

Пошук нової рослинної сировини та створення ефективних фітопрепаратів досі є актуальним.

Сучасний аспект щодо асортименту природної сировини зумовлений високою фармакологічною активністю та вираженими клінічними ефектами, серед яких значне місце займає екстракт винограду. Як відомо, основним фармакологічним ефектом екстракту червоного винограду (листя, кісточок, гребені, жому) є зміцнення судинних стінок вен і капілярів (Р-вітамінна активність). Він має адаптогенну, загальнозміцнюючу та антиоксидантну дію, що пов'язано, насамперед, з присутністю флавоноїдів [2–4]. Наразі поліфенольний комплекс, що міститься в екстракті шроту винограду, також має важливе терапевтичне значення і має високу антиоксидантну активність [5], яка за силою перевищує аскорбінову кислоту в 20 разів і α-токоферол в 50 разів, завдяки чому ці сполуки названі найважливішими біологічно активними добавками десятиліття [6].

Дослідження фенольних сполук у комплексі біополімерів показало, що до їхнього складу входять, в основному, полімерні форми фенольних сполук катехінової природи у відновленій формі. Особливе значення в складі комплексу біополімерів мають полісахариди, що представлені як нейтральні полісахариди з пектином, причому кількість останнього становить близько 20 % від загальної концентрації комплексно пов'язаних полісахаридів [7].

З біологічної точки зору полісахариди відіграють важливу роль у структурі зовнішніх мембран деяких клітин, беруть участь в утворенні клітинних оболонок бактерій багатьох видів. У мембранах полісахариди знаходяться в комплексах з білками та ліпідами, незмінно присутніми в зовнішніх і внутрішніх мембранах [8].

Отже, екстракт шроту темних сортів винограду (поліфенольно-пектиновий комплекс (ППК) широко вивчений за хімічним складом, фізико-хімічними показниками та деякими фармакологічними діями. Однак вплив екстракту шроту темних сортів винограду на біологічні ефекти в клітинах *in vitro* практично не вивчений.

Мета дослідження – вивчити морфофункціональний стан і диференціацію ембріональних міогенних клітин *in vitro* за дії екстракту шроту темних сортів винограду в нормі та за умов впливу іонізуючого випромінювання в дозі 10,0 Гр.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження виконані на первинній культурі ембріональних міогенних клітин, отриманих із м'язових тканин новонароджених щурів, які спочатку в асептичних умовах механічно подрібнювали, потім піддавали дезагрегації 0,25 % розчином трипсину. Отриману суспензію клітин двічі відмивали від розчину трипсину шляхом

© Колектив авторів, 2015

центрифугування при 1000 об/хв. Супернатант зливали, а осад диспергували в поживному середовищі RPMI-1640 такого складу: 4 ммоль/л L-глютаміну, 20 % ембріональної сироватки теляти, 8 мкг/мл гентаміцину згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [9]. Процедуру повторювали 5–6 разів для того, щоб набрати необхідну кількість клітин ($5 \cdot 10^4$ клітин/мл середовища). Клітини вирощували за постійної температури 37 °С на покривних скельцях розмірами (16 × 8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару (1–6 діб). Кожні 24 год готували морфологічні препарати за загальноприйнятою методикою (по 4 препарати на 1 точку): фіксували 70 °С етанолом та фарбували гематоксиліном та еозином.

Через 24 год після експлантації до культур клітин додавали екстракт шроту темних сортів винограду, отриманий за запатентованою технологією (патент С07В63/00) у дозі 0,01 мкл/мл та культивували впродовж 6 діб.

Опромінення культур клітин здійснювали на апараті «Тератрон» (Росія) (джерело – 60 Со з енергією γ-квантів 1,2 МеВ, потужність експозиційної дози – $4{,}3 \cdot 10^{-4}$ Кл/(кг·с), відстань до об'єкта – 80 см, доза опромінення – 10,0 Гр) через 24 год після посадки.

Диференціацію міогенних клітин оцінювали в різні терміни культивування під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні в 1000 разів методом випадкових полів за С. Б. Стефановим, вивчаючи наступні показники: загальну кількість клітин, кількість мітозів, кількість малодиференційованих міобластів, кількість високодиференційованих багатоядерних міосимпластів, які утворюються шляхом злиття міобластів, кількість ядер у міосимпластах. Фотографії отримані за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320 (USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

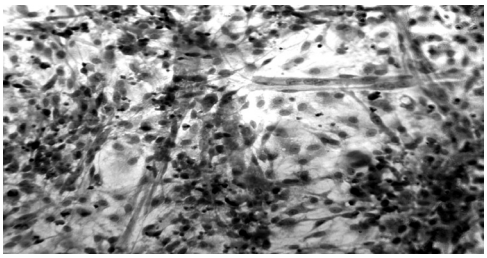


Рис. 1. Диференціація міогенних клітин новонароджених щурів у первинній культурі на 5 добу культивування. Міобласти веретеноподібної форми з видовженим ядром об'єднуються в стрічкоподібні багатоядерні структури – міосимпласти. Фібробластоподібні клітини полігональної форми з округлим ядром. Гематоксилін та еозин, × 400.

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою t-критерію Стьюдента, використовуючи неліцензовані комп'ютерні програми Microsoft Excel та Biostat з попередньою перевіркою гіпотези щодо нормального закону розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова – Смірнова.

При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 185 препаратів культур клітин.

Результати та їх обговорення. Диференціація міогенних клітин *in vitro* характеризується злиттям малодиференційованих одноядерних веретеноподібних клітин з утворенням багатоядерних високодиференційованих міосимпластів, які інколи набувають гілкоподібної форми (рис. 1).

В інтактних культурах клітин (рис. 2) на 2 добу культивування відмітили інтенсивний поділ клітин, що призвів до значного збільшення загальної кількості фібробластоподібних клітин та міобластів. Починаючи з 3 доби міобласти об'єднувалися й утворювали стрічкоподібні багатоядерні структури, розміри та кількість яких зростали в період з 5 до 6 доби. На 6 добу на препаратах спостерігали розгалужені міосимпласти з великою кількістю ядер. Водночас загальна кількість клітин зменшувалася за рахунок злиття майже всіх міобластів у міосимпласти. Мітотична активність у ці терміни теж суттєво зменшувалася.

У разі інкубації клітин з екстрактом шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкл/мл (рис. 3) кінетика диференціації міогенних клітин змінювалася: загальна кількість клітин лінійно зрос-

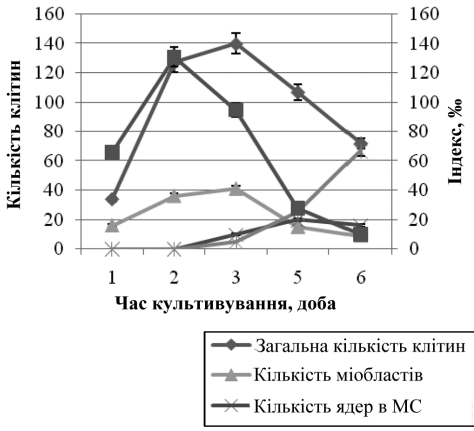


Рис. 2. Кінетика диференціації ембріональних міогенних клітин щурів in vitro в контролі

Рис. 3. Кінетика диференціації ембріональних міогенних клітин щурів in vitro в разі інкубації з екстрактом шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкл/мл

*Примітка. Тут і на рис. 5: *відмінності достовірні порівняно з контролем, $p < 0,05$.*

тала з 1 до 6 доби. Збільшення кількості клітин у термінальній стадії культивування вказує на інтенсифікацію поділу фібробластоподібних клітин, оскільки кількість міобластів у ці терміни зменшувалася. Максимум мітотичної активності клітин припадав на 3 добу культивування з подальшим зменшенням.

Об'єднання міобластів у міосимпласти відбувалося інтенсивніше, ніж у контролі, й їхня кількість на 6 добу культивування була на 30 % більшою порівняно з контролем. Удвічі зростала й кількість ядер в міосимпластах.

На рисунку 4 помітне суттєве збільшення щільності клітинної популяції, кількості міосимпластів та числа ядер у міосимпластах.

Аналіз стану диференціації міогенних клітин щурів на 6 добу культивування (рис. 5) показав, що в разі інкубації з ППК відбувається не тільки активізація процесу диференціації міогенних клітин, а й інтенсифікація проліферації та мітотичної активності фібробластоподібних клітин, що знаходилися в первинній культурі, порівняно з інтактною культурою клітин.

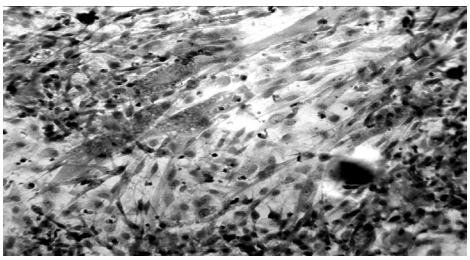


Рис. 4. Диференціація міогенних клітин новонароджених щурів у первинній культурі в разі інкубації з екстрактом шроту темних сортів винограду на 5 добу культивування. Міобласти веретеноподібної форми з видовженим ядром об'єднуються в стрічкоподібні багатоядерні структури – міосимпласти. Фібробластоподібні клітини полігональної форми з округлим ядром. Гематоксилін та еозин, × 400.

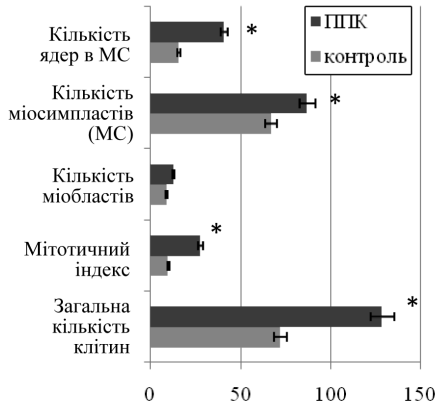


Рис. 5. Диференціація ембріональних міогенних клітин щурів in vitro на 6 добу культивування в контролі та в разі інкубації з екстрактом шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкл/мл

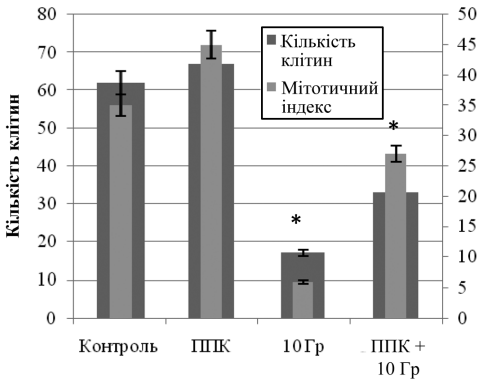


Рис. 6. Щільність клітинної популяції та мітотичний індекс ембріональних клітин щурів in vitro на 6 добу культивування в контролі, у разі інкубації з екстрактом шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкл/мл, за опромінення в дозі 10,0 Гр та за поєднаної дії іонізуючої радіації й екстракту шроту темних сортів винограду

*Примітка. *Відмінності достовірні порівняно з контролем та за дії екстракту шроту темних сортів винограду, $p < 0,05$.*

Кількість міосимпластів за дії екстракту шроту темних сортів винограду збільшилася на 30 % порівняно з контролем, а кількість ядер у міосимпластах зросла в 2,6 разу порівняно з контролем. Водночас загальна кількість клітин збільшилася в 1,8 разу, мітотична активність – у 2,8 разу порівняно з контролем.

Загальновідомо, що іонізуюче випромінювання викликає утворення вільних радикалів. Водночас екстракт шроту темних сортів винограду має високу антиоксидантну властивість. Експериментальне дослідження ефективності ППК за дії іонізуючої радіації в дозі 10,0 Гр, яка має тільки 30 % виживання клітин (за 100 % виживання в контролі), показало (рис. 6), що інкубація опромінених клітин з екстрактом шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкг/мл статистично достовірно ($p < 0,05$) підвищила щільність клітинної популяції в 1,8 разу, а мітотична активність зросла в 5,4 разу. Ці дані підтверджують антиоксидантну здатність екстракту шроту темних сортів винограду та можуть вказувати на їхні радіомодифікуючі властивості.

Висновки

1. За результатами експериментальних досліджень встановлено модифікуючий вплив екстракту шроту темних сортів винограду на морфофункціональні характеристики ембріональних клітин *in vitro*, що проявляється в активізації їхньої мітотичної та функціональної активності.

2. Аналіз стану диференціації міогенних клітин щурів на 6 добу культивування показав, що за інкубації з екстрактом шроту темних сортів винограду відбувається не тільки активізація процесу диференціації міогенних клітин, а й інтенсифікація проліферації та мітотичної активності фібробластоподібних клітин, що знаходилися в первинній культурі, порівняно з інтактними клітинами.

3. Вивчення ефективності екстракту шроту темних сортів винограду за дії іонізуючої радіації в сублетальній дозі 10,0 Гр підтвердило антиокси-

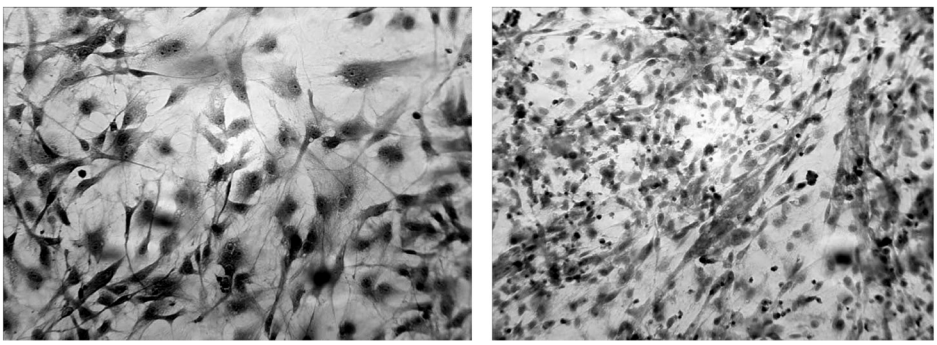


Рис. 7. Диференціація міогенних клітин новонароджених щурів у первинній культурі: А – при опроміненні в дозі 10 Гр, Б – при поєднанні опромінення в дозі 10,0 Гр та дії екстракту шроту темних сортів винограду на 6 добу культивування. Гематоксилін та еозин, × 400.

дантну здатність ППК, що може вказувати на його радіомодифікуючі властивості.

4. Проведене дослідження з вивчення впливу екстракту шпроту темних сортів винограду на клітини *in vitro*, зокрема, на процеси диференціації міогенних клітин, надає широкий спектр можливих застосувань даного екстракту в лікарських препаратах різного напряму терапевтичної дії. Можливе використання його як для перорального, так і для зовнішнього застосування в складі препаратів з ранозагоювальною, протизапальною, регенеруючою, імунностимулюючою дією.

1. Довідник лікарських засобів, випуск восьмий (Державний експертний центр МОЗ України) / Електронна версія. – К., 2014. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://mozdocs.kiev.ua
2. *Макарова М. Н.* Антиоксидантная активность флавоноидов, их олигокомпонентных комбинаций и полифенолсодержащих препаратов в эксперименте: дисс. / М. Н. Макарова. – Санкт-Петербург, 2002. – 173 с.
3. *Соколов С. Я.* Фитотерапия и фитофармакология / С. Я. Соколов. – Москва, 2000. – 186 с.
4. Flavonoids a review of problem mechanisms of action and potential applications / R. Nijveldt, E. Nood, D. Hoorn, [et al.] // American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – V. 74. – P. 418–425.
5. *Кузнєцова В. Ю.* Поліфенольні сполуки винограду культурного / В. Ю. Кузнєцова, В. С. Кисличенко // Медична хімія. – 2004. – № 1. – С. 54–63.
6. Quantitative and qualitative analysis for cluster proanthocyanidins of four grape varieties issuing from Morocco / M. Hmamouchi [et al.] // Bull. O.I.V. – 1994. – V. 67, № 765/766. – P. 901–915.
7. *Ежов В. Н.* Совершенствование биотехнологических процессов переработки винограда на основе анализа превращений биополимеров / В. Н. Ежов. – Ялта, 1987. – 341 с.
8. *Волькенштейн М. В.* Молекулярная биофизика (Серия: Физика жизненных процессов) / М. В. Волькенштейн. – Москва,1975. – 616 с.
9. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / [ред. проф. Л. П. Дьяконова]. – Москва : Спутник+, 2009. – 656 с.

О. В. Кузнєцова, Г. Й. Лавренчук, В. Є. Буцька, І. В. Сімонова

Фармакобіологічні властивості екстракту шроту темних сортів винограду

Вивчення морфофункціонального стану та диференціації ембріональних міогенних клітин *in vitro* за дії екстракту шроту темнів сортів винограду (поліфенольно-пектиновий комплекс) надає можливість розширити асортимент інгредієнтів для нових лікарських форм.

Мета дослідження – вивчити морфофункціональний стан і диференціацію ембріональних міогенних клітин *in vitro* за дії екстракту шроту темних сортів винограду в нормі та за умов впливу іонізуючого випромінювання в дозі 10,0 Гр.

В експериментальних дослідженнях на тест-системі культури ембріональних міогенних клітин встановлено, що екстракт підвищує мітотичну та проліферативну активність клітин і стимулює диференціацію міогенних клітин: об'єднання міобластів у багатоядерні міосимпласти, які відіграють значну роль у патогенезі регенерації та запалення. Антиоксидантні властивості екстракту шроту темних сортів винограду в дозі 0,01 мкг/мл підтверджуються при опроміненні клітин іонізуючим випромінюванням у дозі 10,0 Гр. Тобто, інкубація опромінених клітин з екстрактом шроту темних сортів винограду підвищила щільність клітинної популяції в 1,8 разу, а мітотична активність зросла в 5,4 разу порівняно з опроміненими клітинами. Отримані дані з вивчення впливу екстракту шпроту темнів сортів винограду на клітини *in vitro*, зокрема, на процеси диференціації міогенних клітин, надають широкий спектр можливих застосувань даного екстракту в лікарських препаратах різного напряму терапевтичної дії.

Ключові слова: екстракт шроту темних сортів винограду, диференціація, міобласти, міосимпласти, іонізуюче випромінювання

Е. В. Кузнецова, Г. И. Лавренчук, В. Е. Буцкая, И. В. Симонова

Фармакобиологические свойства экстракта шрота темных сортов винограда

Изучение морфофункционального состояния и дифференциации эмбриональных миогенных клеток *in vitro* при воздействии экстракта шрота темных сортов винограда (полифенольно-пектиновый комплекс) позволяет расширить ассортимент ингредиентов для новых лекарственных форм.

Цель исследования – изучить морфофункциональное состояние и дифференциацию эмбриональных миогенных клеток *in vitro* при воздействии экстракта шрота темных сортов винограда в норме и в условиях воздействия ионизирующего излучения в дозе 10,0 Гр.

В экспериментальных исследованиях на тест-системе культуры эмбриональных миогенных клеток установлено, что экстракт повышает митотическую и пролиферативную активность клеток и стимулирует дифференциацию миогенных клеток: объединение миобластов в многоядерные мио-

симпласты, которые играют значительную роль в патогенезе регенерации и воспаления. Антиоксидантные свойства экстракта шрота темных сортов винограда в дозе 0,01 мкг/мл подтверждаются при облучении клеток ионизирующим излучением в дозе 10,0 Гр. То есть, инкубация облученных клеток с экстрактом шрота темных сортов винограда повысила плотность клеточной популяции в 1,8 раза, а митотическая активность выросла в 5,4 раза по сравнению с популяцией облученных клеток. Полученные данные по изучению влияния экстракта шрота темных сортов винограда на клетки *in vitro*, в частности, на процессы дифференциации миогенных клеток, предоставляют широкий спектр возможного применения данного экстракта в лекарственных препаратах различного направления терапевтического действия.

Ключевые слова: экстракт шрота темных сортов винограда, дифференциация, миобласты, миосимпласты, ионизирующее излучение

E. V. Kuznietsova, G. J. Lavrenchuk, V. E. Butska, I. V. Simonova

Pharmacobiological characteristics extract of the bagasse from dark grape varieties

This study of the morphofunctional status and differentiation of embryonic myogenic cells *in vitro* under treatment with extract bagasse of dark varieties grapes (polyphenolic-pectin complex) allows to expand assortment for ingredients for new dosage forms.

Objective – to investigate the morphofunctional status and differentiation of embryonic myogenic cells *in vitro* under influence of extract bagasse of dark grapes varieties (polyphenolic-pectin complex) and in conditions of exposure to ionizing radiation at a dose of 10,0 Gy.

In experimental studies on the test-system of embryonic myogenic cells culture was found that the extract increases the mitotic and proliferative activity of the cells and stimulates differentiation of myogenic cells: association of myoblasts into polynuclear myosymplast which play a significant role in the pathogenesis of inflammation and regeneration. The antioxidant properties of the extract bagasse of dark grapes varieties in a concentration of 0,01 mg/ml has been confirmed following ionizing radiation in a dose of 10,0 Gy. Thus incubation of irradiated cells with an extract bagasse of dark grapes varieties increased the density of the cell population in 1,8 times, and mitotic activity grew up in 5,4 times compared to the irradiated cells. The data obtained indicate a positive effect of the extract bagasse of dark grapes varieties on cells *in vitro*, in particular to the processes of differentiation of myogenic cells, provides a wide range of possible applications of the extract in different areas of drug discovery with potential therapeutic action.

Key words: extract of the bagasse from dark grapes varieties, differentiation, myoblasts, myosymplast, ionizing radiation

Надійшла: 03. 04.2015 р.

Контактна особа: Кузнєцова О. В., молодший науковий співробітник, відділ фармакокінетики, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел. : + 38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: Elena_ruz@i.ua

УДК 661.718:57.043:577.121.7

В. Д. Лук'янчук[1], К. О. Шебалдова[2]

Аденілнуклеотидний компонент механізму протигіпоксичної дії нової координаційної сполуки германію ВІТАГЕРМ-3 на моделі гіпоксії замкнутого простору

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

Ключові слова: ВІТАГЕРМ-3, гіпоксія замкнутого простору, протигіпоксична дія, енергетичний обмін

Достеменне з'ясування фармакодинамічних ефектів, механізму дії майбутнього лікарського засобу на доклінічному етапі його вивчення є експериментальним обґрунтуванням раціональної та безпечної фармакотерапії будь-якого захворювання чи невідкладного стану, зокрема, гіпоксії замкнутого простору (ГЗП).

Натепер є вже майже аксіомою той факт, що дефіцит у повітрі, що вдихають, кисню, який є акцептором електронів у мітохондріальному електрон-транспортному ланцюзі, викликає суттєве пригнічення біоенергетичних функцій мітохондрій, що призводить до порушення плину численних енергозалежних процесів, а виснаження енергоресурсів клітини нижче допустимого рівня – до загибелі організму. Це диктує нагальну потребу призначення при гострих киснедефіцитних станах лікарських засобів, здатних реалізувати протигіпоксичний ефект, центральною ланкою механізму дії яких є саме енерготропна складова.

Попередньо було доведено високу антигіпоксичну активність вперше синтезованої комплексної координаційної сполуки германію з діетилентріамінпентаоцтовою кислотою та калієм (ВІТАГЕРМ-3) [1].

Енергетичний стан клітини віддзеркалюється співвідношенням діючих мас АТФ/АДФ, яке за своєю суттю є поточним балансом між витратою енергії на підтримку життєдіяльності та функцій організму й продукцією АТФ в ході субстратного (гліколітичного) та окисного фосфорилювання. *Мета дослідження* – вивчити вплив ВІТАГЕРМ-3 на динаміку вмісту аденілових нуклеотидів та фосфору неорганічного (Фн) у тварин у ранньому періоді реоксигенації після перенесеної ГЗП.

Матеріали та методи. Досліди виконано на 48 нелінійних білих щурах обох статей масою 170–200 г з дозволу комісії з біоетики ДЗ «Луганський державний медичний університет». Експериментальною моделлю був патологічний процес, що розвивався у тварин за умов замкнутого простору. ГЗП відтворювали розміщенням тварин упродовж 30 хв в ізольовані скляні гермооб'єми (10 дм^3), які перевертали догори дном і опускали в піднос з водою для попереджання потрапляння повітря в зону дихання щурів. ВІТАГЕРМ-3 вводили щурам внутрішньоочеревинно в раніше розробленому експериментально-математичним шляхом дозовому режимі: 48,7 мг/кг (1 % розчин) за 36 хв до початку моделювання ГЗП [2]. Тварин було розподілено на 4 групи (по 6 щурів у кожній): інтактну, контрольну (ГЗП), дослідну (ГЗП + ВІТАГЕРМ-3) та референтну (ГЗП + мексидол). Мексидол як препарат порівняння вводили аналогічно в дозі 100 мг/кг [3, 4]. Тварини контрольної групи отримували 0,9 % розчин NaCl у такому самому об'ємі, як і ВІТАГЕРМ-3. З'ясування енерготропних механізмів протигіпоксичної дії ВІТАГЕРМ-3 проводили шляхом визначення концентрацій аденілових нуклеотидів (АМФ-АДФ-АТФ) у крові щурів методом тонкошарової хроматографії на пластинах «Sorbfil» [5], а

© Колектив авторів, 2015

вміст фосфору неорганічного визначали в сироватці крові спектрофотометрично за допомогою набору виробництва «Філісіт Діагностика» (Україна).

Дослідження виконано в динаміці через 1 та 6 год після початку реоксигенації. Отримані в експерименті дані обробляли на персональному комп'ютері з використанням стандартного пакета програм Mathematica V.5.0 та Statistica V.10.0 за допомогою теста t-Стьюдента (нормальність розподілу перевіряли тестом Левена) [6].

Результати та їх обговорення. Отримані в експерименті дані наведено на рисунку та в таблиці.

Проведеним дослідженням встановлено, що ГЗП призводить до суттєвих змін пулу аденілових нуклеотидів уже в ранньому постгіпоксичному періоді. Як видно з рисунка, у щурів контрольної групи вже на 1 год дослідження рівень АТФ на 30 % нижчий, ніж у тварин інтактної серії. У подальшому (на 6 год періоду реоксигенації) у контролі концентрація АТФ продовжувала знижуватися, і в цей термін експерименту становила менше, ніж половину від значень, що зареєстровані в інтактних тварин ($P < 0,001$). Цей експериментально доведений факт можна пояснити порушенням цілісності клітинних та субклітинних біомембран, у тому числі мітохондрій. Мембранодеструкція мітохондрій за загальновідомою теорією Мітчелла [7] неминуче призводить до роз'єднання процесів окиснення та фосфорилювання, а отже й миттєвого виснаження пулу АТФ в організмі, що, власне, ми й спостерігаємо в нашому досліді.

При застосуванні з профілактичною метою координаційної сполуки германію, що досліджується, відмічали позитивну динаміку щодо вмісту АТФ. Так, концентрація даного макроерга в середньому на 63 % вища за таку, що визначається, у тварин, які не отримували попередньо ВІТАГЕРМ-3, та протягом усього дослідження не має вірогідних відмінностей порівняно з групою інтактних тварин ($P > 0,05$). Це, на нашу думку, свідчить про те, що ВІТАГЕРМ-3 має виражену мембраностабілізуючу дію на тлі гострого киснедефіцитного стану в поєднанні з гіперкапнією, перш за все, відносно мітохондрій, попереджуючи, таким чином, роз'єднання реакцій окиснення та фосфорилювання та, як результат, порушення синтезу АТФ. Більше того, значення рівнів АТФ у щурів дослідної та референтних груп не мають вірогідних відмінностей упродовж обох термінів експерименту.

Наявність енергетичного дисбалансу за умов гіпоксичної гіпоксії на тлі гіперкапнії експериментально підтверджується також динамікою вмісту АДФ. Отримані дані зображені на рисунку, з якого видно, що в щурів контролю рівень цього макроерга перевищує показники інтактної серії на 50 та 8,0 % на 1 та 6 год дослідження відповідно.

Іншу динаміку концентрації АДФ реєстрували в тварин на фоні проведення фармакопрофілактики ВІТАГЕРМ-3 – визначали зниження концентрації даного макроерга порівняно з тваринами контрольної групи на 27 та 2 % на 1 та 6 год дослідження відповідно. При цьому слід відмітити, що за умов застосування ВІТАГЕРМ-3 динаміка вмісту АДФ змінюється таким чином, що протягом усього експерименту не реєструється вірогідних відмінностей зі значеннями, зафіксованими в інтактній і референтній серіях щурів (рисунок).

Аналіз динаміки АМФ показує, що за умов гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією (контроль) відбувається прискорення процесів деградації АТФ. На це вказує значне підвищення рівня АМФ – продукту гідролізу АТФ і АДФ. Результати, наведені в таблиці, свідчать, що в контролі на 1 год періоду реоксигенації вміст АМФ у 1,8 разу вище, ніж у групі інтактних щурів. У подальшому визначається поступове зростання вмісту АМФ в організмі контрольних щурів ще на 10 % (через 6 год), і його рівень є вірогідно ($P < 0,001$) вищим порівняно з тим, що ідентифікований в інтактній групі.

Експериментально доведено, що попереднє введення координаційної сполуки германію, що досліджується, тваринам із модельованою формою гіпоксії призводить до зниження концентрації АМФ у дослідній групі

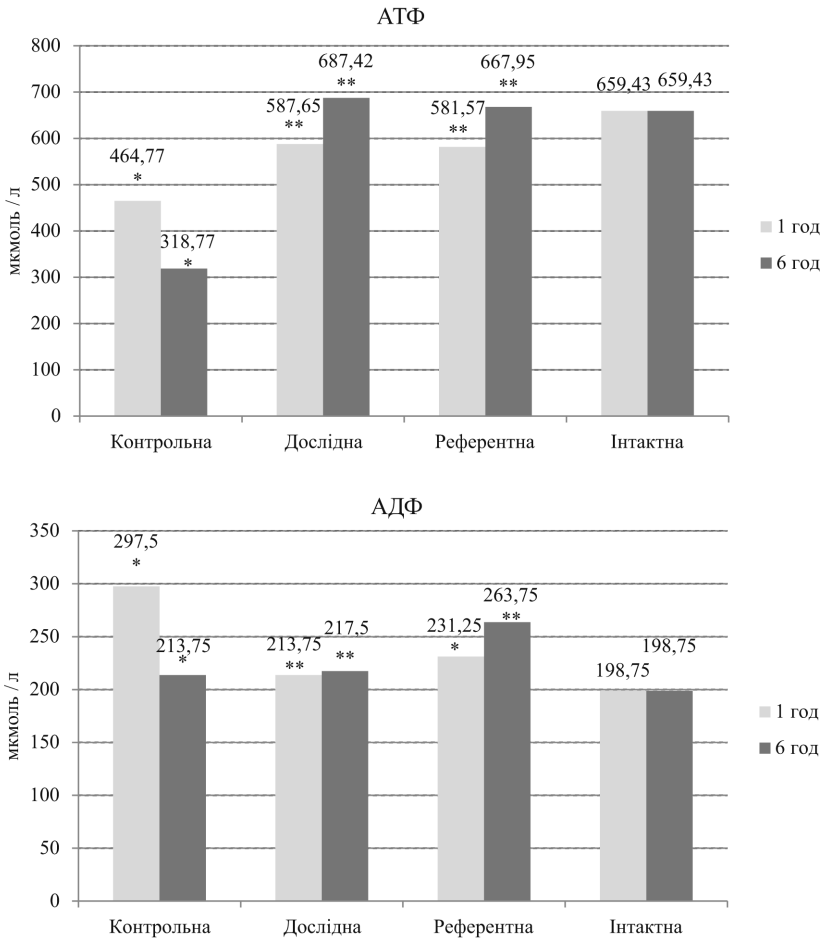


Рисунок. Концентрації АТФ та АДФ у крові щурів за умов гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією та впливу ВІТЕГЕРМ-3 (n = 6)

*Примітка. *P < 0,05 вірогідно порівняно з інтактною серією, **P < 0,05 вірогідно порівняно з контрольною групою.*

впродовж усього періоду спостереження. При цьому не реєстрували вірогідних відмінностей (P > 0,05) між показниками АМФ у дослідній і інтактній групах протягом усього експерименту. Це вказує на наявність у ВІТАГЕРМ-3 вираженого протекторного ефекту відносно субклітинних, зокрема, мітохондріальних, мембран та, як результат, і пулу аденілових нуклеотидів, що в цілому попереджає енергетичний дефіцит за умов гіпоксично-гіперкапнічного стану.

Враховуючи те, що завдяки особливостям своєї хімічної будови атоми фосфору здатні до утворення високоенергетичних зв'язків у макроергічних сполуках (АТФ), ми дослідили також динаміку рівня Фн у разі гіпоксії з гіперкапнією за умов її лікарської профілактики за допомогою ВІТАГЕРМ-3.

Результати, які наведено в таблиці, свідчать, що в тварин з гіперкапнічною гіпоксією (контроль) реєструється підвищення концентрації цього показника в середньому на 48 % порівняно з інтактною серією. Таке підвищення рівня Фн можна пояснити виснаженням енергетичних запасів (деградація АТФ із накопиченням АМФ, до складу якого входить фосфатна група). Крім того, накопичення Фн за умов ГЗП обумовлено, як нам видається, відсутністю необхідності використання цього елемента для синтезу АДФ з АМФ та АТФ з АДФ.

На фоні введення координаційної сполуки германію, що досліджується,

Таблиця

Динаміка рівня АМФ та фосфору неорганічного в крові щурів за умов гіперкапнічної гіпоксії та впливу ВІТАГЕРМ-3 (n = 6)

Показник	Група тварин	Статистичний показник	Термін дослідження, год	
			1	6
Уміст АМФ, мкмоль/л	Інтактна	M ± m	127,40 ± 8,94	
	Контрольна	M ± m P_1	226,63 ± 20,16 < 0,01	248,68 ± 16,01 < 0,001
	Дослідна	M ± m P_1 P_2 P_3	120,05 ± 7,28 > 0,05 < 0,01 > 0,05	113,93 ± 14,98 > 0,05 < 0,001 > 0,05
	Референтна	M ± m P_1 P_2	122,50 ± 5,66 > 0,05 < 0,01	124,095 ± 5,480 > 0,05 < 0,001
Уміст Фн, ммоль/л	Інтактна	M ± m	2,37 ± 0,24	
	Контрольна	M ± m P_1	3,58 ± 0,31 < 0,05	3,44 ± 0,27 < 0,05
	Дослідна	M ± m P_1 P_2 P_3	2,52 ± 0,15 > 0,05 < 0,05 > 0,05	2,39 ± 0,14 > 0,05 < 0,05 > 0,05
	Референтна	M ± m P_1 P_2	2,58 ± 0,19 > 0,05 < 0,05	2,45 ± 0,17 > 0,05 < 0,05

Примітка. P_1 – вірогідно порівняно з інтактною групою, P_2 – вірогідно порівняно з контрольною групою, P_3 – вірогідно порівняно з референтною групою.

має місце збереження інтенсивності процесів окиснення та фосфорилювання, про що свідчить зменшення Фн на 30 % порівняно з показником контрольних тварин ($P < 0,05$). Тобто, виявлені в експерименті зміни свідчать про те, що на тлі застосування ВІТАГЕРМ-3 Фн активно залучається до процесів утворення АДФ з АМФ та АТФ з АДФ, тобто збереження енергетичних запасів клітин за умов різкого дефіциту кисню та надлишку CO_2. При цьому рівень Фн, що визначали в дослідній групі, не відрізняється від концентрацій Фн у інтактних щурів ($P > 0,05$).

Застосування з профілактичною метою потенційного антигіпоксанту ВІТАГЕРМ-3 призводить до виразного протекторного ефекту щодо деградації аденілових нуклеотидів, що має місце за умов дефіциту кисню та надлишку діоксиду вуглецю в повітрі, що вдихають.

При обговоренні отриманих в експерименті даних, які вказують на дисбаланс в системі АТФ-АДФ-АМФ за умов гіпоксично-гіперкапнічного впливу на організм, варто зазначити, що виявлені порушення процесів окиснення та фосфорилювання зумовлені, швидше за все, мембранодеструкцією вільнорадикального генезу, оскільки, згідно з теорією Мітчелла, між цілісністю мітохондріальних мембран та окисним фосфорилюванням є прямий причинно-наслідковий зв'язок. Іншими словами, порушення цілісності мембран мітохондрій сприяє порушенню процесів аеробного синтезу аденілових нуклеотидів.

У той самий час попереднє застосування ВІТАГЕРМ-3 перед початком формування гіпоксично-гіперкапнічного стану має виражений протекторний ефект щодо дисбалансу в системі аденілових нуклеотидів шляхом попередження роз'єднання процесів окиснення та фосфорилювання за рахунок притаманної цій сполуці антирадикальної дії, а отже попереджує деструкцію мембран мітохондрій за умов дефіциту

кисню та надлишку діоксиду вуглецю в повітрі, що вдихають.

З огляду на викладені відомості є підстави говорити, що в основі механізму протигіпоксичної дії ВІТАГЕРМ-3 лежить його здатність попереджати роз'єднання окисного фосфорилювання, а отже й порушення аденілнуклеотидного обміну, підґрунтям для чого можуть бути антирадикальні властивості потенційного антигіпоксанту. Це сприяє стабілізації мембран мітохондрій та аеробного синтезу аденілових нуклеотидів.

Висновок

З'ясовано можливий механізм антигіпоксичної дії оригінальної координаційної сполуки германію, діетилентріамінпентаоцтової кислоти та калію (ВІТАГЕРМ-3), в основі якого лежить попередження дисбалансу в системі аденілових нуклеотидів, що відбувається, вірогідно, внаслідок реалізації антиоксидантних (антирадикальних) властивостей потенційного антигіпоксанту.

1. Порівняльні скринінгові дослідження в ряду координаційних сполук германію на моделі гіпоксії замкнутого простору / В. Д. Лук'янчук, І. Й. Сейфулліна, К. О. Шебалдова [та ін.] // Український журнал екстремальної медицини ім. Г. О. Можаєва. – 2013. – № 1. – С. 81–84.
2. Дослідження фармакометричних показників режиму дозування антигіпоксанта ВІТАГЕРМ-3 / В. Д. Лук'якчук, К. О. Шебалдова, Д. С. Кравець, Л. С. Бобкова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – №4–5 (35). – С. 66– 69.
3. *Воронина Т. А.* Антиоксидант мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия / Т. А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 2–12.
4. *Андреева Н. Н.* Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии (обзор) / Н. Н. Андреева // Медицинский альманах. – 2009. – № 4 (9). – С. 193–197.
5. Захарова Н. Б. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках силуфол / Н. Б.Захарова, В. И. Рубин // Лабораторное дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
6. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: пер с англ. / С. Гланц. – Москва : Практика, 1999. – 459 с.
7. *Гонський Я. І.* Біохімія людини / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : «Укрмедкнига», 2001. – 936 с.

В. Д. Лук'янчук, К. О. Шебалдова

Аденілнуклеотидний компонент механізму протигіпоксичної дії нової координаційної сполуки германію ВІТАГЕРМ-3 на моделі гіпоксії замкнутого простору

На моделі гіпоксії замкнутого простору (ГЗП) досліджено вплив ВІТАГЕРМ-3 на енергетичний стан клітини, що виражається в динаміці вмісту аденілових нуклеотидів та фосфору неорганічного (Фн) у крові щурів у ранньому періоді реоксигенації. З'ясування енерготропних механізмів протигіпоксичної дії ВІТАГЕРМ-3 проводили шляхом визначення концентрацій аденілових нуклеотидів та фосфору неорганічного, що характеризують енергетичний гомеостаз і зумовлюють перебіг енергозалежних процесів. Дефіцит кисню в повітрі, яке вдихають, викликає суттєве пригнічення біоенергетичних функцій мітохондрій, що призводить до порушення плину численних енергозалежних процесів і до виснаження енергоресурсів. ВІТАГЕРМ-3 проявляє виразну протекторну активність щодо деградації аденілових нуклеотидів, яка відбувається за умов дефіциту кисню та надлишку діоксиду вуглецю в повітрі, що вдихають. Доведено, що застосування ВІТАГЕРМ-3 сприяє нормалізації вмісту аденілових нуклеотидів за рахунок підвищення вмісту АТФ і АДФ та зниження АМФ і Фн. Отже, застосування перед початком дії ГЗП ВІТАГЕРМ-3 усуває дисбаланс у системі макроергів. Не виключено, що такий фармакодинамічний ефект ВІТАГЕРМ-3 реалізується шляхом стимуляції захисно-адаптаційних механізмів організму при гострому гіпоксично-гіперкапнічному стані.

Ключові слова: ВІТАГЕРМ-3, гіпоксія замкнутого простору, протигіпоксична дія, енергетичний обмін

В. Д. Лукьянчук, Е. А. Шебалдова

Аденилнуклеотидный компонент механизма противогипоксического действия нового координационного соединения германия ВИТАГЕРМ-3 на модели гипоксии замкнутого пространства

На модели гипоксии замкнутого пространства (ГЗП) исследовано влияние ВИТАГЕРМ-3 на энергетическое состояние клетки, которое выражается в динамике содержания аденилових нуклеотидов и фосфора неорганического (Фн) в крови крыс в раннем периоде реоксигенации. Выяснение

энерготропных механизмов противогипоксического действия ВИТАГЕРМ-3 проводили путем определения концентрации адениловых нуклеотидов и фосфора неорганического в крови, что характеризует энергетический гомеостаз и определяет течение энергозависимых процессов. Дефицит кислорода во вдыхаемом воздухе вызывает значительное угнетение биоэнергетических функций митохондрий, что приводит к нарушению течения многочисленных энергозависимых процессов и к истощению энергоресурсов. ВИТАГЕРМ-3 имеет выраженную протекторную активность в отношении деградации адениловых нуклеотидов, которая происходит в условиях дефицита кислорода и избытка диоксида углерода во вдыхаемом воздухе. Доказано, что использование ВИТАГЕРМ-3 способствует нормализации содержания адениловых нуклеотидов за счет повышения концентраций АТФ и АДФ, а также снижения АМФ и Фн. Итак, использование перед началом действия ГЗП ВИТАГЕРМ-3 устраняет дисбаланс в системе макроэргов. Не исключено, що такой фармакодинамический эффект ВИТАГЕРМ-3 имеет место за счет стимуляции защитно-адаптационных механизмов организма при остром гипоксическо-гиперкапническом состоянии.

Ключевые слова: ВИТАГЕРМ-3, гипоксия замкнутого пространства, противогипоксическое действие, энергетический обмен

V. D. Lukyanchuk, K. O. Shebaldova

Adenile nucleotides component of antihypoxic mechanism action of the new coordination compound of germanium VITAGERM-3 on the model of the enclosed space hypoxia

On the model of hypoxia of the enclosed space the effect of VITAGERM-3 on the energetic state of a cell, which is expressed in the changes in contents of adenile nucleotides and inorganic phosphorus in animals in early period of reoxygenation, was studied. The identification of energotrophic mechanism of antihypoxic action VITAGERM-3 was carried out by the measuring adenile nucleotides and inorganic phosphorus concentrations, which characteris energy homeostasis and define for energy-dependent processes.

The oxygen deficit in the inspired air caused significant inhibition of mitochondrion's bioenergetic function which leads to disruption cours of numerous energyness processes and to depletion energy resources. VITAGERM-3 has expressed protective activity as to the degradation of the adenile nucleotides, which occurs in conditions of oxygen acute deficite and carbon dioxide overage in the inspired air. It is proved, that the usage of VITAGERM-3 normalizes content of adenile nucleotides by increase of ATP and ADP concentrations and also by AMP and inorganic phosphorus reduction .

So, the usage of VITAGERM-3 before the start of an enclosed space hypoxia is realised by the disbalance correction in the macroergic compounds system. It is possible that this pharmacodynamics effect of VITAGERM-3 is due to the stimulation of the protective-adaptive mechanisms of the organisms under acute hypoxic-hypercapnic state.

Key words: VITAGERM-3, an enclosed space hypoxia, antihypoxic action, energy metabolism

Надійшла: 21.03.2015 р.

Контактна особа: Лук'янчук Віктор Дмитрович, доктор медичних наук, професор, відділ фармакокінетики, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: +38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: lvdlug@mail.ru

УДК 612.233+612.176;577.151.6+577.23

І. М. Маньковська[1], В. І. Носар[1], О. О. Гончар[1], Б. Л. Гавенаускас[1], С. Б. Французова[1], Л. В. Братусь[1], Г. Д. Миронова[2]

Вплив модуляторів мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу на фізичну витривалість щурів

[1]Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, м. Київ
[2]Інститут теоретичної та експериментальної біофізики РАН, Пущино, Московська область, Росія

Ключові слова: фізична витривалість, гіпоксія навантаження, мітоК$^+_{АТФ}$-канал

Формування витривалості організму до інтенсивних фізичних навантажень тісно пов'язане з адаптацією до гіпоксії, що розвивається за цих умов. При напруженій м'язовій діяльності порушується адекватне забезпечення киснем метаболічних потреб тканин, зростає кисневий борг, накопичуються кислі продукти, пошкоджуються клітинні мембрани та органели клітин у результаті оксидативного стресу. Було розроблено різні методи та схеми тренувань, які покликані підвищити фізичну витривалість організму шляхом зменшення вираженості тканинної гіпоксії та оксидативного стресу під час виконання м'язових навантажень [2, 6]. Ще одним підходом до цієї проблеми є пошук природних речовин і лікарських препаратів, дія яких спрямована на попередження розвитку тканинної гіпоксії та оксидативного стресу при напруженій м'язовій діяльності.

Відкриття мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу (мітоК$^+_{АТФ}$-канал) викликало жвавий інтерес дослідників у галузі як біоенергетики, так і медицини в зв'язку з доведенням його ролі в захисті серця від гіпоксичного та ішемічного пошкодження [11, 14, 15, 21, 22]. Подальше накопичення об'єму експериментальних даних свідчить про те, що мітоК$^+_{АТФ}$-канал є модулятором основних характеристик енергетичного стану мітохондрій [1, 12, 13] та може регулювати продукцію активних форм кисню, генерація яких значно зростає при гіпоксії [10]. Нещодавно вдалося виявити метаболічний активатор мітоК$^+_{АТФ}$-уридиндифосфат [19]. Було показано, що введення тваринам метаболічних попередників природного активатора мітоК$^+_{АТФ}$-каналу уридиндифосфату – уридина та уридинмонофосфату перед моделюванням ішемії міокарда захищає серце від ішемічних пошкоджень, спричиняючи антигіпоксичний та антиоксидантний вплив на енергетичний та окиснювальний обмін у міокарді [4, 5, 17].

У зв'язку з вищесказаним, виникла наступна ідея: встановити, чи може активатор мітоК$^+_{АТФ}$-каналу спричиняти подібний вплив на м'язову тканину при напруженій м'язовій діяльності, що в результаті може призвести до покращання фізичної витривалості та аеробної продуктивності організму. Слід підкреслити, що недавні дослідження чітко пов'язують особливості фізичної витривалості організму з такими молекулярно-генетичними маркерами, як алельний поліморфізм генів, які мають відношення до м'язової діяльності [3].

Мета дослідження – виявити здатність мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу впливати на витривалість тварин до фізичних навантажень.

Матеріали та методи. Витривалість до фізичного навантаження визначали шляхом реєстрації часу, протягом якого щури-самці Вістар масою 200–250 г плавали з 20 % вантажем від маси тіла у воді за температури 32 °С до знемоги (залягання на дно басейну протягом 15 с). Усі маніпуляції з тваринами

© Колектив авторів, 2015

проведено відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1986 р.) та положення Комітету з біоетики Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Було встановлено, що дослідні щури по-різному реагували на дане навантаження й тому були розподілені за часом плавання до знемоги наступним чином: з високою, середньою та низькою витривалістю. У подальші дослідження було включено тільки високовитривалих (ВВ) до фізичного навантаження щурів (n = 39), які плавали до знемоги в середньому 7–8 хв, та низьковитривалих (НВ) тварин (n = 39), час плавання (до знемоги) яких становив 1,5–2,5 хв. Кожну з цих великих груп тварин було розподілено методом випадкової вибірки на такі 6 підгруп: 1) плавання до знемоги без додаткових фармакологічних втручань (контроль); 2) введення уридину + плавання; 3) введення 5-hydroxydecanoic (5-HD) + плавання; 4) введення 5-HD та уридину + плавання; 5) введення глібенкламіду (ГЛ) + плавання; 6) введення ГЛ та уридину + плавання. Активатор мітоК$^+_{АТФ}$-каналу – уридин вводили внутрішньоочеревинно (в/о) за 60 хв до плавання в дозах 20 мг/кг, 30 мг/кг та 45 мг/кг маси тіла. Блокатори мітоК$^+_{АТФ}$-каналу 5-HD та ГЛ вводили в/о за 5 хв до введення уридину в дозах 5 мг/кг та 1 мг/кг маси тіла відповідно.

Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, печінку переносили в охолоджене середовище виділення наступного складу: сахарози – 70 ммоль/л, Д-манітолу – 210 ммоль/л, ЕДТА – 2 ммоль/л, HEPES – 10 ммоль/л, pH 7,2. Потім печінку подрібнювали та гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тефлоновим товкачиком у 8-кратному об'ємі середовища виділення відносно маси тканини. Для виділення мітохондрій (Мх) гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g (4 °С), потім супернатант центрифугували 15 хв при 11000 g (4 °С). Осадок суспендирували в невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА та зберігали за температури 4 °С.

Транспорт калію визначали спектрофотометричним методом за світлопоглинанням препарату Мх при 520 нм, що віддзеркалює величину набряку Мх внаслідок накопичення в них калію та води [16]. Середовище інкубації мало наступний склад: KCl – 50,0 ммоль/л; Na_2HPO_4 – 5,0 ммоль/л; $MgCl_2$ – 0,5 ммоль/л; EGTA – 0,1 ммоль/л; HEPES – 5 ммоль/л, pH 7,2. Концентрація мітохондріального білка в комірці складала 0,2 мг/мл. Набряк Мх ініціювали внесенням 5 ммоль/л сукцинату натрію в присутності 2 мкмоль/л ротенону.

АТФ-залежний вихід калію з Мх, який індукований роз'єднувачем (50 мкмоль/л 2,4-ДНФ) і також віддзеркалює роботу мітоК$^+_{АТФ}$-каналу, але в зворотному напрямі [9], вимірювали за допомогою калій-селективного електрода в комірці об'ємом 1 мл при постійному перемішуванні за температури 26 °С. Середовище інкубації мало наступний склад: сахароза – 170 ммоль/л; Д-манітол – 80 ммоль/л; Na_2HPO_4 – 5 ммоль/л; tris-HCl – 10 ммоль/л (pH 7,2); олігоміцину – 1 мкг/мл; концентрація мітохондріального білка в комірці складала 0,9–1,1 мг/мл. Швидкість виходу калію з Мх розраховували за кількістю іонів, які вийшли в середовище за хв/мг білка.

Визначення кількості калію в Мх проводили за допомогою селективного калієвого електрода в комірці об'ємом 1 мл при постійному перемішуванні за температури 26 °С. Середовище інкубації мало наступний склад: сахароза – 170 ммоль/л; Д-манітол – 80 ммоль/л; Na_2HPO_4 – 5 ммоль/л; tris-HCl – 10 ммоль/л (pH 7,2); концентрація мітохондріального білка в комірці складала 0,9–1,1 мг/мл. У середовище з Мх додавали детергент (0,05 % тритону Х-100). Кількість калію розраховували за кількістю іонів, які з'являлися в середовищі інкубації після руйнування Мх за рахунок доданого тритону Х-100.

Результати обробляли з застосуванням методів параметричної варіаційної статистики з використанням програми Microsoft Excel, вірогідність різниці у вибірках визначали за t-критерієм Стьюдента. Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У дослідженні вивчали вплив уридину на

витривалість до фізичного навантаження ВВ та НВ тварин. Уридин є метаболічним попередником природного активатора мітоК$^{+}_{АТФ}$-каналу – уридиндифосфату (УДФ). Для нього характерна низька токсичність та здатність, на відміну від УДФ, проходити крізь біологічні мембрани та утворювати в клітині УДФ та уридинтрифосфат (УТФ). З УТФ у клітині утворюється УДФ-глюкоза, яка надалі використовується як донор залишка глюкози при синтезі глікогену [8].

Встановлено, що при внутрішньоочеревинному введенні щурам уридину (30 мг/кг за 60 хв до плавання) спостерігаються відмінності в його впливі на термін плавання до знемоги в дослідних тварин (таблиця). Так, у НВ щурів він значно збільшувався, у середньому вдвічі, у той час, як ВВ тварини плавали менше, у середньому на 45 % (відносно контрольних значень). Таким чином, як показано в таблиці, у присутності уридину тварини НВ та ВВ плавали однаковий час до знемоги.

Зниження часу плавання ВВ тварин під впливом уридину ми пов'язуємо зі здатністю уридину підсилювати синтез глікогену, метаболізм якого відрізняється в дослідних тварин [7]. Вважаємо, що введення уридину ВВ щурам, у яких первісно підвищений цей синтез, призводить до зростання синтезу глікогену в тканинах цих тварин вище критичного рівня. У той самий час відомо, що накопичення глікогену вище норми призводить до активації гліколізу та зростання концентрації молочної кислоти, яка й має негативний вплив на витривалість цих тварин [7]. Цілком вірогідно, що в НВ тварин синтез глікогену знижений, а під впливом уридину він дещо збільшується, що сприяє зростанню витривалості.

Таким чином, у ВВ тварин уведення уридину може створювати стан «хімічного перетренування». Проте це вимагає експериментального підтвердження.

Для того, щоб з'ясувати, у якій мірі час плавання тварин залежить від роботи мітоК$^{+}_{АТФ}$-каналу, було використано інгібітори цього каналу (внутрішньоочеревинне введення 5 мг/кг 5-HD та 1 мг/кг ГЛ) і показано, що вони вірогідно знижують термін плавання тварин. Проте цей ефект також залежить від стану фізичної витривалості тварин. Так, як видно з таблиці, 5-HD та ГЛ значно знижують час плавання НВ щурів (на 50 %), у той час як цей показник у ВВ знижується менше. Цей факт також підтверджує припущення, що мітоК$^{+}_{АТФ}$-канал бере участь у забезпеченні стійкості щурів до фізичних навантажень, проте у ВВ щурів здатність виконувати великі навантаження

Таблиця

Час плавання щурів до знемоги за введення модуляторів мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу, M ± m

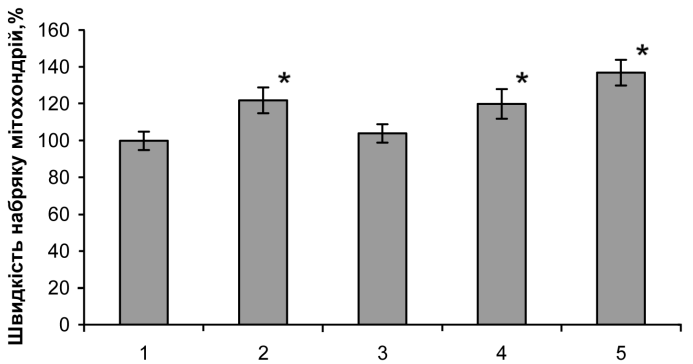
Умова досліду	Час плавання, хв	
	високовитривалі щури	низьковитривалі щури
Плавання (контроль)	7,40 ± 0,35 n = 8	2,07 ± 0,10 n = 8
Уридин (30 мг/кг) + плавання	4,11 ± 0,18* n = 8	4,28 ± 0,25* n = 8
5-hydroxydecanoic + плавання	3,26 ± 0,25* n = 7	1,08 ± 0,34* n = 7
5-hydroxydecanoic + уридин + плавання	2,35 ± 0,45* n = 6	2,15 ± 0,24 n = 6
Глібенкламід + плавання	3,36 ± 0,45* n = 5	1,10 ± 0,14* n = 5
Глібенкламід + уридин + плавання	2,30 ± 0,25* n = 5	1,57 ± 0,41 n = 5

*Примітка. *Відмінності відносно контролю (P < 0,05).*

пов'язані не тільки з активацією роботи каналу, але й з іншими захисними факторами, можливо з підсиленням синтезу глікогену. Судячи з інгібіторного аналізу, у НВ щурів за посилення витривалості відповідає в значній мірі активація мітоК$^{+}_{АТФ}$-каналу. Це також підтверджується експериментами з введенням селективного інгібітора 5-HD на тлі уридину. Як видно з таблиці, у НВ щурів термін плавання наближується до контрольного значення, що свідчить про повне усунення інгібітором позитивного ефекту уридину; ГЛ діє подібним чином.

Отримано також дані порівняння швидкості транспорту калію в Мх печінки в стані спокою обох груп тварин, які визначали за стандартною методикою визначення набряку Мх (рисунок). Аналіз цих даних свідчить, що швидкість транспорту калію в Мх ВВ щурів у стані спокою була вищою, ніж у НВ тварин. Уведення уридину в дозі 30 мг/кг НВ тваринам через 60 хв призводило до збільшення швидкості АТФ-залежного набряку Мх майже до рівня його значень у ВВ, а сумісне введення уридину та інгібітора цього транспорту знижувало її майже до контрольного рівня. Слід зазначити, що ефект дії уридину зберігався принаймні протягом 1 доби. Останнє узгоджується з відомою дією фармакологічних активаторів мітоК$^{+}_{АТФ}$-каналу на толерантність тварин до гіпоксії [5]. При введенні активатора або за умов прекондиціювання спостерігаються дві хвилі толерантності тварин до гіпоксії: перша – розвивається в перші години після введення активатора, а друга хвиля спостерігається через кілька діб (3–7) [23]. Перша хвиля пов'язується з активацією мітоК$^{+}_{АТФ}$-каналу, можливо, уридином, а друга – з посиленням синтезу білків цього каналу, так як відомо, що введення активатора призводить до посилення експресії гена білків-каналів [18].

Отримані дані з набряку Мх печінки щурів узгоджуються з результатами дослідження 2,4-ДНФ, що індукує АТФ-залежний вихід калію з Мх. Було виявлено, що у ВВ щурів швидкість цього транспорту вища, ніж у НВ тварин [(39,7 ± 3,7) та (27,9 ± 2,9) мкмоль/хв · мг відповідно, $P < 0,05$]. Уведення уридину в дозі 30 мг/кг маси НВ щурам підвищує її майже до рівня швидкості у ВВ щурів (до 33,61 ± 3,14), а інгібітор перешкоджає ефекту уридину. Визначення кількості калію в Мх печінки щурів свідчить про те, що вміст калію у НВ щурів більший, ніж у ВВ [(56,5 ± 8,7) та (42,3 ± 5,4) мкмоль/мг



1 – низьковитривалі щури
2 – низьковитривалі щури + уридин
3 – низьковитривалі щури + 5-hydroxydecanoic + уридин
4 – низьковитривалі щури + уридин через 1 добу
5 – високовитривалі щури

Рисунок. Швидкість набряку мітохондрій печінки у високо- та низьковитривалих до фізичного навантаження щурів у стані спокою

*Примітка. За 100 % прийнято швидкість набряку в низьковитривалих щурів; введення уридину – за 60 хв у дозі 30 мг/кг; введення 5-hydroxydecanoic у дозі 5 мг/кг – за 5 хв до введення уридину; *P < 0,05 відносно контролю.*

відповідно, $P<0,05$]. Введення активатора та інгібітора каналів, що вивчаються, суттєво не впливає на його кількість у Мх печінки. Наведені дані узгоджуються з результатами, отриманими нами раніше на тваринах із різною стійкістю до гіпоксії [20].

Виявлені різнонаправлені реакції на дію уридину в дозі 30 мг/кг у тварин з різною витривалістю до фізичного навантаження спонукали нас визначити, чи зберігаються ці відмінності при дії інших доз речовини. Виявилося, що за умов введення уридину в дозі 20 мг/кг у ВВ тварин (n = 5) термін плавання до знемоги зменшився на (36,0 ± 2,5)% відносно контролю, у той час як при введенні уридину в дозі 30 мг/кг це зменшення становило 45 %. У НВ тварин (n = 5) зареєстровано зростання цього показника лише на (35,0 ± 3,1) % проти збільшення вдвічі при застосуванні уридину в дозі 30 мг/кг.

Використання уридину в дозі 45 мг/кг призводило до зниження витривалості до фізичного навантаження на (36,0 ± 2,7) % у тварин обох груп. Отримані результати свідчать, що для значущої активації мітоК$^+_{АТФ}$-каналу в НВ тварин доцільно застосовувати уридин у дозі 30 мг/кг. Щодо зростання витривалості у ВВ, то можливо слід застосовувати (з урахуванням приведених даних) ще менші дози уридину, проте це припущення потребує додаткових ретельних досліджень. Щоб пояснити зниження витривалості в НВ та ВВ тварин при введенні уридину в дозі 45 мг/кг, ми можемо послатися на роботу К. В. Розової та співавт., яка була проведена в нашому відділі (прийнята до друку). У цій роботі показано, що збільшення дози уридину до вказаної вище супроводжувалося порушеннями ультраструктури мітохондрій міокарда: такі порушення автори пов'язують з ймовірною «переактивацією» мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів. Таке пояснення добре узгоджується з тим, що при застосуванні блокатора цих каналів 5-HD (поряд з високою дозою активатора) нормалізується ультраструктура мітохондрій.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що витривалість до фізичних навантажень тісно пов'язана з активністю мітоК$^+_{АТФ}$-каналів. У ВВ щурів швидкість транспорту калію в Мх печінки вища, а кількість калію нижча, ніж у НВ тварин. Уведення тваринам уридину в дозі 30 мг/кг призводило до підвищення стійкості до гіпоксії навантаження в НВ, а в ВВ – до зниження, що пов'язано, як ми вважаємо, з дією уридину на синтез глікогену та його накопичення, що, у свою чергу, призводить до зростання швидкості гліколізу та збільшення кількості молочної кислоти в тканинах. Проте інгібітори мітоК$^+_{АТФ}$-каналу як на тлі уридину, так і без нього, знижували витривалість обох груп тварин, що вказує на позитивну роль каналу в формуванні витривалості організму до фізичних навантажень. Допускаємо, що уридин у дозі 30 мг/кг маси може бути застосований як фактор, який захищає від гіпоксії навантаження за умов зниження фізичної витривалості організму.

Механізми дії активаторів мітоК$^+_{АТФ}$-каналу ми пов'язуємо з активацією циклу калію в мітохондріях [20]. Можуть бути запропоновані такі тлумачення щодо того, яким чином активація мітоК$^+_{АТФ}$-каналу може захистити тканини від дії гіпоксії навантаження. Перше, відкриття мітоК$^+_{АТФ}$-каналу внаслідок набряку Мх може посилити продукцію та/чи утилізацію АТФ в Мх [13]. Друге, протективний ефект активації мітоК$^+_{АТФ}$-каналу може бути опосередкований через зниження перевантаження Мх Ca^{2+} [1]. Третє, вищезгадана активація може призводити до зміни експресії протеїнкінази С та інших «протективних» білків [15]. Накінець, і може найважливіше, відкриття мітоК$^+_{АТФ}$-каналу зменшує генерацію активних форм кисню та вираженість оксидативного стресу в клітинах [10].

Висновки

Зростання витривалості щурів до фізичного навантаження тісно пов'язане з активацією мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу. Для підвищення активації мітоК$^+_{АТФ}$-каналу в низьковитривалих до фізичного навантаження тварин доцільно використовувати уридин у дозі 30 мг/кг.

1. Влияние активатора АТР-зависимого K^+-канала на функциональное состояние и открывание циклоспоринчувствительной поры в митиохондриях печени крыс / Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 3. – С. 38–51.
2. Модулюючий вплив інтервального гіпоксичного тренування на функціональні і метаболічні показники адаптації організму і м'язової тканини щурів до гіпоксії навантаження / Гавенаускас Б. Л., Маньковська І. М., Носар В. І. [та ін.] // Фізіол. журн. – 2004. – Т. 50, № 6. – С. 42–52.
3. Основи молекулярної генетики м'язової діяльності: навч. посібник / В. М. Ільїн, С. Б. Дроздовська, В. С. Лизогуб, О. П. Безкопильний. – Київ :Олімп. л-ра, 2013. – 112 с.
4. Влияние уридина на энергетический обмен, ПОЛ и антиоксидантную систему в миокарде в условиях острой коронарной недостаточности / Крылова И. В., Балион В. В. Селина Е. Н. [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2012. – Т. 153, № 5. – С. 644–646.
5. Влияние некоторых флавоноидсодержащих препаратов растительного происхождения на активность митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала / Миронова Г. Д., Шигаева М. И., Белослудцева Н. В. [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2008. – № 8. – С. 96–100.
6. *Филиппов М. М*. Процесс массопереноса респираторных газов при мышечной деятельности. Степени гипоксии нагрузки / Филиппов М. М. // Вторичная тканевая гипоксия. – Киев : Наук. думка, 1983. – С. 197–216.
7. *Шумицкая Н. М.* Активность гексокиназы и интенсивность анаэробного гликолиза в мозге и миокарде высоко- и низкоустойчивых к недостатку кислодорода белых крыс при острой и хронической гипоксии / Шумицкая Н. М. // Оксибиотические и аноксибиотические процессы при экспериментальной и клинической патологии. – Киев, 1975. – С. 245–246.
8. *Aussedat J.* Uridine incorporation in normal and ischemic perfused rat heart / Aussedat J., Ray A., Rossi A. // Mol. Physiol. – 1984. – V. 6. – P. 247–256.
9. Inhibition of DNP-induced potassium efflux by adenine nucleotides in mitochondria / Baranova O. V., Skarga Y. Y., Negoda A. E., Mironova G. D. // Biochemistry (Moscow). – 2000. – V. 65. – P. 218–222.
10. *Ferranti R. F.* Mitochondrial ATP-sensitive K+ channel opening decreases reactive oxygen species generation / Ferranti R. F., de Silva M. M., Kowaltowski A. J. // FEBS Letters. – 2003. – V. 536. – P. 51–55.
11. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels: possible mechanism of cardioprotection / Garlid K. D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. [et al.] // Circ. Res. – 1997. – V. 81. –P. 1072–1082.
12. *Garlid K. D*. The mitochondrial potassium cycle / Garlid K. D., Paucek P. // IUBMB Life. – 2001. – V. 52. – P. 153–158.
13. *Garlid K. D.* Mitochondrial potassium transport : the K+ cycle / Garlid K. D., Paucek P. // Biochem. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1606. – P. 23–41.
14. Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occulusions: role of oxygen radicals / Gross G., O,Rourke S., Pelc L., Warltier D. // Am. J. Physiol. – 1992. – V. 263 (6, pt 2). – P. 1703–1709.
15. *Grover G.* ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology / Grover G., Garlid K. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2000. – V. 32. – P. 677–695.
16. State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate / Jaburek M., Yarov-Yarovoy V., Paucek P., Garlid K. // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273 (22). – P. 13578–13582.
17. The cardioprotective effect of uridine and uridine-5/-monophosphate: the role of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel / Krylova I. B., Kachaeva E. V., Rodionova O. M. [et al.] // Experimental Gerontology. – 2006. – V. 41 (7). – P. 697–703.
18. *Lu Ch*. Channel activators regulate ATP-sensitive potassium channel (KIR6.1) expression in chick cardiomyocytes / Lu Ch., Halvorsen S. // FEBS Lett. – 1997. – V. 412. – P. 119–125.
19. Functional distrinctions between the mitochondrial ATP-dependent K+ channel (mito KATP) and its inward rectifier subunit (mito KIR) / Mironova G. D., Negoda A., Marinov B.[et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – 279 (31). – P. 32562–32568.
20. Functioning of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal/s adaptation to hypoxia / Mironova G. D., Shigaeva M. I., Gritsenko E. N. [et al. // J. Bioenerg Biomembr. – 2010. – V. 42. – P. 473–481.
21. *Szewczyk A.* Mitochondria as a Pharmacological Target / Szewczyk A., Wojtczak Z. // Pharmacol. Reviews. – 2002. – V. 54, № 1. – P. 101–127.
22. *Tkachenko H.* Pinacidil modulates mitochondrial function under experimental myocardium dystrophy in rats / Tkachenko H., Kurhalyuk N. // Bull Vet Inst Pulawy. – 2006. –V. 50. – P. 571–575.
23. Ischemic preconditioning: present position and future directions / Yellon D., Baxter G. F., Garcia-Dorado D. [et al.] // Cardiovasc. Res. – 1998. – V. 37 (1). – P. 21–33.

І. М. Маньковська, В. І. Носар, О. О. Гончар, Б. Л. Гавенаускас, С. Б. Французова, Л. В. Братусь, Г. Д. Миронова

Вплив модуляторів мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу на фізичну витривалість щурів

У дослідженні вивчено здатність мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу (мітоК$^+_{АТФ}$-канал) впливати на витривалість тварин до інтенсивних фізичних навантажень. Як модулятор функціонування цих каналів застосовували уридин – метаболічний попередник їхнього природного активатора уридиндифосфату. Виявилося, що дослідні тварини по-різному реагували на плавання до знемоги: високовитривалі щури плавали (7,40 ± 0,35) хв, а низьковитривалі – (2,07 ± 0,10) хв. Уридин вводили внутрішньоочеревинно за 60 хв до плавання в дозах 20, 30 та 45 мг/кг маси тіла. Інгібітори мітоК$^+_{АТФ}$-каналу 5-hydroxydecanoic (5-HD) та глібенкламід (ГЛ) вводили за 5 хв до введення уридину в дозах 5 мг/кг та 1 мг/кг маси тіла відповідно. В ізольованих з печінки мітохондріях визначали величину входу калію за світопоглинанням препарату мітохондрій при 520 нм, що віддзеркалює величину набряку мітохондрій, а також величину АТФ-залежного виходу калію із мітохондрій, який індукований 2,4-ДНФ. Кількість калію в мітохондріях визначали після додавання детергенту (тритону Х-100) за допомогою селективного калієвого електрода. Встановлено, що при введенні уридину час плавання до знемоги у низьковитривалих щурів збільшувався вдвічі відносно контрольних значень. Інгібітори мітоК$^+_{АТФ}$-каналу 5-HD та ГЛ знижують час плавання в цих щурів на 50 %, а при сумісному введенні інгібіторів та уридину перші повністю усувають позитивний ефект уридину. Швидкість входу калію в мітохондрії у високовитривалих щурів була вищою порівняно з такою у низьковитривалих тварин. Уведення уридину в дозі 30 мг/кг низьковитривалим тваринам призводило до збільшення набряку мітохондрій майже до рівня його значень у високовитривалих, а сумісне введення уридину та інгібіторів транспорту калію знижувало його майже до контрольного рівня. Швидкість виходу калію з мітохондрій була різною у високо- та низьковитривалих щурів [(39,7 ± 3,7) та (27,9 ± 2,9) мкмоль/хв · мг відповідно]. Уведення уридину в дозі 30 мг/кг маси низьковитривалим щурам підвищує величину виходу калію з мітохондрій майже до її рівня у високовитривалих щурів [до (33,6 ± 3,1) мкмоль/хв · мг], а введення 5-HD перешкоджає такому ефекту уридину. Визначення кількості калію в мітохондріях свідчить про те, що вона в низьковитривалих щурів більша, ніж у високовитривалих [(56,5 ± 8,7) та (42,3 ± 5,4) мкмоль/мг відповідно]. Уведення активатора та інгібітора мітоК$^+_{АТФ}$-каналів суттєво не впливає на кількість калію в мітохондріях печінки. Отже, зростання витривалості щурів до фізичного навантаження тісно пов'язане з активацією мітоК$^+_{АТФ}$-каналу, а уридин у дозі 30 мг/кг є найефективнішим для підвищення такої активації в низьковитривалих до фізичного навантаження тварин.

Ключові слова: фізична витривалість, гіпоксія навантаження, мітоК$^+_{АТФ}$-канал

И. Н. Маньковская, В. И. Носарь, О. А. Гончар, Б. Л. Гавенаускас, С. Б. Французова, Л. В. Братусь, Г. Д. Миронова

Влияние модуляторов митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала на физическую выносливость крыс

В исследовании узучали способность митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митоК$^+_{АТФ}$-канал) влиять на выносливость животных при выполнении интенсивных физических нагрузок. В качестве модулятора функционирования этих каналов применяли уридин – метаболический предшественник их естественного активатора уридиндифосфата. Показано, что подопытные крысы по-разному реагировали на плавание до изнеможения: высоковыносливые крысы плавали (7,40 ± 0,35) мин, а низковыносливые – (2,07 ± 0,10) мин. Уридин вводили внутрибрюшинно за 60 мин до плавания в дозах 20, 30 и 45 мг/кг массы тела. Ингибиторы митоК$^+_{АТФ}$-канала 5-hydroxydecanoic (5-HD) и глибенкламид (ГЛ) вводили за 5 мин до введения уридина в дозах 5 и 1 мг/кг массы тела соответственно. В изолированных из печени митохондриях определяли величину входа калия по светопоглощению препарата митохондрий при 520 нм, что отображает величину набухания митохондрий, а также величину АТФ-зависимого выхода калия из митохондрий, который индуцировали 2,4-ДНФ. Количество калия в митохондриях определяли после добавления детергента (тритона Х-100) с помощью селективного калиевого электрода. Установлено, что при введении уридина время плавания до изнеможения у низковыносливых крыс увеличивалось вдвое по отношению к контрольным значениям. Ингибиторы митоК$^+_{АТФ}$-канала 5-HD и ГЛ снижают время плавания у этих крыс на 50 %, а при совместном введении ингибиторов и уридина первые полностью устраняют позитивный эффект уридина. Скорость входа калия в митохондрии у высоковыносливых крыс была выше по сравнению с таковой у низковыносливых животных. Введение уридина в дозе 30 мг/кг низковыносливым животным приводило к увеличению набухания митохондрий почти до уровня его значений у высоковыносливых, а совместное введение уридина и ингибиторов транспорта калия снижало его почти до контрольного уровня. Скорость выхода калия из митохондрий была разной у высоко- и низковыносливых крыс [(39,7 ± 3,7) и (27,9 ± 2,9) мкмоль/мин · мг соответственно]. Введение уридина в дозе 30 мг/кг массы низковыносливым крысам повышает величину выхода калия из митохондрий почти до ее

значения у высоковыносливых животных [(33,6 ± 3,1) мкмоль/мин · мг], а введение 5-HD препятствовало такому действию уридина. Определение количества калия в митохондриях показало, что оно у низковыносливых крыс больше, по сравнению с высоковыносливыми [(56,5 ± 8,7) и (42,3 ± 5,4) мкмоль/мг соответственно]. Введение активатора и ингибитора митоК$^+_{АТФ}$-каналов существенно не влияло на количество калия в митохондриях печени.

Таким образом, повышение выносливости крыс к физическим нагрузкам тесно связано с активацией мітоК$^+_{АТФ}$-канала, а уридин в дозе 30 мг/кг является наиболее эффективным для увеличения такой активации у низковыносливых к физическим нагрузкам животных.

Ключевые слова: физическая выносливость, гипоксия нагрузки, митоК$^+_{АТФ}$-канал

I. N. Mankovskaya, V. I. Nosar, O. A. Gonchar, B. L. Gavenauskas, S. B. Frantsuzova, L. V. Bratus, G. D. Mironova

Effect of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel modulators on rat physical endurance

The impact of a metabolic precursor of natural activator of mitochondrial ATP-dependent potassium channel (mitoK$^+_{ATP}$-channel) – uridine on rat endurance to physical load was studied. The endurance was determined by recording the time period during which the rat loaded with a plumb of 20 % of body weight can swim until exhaustion. It was found that high- enduring rats swam until exhaustion significantly longer than low-enduring rats [(7,40 ± 0,35) and (2,07 ± 0,10) min respectively]. Uridine was injected intraperitoneally 60 min before swimming in doses 20, 30 and 45 mg/kg. Inhibitors of the mitoK$^+_{ATP}$-channel 5-hydroxydecanoic (5-HD) and glibenclamide (GL) were introducted 5 min before the uridine injection in doses 5 and 1 mg/kg respectively. The rate of potassium transport in the liver mitochondria and its amount therein were determined. Potassium entry to mitochondria was determined spectrophotometrically by light absorbtion of a mitochondrial preparation at 520 nm, reflecting the magnitude of the mitochondria swelling. Potassium release from mitochondria was induced by 2,4-DNP. Determination of the potassium amount in mitochondria was conducted after the adding of a detergent (Triton X-100) with the aid of a potassium-selective electrode. It was found that the time of swimming to exhaustion increased significantly in low-enduring rats after the uridine introduction, on average twice compared to control. Upon introduction to low-enduring rats of 5-HD and GL, their swimming time reduced by 50 %; upon joint introduction of inhibitors and uridine, the former abolished completely the positive effect of uridine. The rate of potassium entry to mitochondria of high-enduring rats was significantly higher as compared with that in low-enduring animals. Injection of uridine in a dose 30 mg/kg to low-enduring animals in 60 min led to an increase in the rate of ATP-dependent swelling almost to the level of its values in high-enduring rats, while joint introduction of uridine and an inhibitor of potassium transport reduced it almost to a control level. The rates of potassium release from mitochondria were different in high- and low-enduring rats [(39,7 ± 3,7) and (27,9 ± 2,9) μM/min · mg, respectively]. Upon introduction of uridine in a dose 30 mg/kg to low-enduring animals, potassium release from mitochondria was increased almost to the level of its value in high-enduring rats (33,6 ± 3,1) μM/min · mg), introduction of 5-HD obstructed this effect of uridine. Upon measurement of the amount of potassium in liver mitochondria, a greater content of potassium was disclosed in low-enduring rats as compared with high-enduring ones [(56,5 ± 8,7) and (42,3 ± 5,4) μM/mg respectively]. Introduction of activator or inhibitor of mitoK$^+_{ATP}$-channel does not significantly influence on the potassium amount in mitochondria. So, it was shown that the increase in rat physical endurance is connected with the mitoK$^+_{ATP}$-channel activation by uridine; uridine in a dose 30 mg/kg is most effective for a rise of this activation in low-enduring rats.

Key words: physical endurance, load hypoxia, mitoK$^+_{ATP}$-channel

Надійшла: 23.03.2015 р.

Контактна особа: Маньковська І. М., доктор медичних наук, професор, відділ з вивчення гіпоксичних станів, Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, буд. 4, вул. Богомольця, м. Київ. Тел.: + 38 0 44 253 76 90. Електронна пошта: mankovsk@biph. kiev.ua

УДК 615.451.1.014.24:634.511:547.98

О. О. Цуркан, Є. П. Делян

Визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин з сировини осоту городнього (*Sonchus Oleraceus L.*)

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

Ключові слова: осот городній, екстракція, флавоноїди, поліфеноли, гідроксикоричні кислоти

Фітохімічне дослідження рослин вітчизняної флори, вивчення можливостей комплексного застосування сировини, створення на її основі нових лікарських засобів набуло нині значної актуальності. Це пов'язано з високою ефективністю біологічно активних речовин (БАР) рослинної сировини та їх низькою токсичністю [1].

Осот городній (*Sonchus Oleraceus L.*) – багаторічна рослина родини айстрових, що здавна використовується в народній медицині. Проте надземна частина цієї рослини ще вивчена недостатньо, хоча за даними літератури вона містить велику кількість БАР, зокрема флавоноїдів, оксикоричних кислот, поліфенольних сполук [2–5] та має антиоксидантні, протизапальні, бактерицидні та інші лікувальні властивості [2, 3, 6–10].

Виходячи з вищенаведеного, для розробки оптимальних умов виготовлення потенційних препаратів з надземної частини осоту городнього (настоїв, екстрактів тощо) необхідне визначення оптимальних параметрів процесу екстрагування БАР з квіток, листя та трави осоту городнього.

Мета дослідження – розробка оптимальних параметрів процесу екстрагування БАР з квіток, листя та трави осоту городнього.

Матеріали та методи. Сировину квіток, листя, трави осоту городнього, яку використано для виготовлення екстрактів, було заготовлено в Київській області (Києво-Святошинський район) у 2014 році, у період вегетації рослини. Висушування сировини проводили за температури 25 °С повітряно-тіньовим методом.

Уміст суми гідроксикоричних кислот у досліджуваних екстрактах квіток, листя і трави осоту городнього визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту.

1,0 мл препарату вміщували в мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали 2,0 мл 0,5 М хлористоводневої кислоти, 2,0 мл розчину натрію нітриту та натрію молібдату й 1,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного. Доводили до позначки водою і перемішували (випробуваний розчин).

Вимірювали оптичну густину випробуваного розчину за довжини хвилі 505 нм у кюветі з товщиною шару 10,0 мм, використовуючи як компенсаційний розчин, аналогічний за складом досліджуваному, але без додавання розчину натрію нітриту та натрію молібдату.

Уміст суми флавоноїдів визначали методом диференційної спектрофотометрії в перерахунку на лютеолін.

1,0 мл препарату поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 5,0 мл 70 % спирту етилового, 5,0 мл 5 % розчину алюмінію хлориду в 70 % спирті етиловому, 2,0 мл 5 % розчину оцтової кислоти в 70 % спирті етиловому, доводили об'єм розчину 70 % спиртом етиловим до позначки та перемішували.

Через 30 хв вимірювали оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 408 нм у кюветі з товщиною шару 10,0 мм, використовуючи як компенсаційний розчин, що складається з 1,0 мл препарату, 5,0 мл 70 % спирту етилового і 2,0 мл 5 % розчину оцтової кислоти в 70 % спирті етиловому, які вміщені в мірну колбу місткістю 25 мл та доведені 70 % спиртом етиловим до позначки.

© Колектив авторів, 2015

Уміст поліфенольних сполук визначали спектрофотометричним методом.

1,0 мл препарату поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм водою до позначки та перемішували.

2,0 мл одержаного розчину поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву, 10,0 мл води, перемішували, доводили об'єм розчином натрію карбонату до позначки і перемішували (випробовуваний розчин).

Через 30 хв вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10,0 мм, використовуючи компенсаційний розчин, що складається з 12,0 мл води очищеної, 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву, які вміщували в мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм розчином натрію карбонату до позначки, перемішували та витримували протягом 30 хв.

Паралельно вимірювали оптичну густину розчину, що містить 2,0 мл розчину стандартного зразка пірогалолу, 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву, 10,0 мл води очищеної, які вміщували в мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм розчином натрію карбонату до позначки, перемішували й витримували протягом 30 хв (стандартний розчин).

Для вивчення впливу ступеня подрібнення рослинного матеріалу на вміст БАР у досліджуваних екстрактах, сировину подрібнювали та просіювали крізь сита з діаметром отворів 7, 5, 3, 2, 1, 0,5 і 0,16 мм.

З кожної фракції відбирали точну наважку сировини (1 г), вміщували в круглодонну колбу місткістю 25 мл, додавали 40 % етиловий спирт у співвідношенні сировина:екстрагент 1:25 і нагрівали на водяній бані за температури кипіння екстрагента зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Витяжку охолоджували, фільтрували, доводили 40 % етиловим спиртом до початкового об'єму та перемішували.

Для вибору оптимальних умов екстрагування як екстрагенти було використано воду очищену та водно-спиртові суміші з різним вмістом етанолу (20, 40, 50, 70, 90 і 96 %). Витяжки одержували за описаною вище методикою, використовуючи співвідношення сировини й екстрагента 1:25 та сировину зі ступенем подрібнення 2 мм.

Для встановлення оптимальних умов екстракції були використані такі співвідношення маси сировини й об'єму екстрагента: 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30. Екстракцію проводили, використовуючи як екстрагент 40 % етиловий спирт.

Для встановлення оптимального часу максимальної екстракції БАР із сировини листя, квіток і трави осоту городнього сировину екстрагували (співвідношення маси сировини й об'єму екстрагента – 1:25) протягом 15, 30, 45, 60 і 90 хв за наведеною вище методикою.

Для встановлення оптимальної кількості екстракцій сировини осоту городнього проводили1-4-разову екстракцію сировини 40 % етиловим спиртом (час екстракції – 30 хв, співвідношення сировина:екстрагент – 1:25).

Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента [11].

Результати та їх обговорення. Результати дослідження впливу ступеня подрібнення листя, квіток і трави осоту городнього на екстракцію БАР наведено в таблиці 1. Для всієї досліджуваної сировини осоту городнього найбільший вихід БАР спостерігали в разі використання сировини зі ступенем подрібнення 0,16–0,50 мм. Однак використання сировини зі ступенем подрібнення 0,16–0,50 мм технологічно ускладнене, оскільки викликає закупорювання фільтрів на етапі фільтрації екстрактів, тому доцільніше використовувати сировину з меншим ступенем подрібнення. Як свідчать дані таблиці 1, для квіток найоптимальнішим ступенем подрібнення сировини є фракція 0,5–2,0 мм, для листя – 0,5–1,0 мм, для трави – 2,0–3,0 мм.

Результати дослідження впливу концентрації розчинника на екстракцію БАР з надземної частини осоту городнього наведено в таблиці 2.

Таблиця 1

Залежність повноти екстракції біологічно активних речовин від ступеня подрібнення рослинної сировини надземної частини осоту городнього, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ (n = 5)

Сировина осоту городнього	Ступінь подрібнення сировини, мм	Уміст біологічно активних речовин, %					
		сума поліфенольних сполук		сума флавоноїдів		сума гідроксикоричних кислот	
		%	±	%	±	%	±
Квітки	0,16–0,50	1,35	0,037	1,01	0,029	1,74	0,040
	0,50–1,00	0,93	0,028	0,54	0,021	1,63	0,038
	1,00–2,00	0,88	0,043	0,58	0,024	1,51	0,033
	2,00–3,00	0,66	0,033	0,64	0,028	0,98	0,034
	3,00–5,00	0,62	0,025	0,54	0,025	0,86	0,043
	5,00–7,00	0,50	0,041	0,51	0,035	0,72	0,044
	> 7,00	0,46	0,027	0,44	0,020	0,66	0,028
Листя	0,16–0,50	1,43	0,085	0,25	0,015	0,90	0,031
	0,5–1,0	1,32	0,071	0,28	0,009	0,82	0,018
	1,00–2,00	0,94	0,074	0,17	0,016	0,55	0,019
	2,00–3,00	0,84	0,066	0,14	0,013	0,50	0,012
	3,00–5,00	0,76	0,049	0,12	0,014	0,47	0,026
	5,00–7,00	0,60	0,057	0,09	0,007	0,36	0,019
	> 7,00	0,53	0,035	0,10	0,014	0,33	0,013
Трава	0,16–0,50	1,04	0,024	0,99	0,036	2,07	0,031
	0,50–1,00	0,54	0,024	0,46	0,016	0,95	0,053
	1,00–2,00	0,55	0,026	0,58	0,032	0,86	0,038
	2,00–3,00	0,75	0,028	0,62	0,026	1,40	0,046
	3,00–5,00	0,67	0,025	0,54	0,032	1,33	0,041
	5,00–7,00	0,62	0,021	0,44	0,033	1,25	0,034
	> 7,00	0,47	0,019	0,38	0,027	0,70	0,041

Аналізуючи дані, наведені в таблиці 2, можна зробити висновок, що оптимальним екстрагентом, за допомогою якого досягається оптимальний вихід БАР з сировини квіток осоту городнього є 40 та 70 % етиловий спирт, для листя – 50 % етиловий спирт, для трави – 40 % етиловий спирт.

У таблиці 3 наведено результати вибору оптимального співвідношення маси рослинної сировини та об'єму екстрагента. Як зазначалося раніше, було виготолено екстракти на 40 % етиловому спирті в таких співвідношеннях (маса сировини й об'єм екстрагента): 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30.

Як свідчать дані, наведені в таблиці 3, оптимальним співвідношенням сировина й екстрагента у разі виготовлення досліджуваних екстрактів є: для сировини квіток та листя осоту городнього – 1:25, для трави – 1:20, оскільки подальше збільшення об'єму екстрагента не призводить до помітного збільшення виходу БАР у досліджувані екстракти.

Таблиця 2

Повнота екстракції біологічно активних речовин із сировини надземної частини осоту городнього залежно від концентрації екстрагента, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ (n = 5)

Сировина осоту городнього	Екстрагент	Уміст біологічно активних речовин, %					
		сума поліфенольних сполук		сума флавоноїдів		сума гідроксикоричних кислот	
		%	±	%	±	%	±
Квітки	Вода очищена	0,596	0,031	0,095	0,006	0,895	0,041
	20 % етанол	0,558	0,027	0,426	0,022	1,076	0,036
	40 % етанол	0,683	0,021	0,664	0,021	1,106	0,066
	50 % етанол	0,568	0,029	0,561	0,035	1,087	0,050
	70 % етанол	0,622	0,041	0,759	0,019	1,048	0,063
	90 % етанол	0,479	0,025	0,465	0,030	0,819	0,042
	95 % етанол	0,442	0,033	0,381	0,028	0,484	0,030
Листя	Вода очищена	1,094	0,023	0,067	0,006	0,547	0,024
	20 % етанол	1,106	0,026	0,305	0,007	0,835	0,025
	40 % етанол	1,319	0,027	0,436	0,010	0,949	0,018
	50 % етанол	1,376	0,026	0,531	0,011	1,056	0,019
	70 % етанол	1,120	0,025	0,441	0,017	0,963	0,029
	90 % етанол	0,637	0,024	0,192	0,014	0,347	0,020
	95 % етанол	0,477	0,030	0,135	0,008	0,161	0,013
Трава	Вода очищена	0,407	0,017	0,204	0,010	0,201	0,039
	20 % етанол	0,537	0,024	0,408	0,019	0,970	0,040
	40 % етанол	0,552	0,026	0,549	0,018	0,964	0,051
	50 % етанол	0,536	0,022	0,438	0,018	0,902	0,053
	70 % етанол	0,537	0,028	0,489	0,027	1,060	0,047
	90 % етанол	0,338	0,021	0,326	0,026	0,517	0,030
	95 % етанол	0,214	0,024	0,251	0,020	0,203	0,026

Результати досліджень щодо залежності вмісту БАР в екстрактах листя, квіток і трави осоту городнього від часу екстракції наведено в таблиці 4.

Екстракцію проводили 40 % етиловим спиртом протягом 15, 30, 45, 60 та 90 хв. Як свідчать дані, наведені в таблиці 4, повнота вилучення БАР з досліджуваної сировини досягається в разі екстракції протягом 45 та 60 хв. Подальше збільшення часу екстракції не призводить до суттєвого збільшення вмісту БАР в одержаних екстрактах.

Результати досліджень щодо вибору оптимальної кількості екстракцій наведено в таблиці 5. Згідно з отриманими даними, повнота екстракції зазначених БАР із сировини надземної частини осоту городнього при екстрагуванні 40 % етиловим спиртом досягається шляхом 2-разової екстракції.

Висновки

1. Розроблено науково обґрунтовані рекомендації щодо виготовлення водно-спиртових екстрактів з сировини надземної частини (квіток, листя, трави) осоту городнього з оптимальним вмістом БАР.
2. Результати проведених досліджень показали, що оптимальними умовами вилучення БАР з сировини квіток осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої

Таблиця 3

Залежність повноти екстракції біологічно активних речовин з сировини надземної частини осоту городнього від співвідношення між рослинною сировиною і екстрагентом, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ (n = 5)

Сировина осоту городнього	Екстрагент	Співвідношення між сировиною і екстрагентом	Уміст біологічно активних речовин, %					
			сума поліфенольних сполук		сума флавоноїдів		сума гідроксикоричних кислот	
			%	±	%	±	%	±
Квітки	40 % етанол	1:10	0,390	0,015	0,331	0,013	0,403	0,022
		1:15	0,559	0,018	0,466	0,019	0,750	0,032
		1:20	0,566	0,021	0,611	0,032	1,023	0,028
		1:25	0,839	0,014	0,632	0,025	1,078	0,070
		1:30	0,673	0,030	0,559	0,026	0,970	0,050
Листя	40 % етанол	1:10	1,037	0,029	0,239	0,008	0,583	0,013
		1:15	1,066	0,055	0,225	0,013	0,727	0,016
		1:20	1,390	0,079	0,322	0,011	0,864	0,019
		1:25	1,490	0,050	0,347	0,011	0,968	0,021
		1:30	1,438	0,053	0,328	0,015	1,002	0,025
Трава	40 % етанол	1:10	0,302	0,012	0,285	0,014	0,380	0,022
		1:15	0,371	0,017	0,351	0,027	0,438	0,030
		1:20	0,543	0,020	0,478	0,024	0,781	0,031
		1:25	0,544	0,015	0,524	0,034	0,785	0,059
		1:30	0,645	0,018	0,718	0,031	1,022	0,071

Таблиця 4

Вихід біологічно активних речовин із сировини надземної частини осоту городнього залежно від часу екстракції, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ (n = 5)

Сировина осоту городнього	Екстрагент	Час екстракції, хв	Уміст біологічно активних речовин, %					
			сума поліфенольних сполук		сума флавоноїдів		сума гідроксикоричних кислот	
			%	±	%	±	%	±
Квітки	40 % етанол	15	0,790	0,021	0,675	0,025	1,566	0,033
		30	0,672	0,015	0,572	0,024	1,665	0,028
		45	0,777	0,027	0,672	0,022	1,708	0,030
		60	0,844	0,025	0,673	0,029	1,982	0,038
		90	0,692	0,020	0,647	0,030	1,693	0,050
Листя	40 % етанол	15	1,231	0,064	0,253	0,012	1,039	0,017
		30	1,280	0,065	0,267	0,014	1,036	0,018
		45	1,169	0,045	0,291	0,013	1,002	0,012
		60	1,381	0,048	0,322	0,016	1,127	0,023
		90	0,646	0,053	0,181	0,017	0,511	0,023
Трава	40 % етанол	15	0,657	0,025	0,689	0,022	1,296	0,043
		30	0,736	0,020	0,697	0,018	1,180	0,032
		45	0,715	0,028	0,716	0,016	1,292	0,041
		60	0,764	0,023	0,715	0,029	1,321	0,034
		90	1,270	0,028	1,232	0,036	2,254	0,046

Таблиця 5

Вихід біологічно активних речовин із сировини надземної частини осоту городнього залежно від кількості екстракції, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ (n = 5)

Сировина осоту городнього	Екстрагент	Кількість екстракцій	Уміст біологічно активних речовин, %					
			сума поліфенольних сполук		сума флавоноїдів		сума гідроксикоричних кислот	
			%	±	%	±	%	±
Квітки	40 % етанол	I	0,572	0,018	0,397	0,033	1,042	0,031
		II	0,213	0,013	0,190	0,035	0,304	0,016
		III	0,128	0,011	0,052	0,029	0,163	0,019
		IV	0,048	0,007	0,013	0,033	0,065	0,003
Листя	40 % етанол	I	1,558	0,041	0,279	0,010	1,158	0,015
		II	0,549	0,024	0,103	0,010	0,696	0,018
		III	0,156	0,015	0,034	0,013	0,279	0,002
		IV	0,012	0,008	0,009	0,012	0,073	0,009
Трава	40 % етанол	I	0,806	0,020	0,704	0,026	1,930	0,036
		II	0,388	0,020	0,265	0,017	0,667	0,017
		III	0,199	0,008	0,148	0,029	0,239	0,008
		IV	0,096	0,009	0,023	0,017	0,051	0,007

до розміру 0,5–2,0 мм, 40 % або 70 % етиловим спиртом, протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:25.

3. Оптимальними умовами вилучення БАР з сировини листя осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої до розміру 0,5–2 мм, 50 % етиловим спиртом, протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:25.
4. Оптимальними умовами вилучення БАР з сировини трави осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої до розміру 2–3 мм, 40 % етиловим спиртом, протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:20.

1. *Лавренов В. К.* Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – Санкт-Петербург : Издательский дом «Нева», 2003. – 272 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae) / отв. ред. П. Д. Соколов. – Санкт-Петербург : Наука, 1993. – 351 с.
3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / [Відп. ред. Гродзінський А. М]. – Київ : Головна ред. УРЕ, 1989. – 544 с.
4. *Jie Y.* Antioxidant activity of flavonoids and their glucosides from Sonchus oleraceus L. / Y. Jie, C. Si, M. Wang // J. Appl. Biol. Chem. – 2008. – V. 51. – P. 57–60.
5. *Singh S.* Phytochemical investigation of Sonchus oleraceus leaves and Citrullus colocynth root / S. Singh // J. Herb. Med. Tox. – 2010. – V. 4. –P. 159–162.
6. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (Sonchus spp.) in China / Xia Dao-Zong, Yu Xin-Fen, Zhu Zhuo-Ying, Zhuang-Dan Zou // Natural Product Research. – 2011. – V. 25. – P. 1893–1901.
7. Anti-inflammatory and antipyretic effects of Sonchus oleraceus in rats / Vilela F. C., Bitencourt A. D., Cabral L. D. [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2010. – V. 127. – P. 737–741.
8. Antihyperglycemic effect of crude extracts of some Egyptian plants and algae. / Abouzid S. F., Ahmed O. M., Ahmed R. R. [et al.] // J. Med. Food. – 2014. – V. 17. – P. 400–406.
9. Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in Sonchus oleraceus L. leaf extracts. / Ou Z. Q., Schmierer D. M., Rades T. [et. al.] // J. Pharm. Pharmacol. – 2013. – V. 65. – P. 271–279.

10. Antioxidant activity of puha (Sonchus oleraceus L.) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay / McDowell A., Thompson S., Stark M. [et al.] // Phytotherapy Research. – 2011. – V. 25. – P. 1876–1882.
11. *Лапач С. Н*. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н Лапач. А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : «Морион», 2000. – 320 с.

О. О. Цуркан, Є. П. Делян

Визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин з сировини осоту городнього (*Sonchus Oleraceus L.*)

Проведено дослідження з визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин (БАР) з сировини квіток, листя та трави осоту городнього. Для вибору оптимальних умов екстракції як екстрагенти використовували воду очищену та водно-спиртові суміші з різним вмістом етанолу (20, 40, 50, 70, 90 і 96 %). Для вивчення впливу ступеня подрібнення рослинного матеріалу на вміст БАР у досліджуваних екстрактах сировину подрібнювали та просіювали крізь сита з діаметром отворів 7, 5, 3, 2, 1, 0,5 та 0,16 мм. Для встановлення оптимальних умов екстракції були використані наступні співвідношення маси сировини та об'єму екстрагента: 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30. Для встановлення оптимального часу максимальної екстракції БАР з сировини листя, квіток та трави осоту городнього сировину екстрагували протягом 15, 30, 45, 60 та 90 хв. Для встановлення оптимальної кількості екстракцій сировини осоту городнього проводили 1–4-разову екстракцію досліджуваної сировини. Уміст суми флавоноїдів (у перерахунку на лютеолін), поліфенольних сполук (у перерахунку на пірогалол) та гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту) визначали спектрофотометричним методом.

Результати проведених досліджень показали, що оптимальними умовами вилучення БАР з рослинної сировини квіток осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої до розміру 0,5–2,0 мм, 40 або 70 % етиловим спиртом протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:25.

Оптимальними умовами вилучення БАР з сировини листя осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої до розміру 0,5–2,0 мм, 50 % етиловим спиртом протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:25.

Оптимальними умовами вилучення БАР з рослинної сировини трави осоту городнього є 2-разова екстракція сировини, подрібненої до розміру 2,0–3,0 мм, 40 % етиловим спиртом, протягом 60 хв при співвідношенні сировини й екстрагента – 1:20.

Ключові слова: екстракція, поліфеноли, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, осот городній

А. А. Цуркан, Е. П. Делян

Определение оптимальных условий экстракции биологически активных веществ из сырья осота огородного (*Sonchus Oleraceus L.*)

Проведены исследования по определению оптимальных условий экстракции биологически активных веществ (БАВ) из сырья цветов, листьев и травы осота огородного. Для выбора оптимальных условий как экстрагенты использовали воду очищенную и водно-спиртовые смеси с различным содержанием этанола (20, 40, 50, 70, 90 и 96 %). Для изучения влияния степени измельчения растительного материала на содержание БАВ в исследуемых экстрактах, сырье измельчали и просеивали сквозь сита с диаметром отверстий 7, 5, 3, 2, 1, 0,5 и 0,16 мм. Для установления оптимальных условий экстракции были использованы следующие соотношения массы сырья и объема экстрагента 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30. Для установления оптимального времени максимальной экстракции БАВ из сырья листьев, цветов и травы осота огородного сырье экстрагировали в течение 15, 30, 45, 60 и 90 мин. Для установления оптимальной кратности экстракций сырья осота огородного проводили 1–4-кратную экстракцию исследуемого сырья. Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин), полифенольных соединений (в пересчете на пирогалол) и гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту) определяли спектрофотометрическим методом.

Результаты проведенных исследований показали, что оптимальными условиями извлечения БАВ из цветов осота огородного является 2-кратная экстракция сырья, измельченного до размера 0,5–2,0 мм, 40 % или 70 % этиловым спиртом в течение 60 мин при соотношении сырья и экстрагента – 1:25.

Оптимальными условиями извлечения БАВ из листьев осота огородного является 2-кратная экстракция сырья, измельченного до размера 0,5–2,0 мм, 50 % этиловым спиртом, в течение 60 мин при соотношении сырья и экстрагента – 1:25.

Оптимальными условиями извлечения БАВ из травы осота огородного является 2-кратная экстракция сырья, измельченного до размера 2,0–3,0 мм, 40 % этиловым спиртом в течение 60 мин при соотношении сырья и экстрагента – 1:20.

Ключевые слова: экстракция, полифенолы, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, осот огородный

A. A. Tsurkan, E. P. Delyan

Determination of optimal conditions for extraction of biologically active substances from raw thistle garden (*Sonchus Oleraceus L.*)

This work is aimed to determine optimal conditions for extraction of biologically active substances (BAS) from the raw materials of flowers, leaves and grass *Sonchus oleraceus*. To select the optimum extraction conditions as extractants used purified water and water-alcohol mixtures with a different content of ethanol (20, 40, 50, 70, 90 and 96 %). To study the influence of the degree of grinding of the plant material to the content of BAS in the test extracts, raw milled and sieved through a sieve having meshes of 7, 5, 3, 2, 1, 0.5 and 0,16 mm. To determine the optimum extraction conditions have been used the following materials and weight ratio of the volume of extractant 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30.

To determine the optimal time of maximum extraction of bioactive substances from the raw leaves, flowers and grass Sonchus oleraceus feedstock extracted for 15, 30, 45, 60 and 90 min. In order to establish the optimal extraction of raw materials multiplicity Sonchus oleraceus extraction was performed four times the test material. Total flavonoid content, expressed as luteolin content of polyphenolic compounds and the hydroxycinnamic acid content, based on the chlorogenic acid was determined spectrophotometrically.

The data obtained suggest that the optimal conditions for extraction of BAS from plant's flowers is a two-time extraction of raw material crushed to the size of 0,5–2,0 mm, by 40 % or 70 % ethanol for 60 min at a ratio of raw materials:extractant – 1:25.

The optimum condition for extraction of BAS from leaves Sonchus Oleraceus is 2-fold extraction of raw material, crushed to size of 0,5–2,0 mm by 50 % ethanol for 60 min at a ratio of raw material:extractant – 1:25.

The optimum conditions for extraction of BAS from vegetable raw herbs Sonchus Oleraceus is 2-fold extraction of raw material crushed to size of 2,0–3,0 mm by 40 % ethanol for 60 min at a ratio of raw material:extractant – 1:20.

Key words: Sonchus Oleraceus L., extraction, polyphenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids

Надійшла: 02.02.2015 р.

Контактна особа: Делян Є. П., провідний інженер, Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 277 41 18. Електронна пошта: evgenuydep@gmail.com

УДК 615.011:615.276:543.422.3-74

Н. О. Ветютнева[1], М. В. Римар[1], В. М. Мінарченко[2],
Н. А. Марусенко[1], Ш. А. Макіян[1]

Дослідження твердих дисперсних систем мелоксикаму з високомолекулярними сполуками методами електронної мікроскопії та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області

[1]Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ
[2]Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, м. Київ

Ключові слова: мелоксикам, тверда дисперсна система, Колідон 25, β-циклодекстрин, поліетиленгліколь 6000, ІЧ-спектроскопія, електронна мікроскопія, міжмолекулярна взаємодія

Сьогодні лікарські засоби у вигляді твердих дозованих лікарських форм широко застосовуються в медичній практиці. Однією з основних характеристик таких лікарських форм є розчинність активного фармацевтичного інгредієнта, яка зумовлює терапевтичну ефективність, безпечність та дозування лікарських засобів. Існує багато методів модифікації розчинності фармацевтичних субстанцій, проте широкого застосування набув метод отримання твердих дисперсних систем (ТДС) [1, 2] на основі високомолекулярних сполук, серед яких особливе місце займають полівінілпіролідони (ПВП), поліетиленгліколь (ПЕГ) різних молекулярних мас та циклодекстрини (ЦД) [3–5].

Серед представників групи нестероїдних протизапальних засобів мелоксикам, 4-гідрокси-2-метил-N-(5-метил-1,3-тіазол-2-іл)-2H-1,2-бензотіазин-3-карбоксамід-1,1-діоксид пропанова кислота – є одним з найчастіше використовуваних препаратів, що зумовлено його знеболювальною та протизапальною дією. За біофармацевтичною класифікаційною системою (БФКС) мелоксикам відноситься до 2 класу (низька розчинність/висока проникність), тому вирішення проблеми модифікації розчинності субстанцій для фармацевтичного застосування, що відносяться за БФСК до 2 та 4 класу, є важливим завданням сучасної науки, яке розширить можливості створення сучасних лікарських засобів [6].

Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ) є одним із сучасних методів дослідження властивостей твердих речовин, у тому числі субстанцій для фармацевтичного застосування, а також ТДС на їхній основі. До параметрів, які дозволяє вивчити СЕМ, відносяться кристалічність або аморфність стану речовини, однорідність, розмір та форма частинок [7, 8]. Основним методом вивчення механізмів взаємодії сполук є абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області, що дозволяє виявити природу зв'язків та зміни в структурі при утворенні нових сполук і комплексів [9, 10]. Саме поєднання цих методів стало сучасною методологією дослідження ефективності методів модифікації розчинності та механізмів взаємодії фармацевтичних субстанцій з іншими сполуками.

Мета дослідження – вивчити механізми взаємодії мелоксикаму в ТДС з β-циклодекстрином, ПЕГ 6000, Колідоном 25 (К-25) за допомогою методів скануючої електронної мікроскопії та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області.

Матеріали та методи. У дослідженнях використовували субстанцію мелоксикаму, що відповідала вимогам МКЯ виробника. ПЕГ 6000 (Sigma, Німеччина), Колідон 25 (BASF, Німеччина), β-циклодекстрин (ISP, Швейцарія) відповідали вимогам нормативно-технічних документів. ТДС мелоксикаму з ПЕГ, ПВП, β-ЦД були приготовані

© Колектив авторів, 2015

методом співосадження в співвідношенні мелоксикам – носій 1:2. Фізичні суміші мелоксикаму готували змішуванням у тих самих пропорціях, що й ТДС.

Скануючу електронну мікроскопію проводили з використанням скануючого електронного мікроскопа JSM 6060 LA, Jeol, Японія. Зразки субстанції, носіїв (ПЕГ, ПВП, β-ЦД) і твердих дисперсних систем фіксували на алюмінієвих столиках за допомогою двосторонньої клейкої стрічки, й на них наносили тонкий шар золота (20 нм). Дослідження проводили з використанням параметрів – напруга 30 кВ, робоча відстань (12–14 мм).

ІЧ-спектри досліджуваних зразків були отримані за допомогою ІЧ-спектрофотометра Specord-75 (Німеччина). Зразки були приготовані у вигляді таблеток KBr.

Результати та їх обговорення. *Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ).* СЕМ субстанції мелоксикаму являє собою частинки неправильної форми розміром 20–50 мкм, Колідон 25 – частинки округлої форми розмірами 50–90 мкм з нерівномірно розташованими на їхній поверхні заглибленнями. ПЕГ 6000 та β-ЦД представлені кристалічними агломератами різної форми, розмір частинок – 40–80 мкм та 20–60 мкм відповідно (рис. 1).

У зразках фізичних сумішей спостерігали розташування частинок субстанції мелоксикаму на поверхні носіїв, які утворюють «підложку», що можна пояснити фізичними властивостями носіїв – високою аморфністю β-ЦД та пластичністю ПЕГ (рис. 2). Тобто у фізичних сумішах мелоксикам і носії зберігають свою структуру та не взаємодіють між собою.

У роботі [11] методами комп'ютерного моделювання спрогнозовано утворення в ТДС комплексів між мелоксикамом та ПЕГ 6000, К-25, β-ЦД. СЕМ твердої дисперсної системи з ПЕГ 6000 представляє собою твердий розчин, про що свідчить відсутність окремих частинок фармацевтичної субстанції (рис. 3). ТДС з β-ЦД перебуває у вигляді округлих частинок розміром 1–5 мкм, що не є характерним для СЕМ субстанції та носія. ТДС з К-25 представлена частинками неправильної форми розміром 20–60 мкм і відрізняється як від частинок мелоксикаму, так і від частинок полімеру. Усі ТДС є частинками з характерними відмінностями від субстанції та носія, що свідчить про взаємодію між компонентами системи.

Абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області. Взаємодія між фармацевтичною субстанцією та носієм призводить до змін в ІЧ-спектрах речовин. ІЧ-спектр мелоксикаму характеризується смугами поглинання при 3288 $см^{-1}$ (валентні коливання N-H), 3091 $см^{-1}$ (валентні коливання C-H, ароматичні), 1608 $см^{-1}$ (валентні коливання NH_2), 1536 $см^{-1}$ (валентні коливання C=N) і

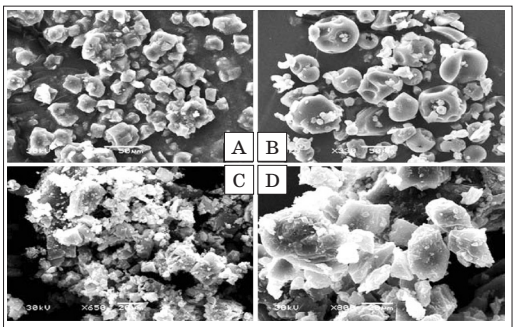


Рис. 1. Скануюча електронна мікроскопія: А – мелоксикаму (× 200), В – Колідону 25 (× 330), С – β-ЦД (× 650), D – ПЕГ 6000 (× 800)

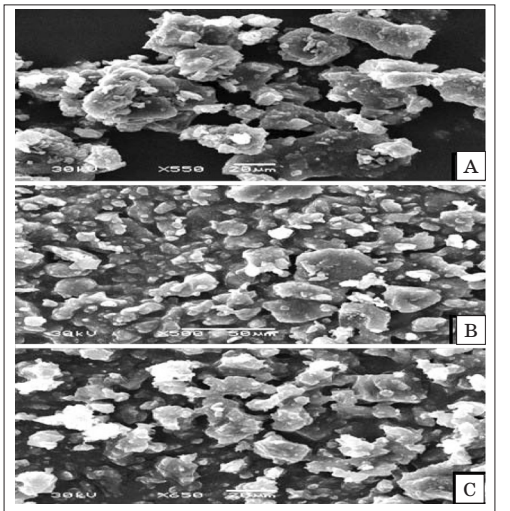


Рис. 2. Скануюча електронна мікроскопія фізичних сумішей мелоксикаму: А – з ПЕГ 6000 (× 550), В – з Колідоном 25 (× 500), С – з β-ЦД (× 650)

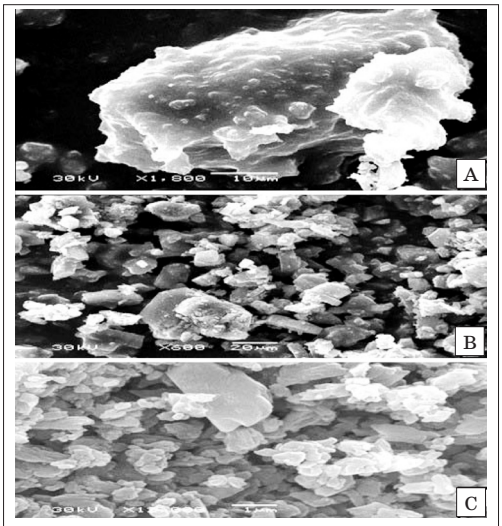


Рис. 3. Скануюча електронна мікроскопія твердих дисперсних систем мелоксикаму: А – з ПЕГ 6000 (× 2700), В – з Колідоном 25 (× 1800), С – з β-ЦД (× 3500)

1150 см$^{-1}$ (валентні коливання S=O). ІЧ-спектр ПЕГ 6000 характеризується смугами поглинання при 3448 см$^{-1}$ (валентні коливання OH), 2890 см$^{-1}$ (валентні коливання C-H), 1100 см$^{-1}$ (валентні коливання C-O-H). ІЧ-спектр фізичної суміші є аналогічним окремим спектрам мелоксикаму та носія, що свідчить про відсутність взаємодії між компонентами. У ІЧ-спектрі ТДС спостерігається значне зниження інтенсивності смуг поглинання, які відповідають коливанням NH (3286 см$^{-1}$ і 1620 см$^{-1}$), що підтверджує утворення водневих зв'язків (рис. 4).

ІЧ-спектр К-25 характеризується вираженою смугою поглинання при 1672 см$^{-1}$ (валентні коливання C=O), 1287 см$^{-1}$ (валентні коливання C-N), 2896 см$^{-1}$ та 1460 см$^{-1}$ (валентні та деформаційні коливання C-H, відповідно), 3480 см$^{-1}$ (валентні коливання OH). У фізичній суміші взаємодії між мелоксикамом та К-25 не відбувається, що відображає її ІЧ-спектр, у той час як в ІЧ-спектрі ТДС спостерігали зниження інтенсивності смуг поглинання, що відповідають аміногрупам мелоксикаму, крім того, значно знижена інтенсивність смуг поглинання при 1672 см$^{-1}$, 2896 см$^{-1}$ та 3480 см$^{-1}$, що свідчить про утворення міжмолекулярних водневих зв'язків між субстанцією та носієм (рис. 5).

Для ІЧ-спектру β-ЦД характерні смуги поглинання при 3388 см$^{-1}$ (валентні коливання OH), 2924 см$^{-1}$ (валентні коливання C-H), 1028 см$^{-1}$ (деформаційні коливання C-O-C). ІЧ-спектр фізичної суміші повторює ІЧ-спектри мелоксикаму та β-ЦД. В ІЧ-спектрі ТДС спостерігали зниження інтенсивності смуг поглинання при 3288 см$^{-1}$ та при 1608 см$^{-1}$, причому при 1608 см$^{-1}$ спостерігали значне зниження інтенсивності поглинання, внаслідок чого вона злилася зі смугою поглинання при 1536 см$^{-1}$. Також видно зниження інтенсивності поглинання в області 3000–3500 см$^{-1}$, що відповідає валентним коливанням C-H молекули β-ЦД. Вище зазначені зміни в ІЧ-спектрі ТДС мелоксикам-β-ЦД свідчать про утворення водневих зв'язків та можливість утворення комплексу включення, враховуючи просторову структуру β-ЦД (рис. 6).

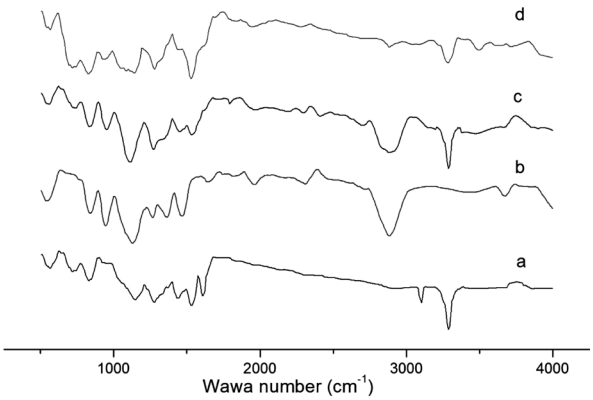


Рис. 4. ІЧ-спектри: a – мелоксикаму, b – ПЕГ 6000, c – фізичної суміші мелоксикам – ПЕГ 6000, d – ТДС мелоксикам – ПЕГ 6000

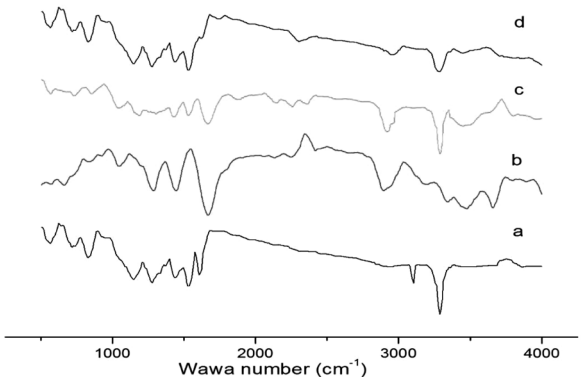


Рис. 5. ІЧ-спектри: a – мелоксикаму, b – К 25, c – фізичної суміші мелоксикам – К-25, d – ТДС мелоксикам – К-25

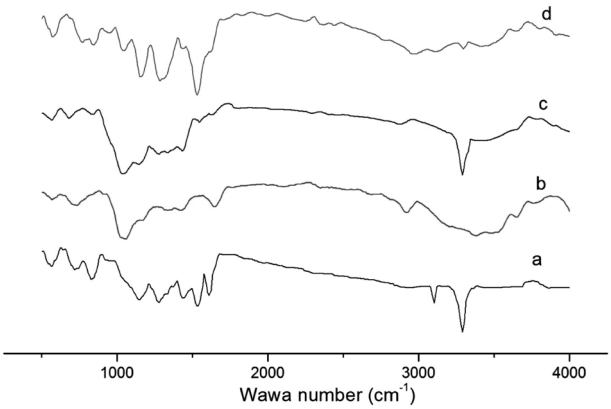


Рис. 6. ІЧ-спектри: a – мелоксикаму, b – β-ЦД, c – фізичної суміші мелоксикам – β-ЦД, d – ТДС мелоксикам – β-ЦД

Висновки

Сучасним методом модифікації властивостей активних фармацевтичних інгредієнтів є отримання твердих дисперсних систем з високомолекулярними сполуками (ПЕГ, ПВП) та циклодекстринами.

За допомогою скануючої електронної мікроскопії встановлено, що в ТДС мелоксикаму з ПЕГ 6000 відбувається утворення твердого розчину, а в ТДС з К-25 та β-ЦД утворюються частинки, які за формою та розмірами значно відрізняються від чистої субстанції та носіїв. Характерні зміни на СЕМ свідчать про взаємодію між компонентами системи та підвищення розчинності субстанції мелоксикаму.

За допомогою абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області встановлено утворення водневих зв'язків між мелоксикамом та полімерами в ТДС.

Отримання ТДС мелоксикаму методом співосадження з використанням як носіїв К-25, β-ЦД та ПЕГ 6000 є перспективним для створення сучасних лікарських засобів.

1. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods / Fernando F., Josimar O., Carmen M. [et al.] // Powder Technology. – 2013. – № 235.– P. 532–539.
2. Formulation and delivery of improved amorphous fenofibrate solid dispersions prepared by thin film freezing / M. Zhang, H. Li, B. Lang [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – V. 82 (2012). – P. 534–544.
3. Preparation and evaluation of meloxicam solid dispersion by melting method / A. Adham Issa, D. Marchidan, V. Cojocaru, V. Anuța // Farmacia. – 2013. – V. 61. – P. 1213–1232.

4. Optimizing the ability of PVP/PEG mixtures to be used as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt mixing technique using artificial neural networks: I / Sofia A. Papadimitriou, Panagiotis Barmpalexis, Evangelos Karavas, Dimitrios N. Bikiaris // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2012. – № 82. – P. 175–186.
5. *Saquib Hasnain M.* Solubility and dissolution enhancement of ibuprofen by solid dispersion technique using peg 6000-pvp k 30 combination carrier / M. Saquib Hasnain, Amit Kumar Nayak // Bulgarian Journal of Science Education. – 2012. – V. 21, № 1,– P. 118–132.
6. *Головенко М. Я.* Біофармацевтична класифікаційна система / М. Я. Головенко, О. П. Баула, І. Ю. Борисюк. – Київ, 2010.– 300 с.
7. *Rossmanna M.* Supercritical antisolvent micronization of PVP and ibuprofen sodium towards tailored solid dispersions / M. Rossmanna, A. Braeuer // J. of Supercritical Fluids. – 2014. – № 89. – P. 16–27.
8. *Saritha A.* Enhancement of Dissolution and Anti- inflammatory activity of meloxicam by spherical agglomeration technique / Alladi Saritha, Nalini Shastri, Sadanandam, Anantha lakshmi // J. Pharm. Sci. & Res. – 2012. – V. 4 (1). – P. 1657–1661.
9. *Barzegar-Jalali M.* Development and characterization of solid dispersion of piroxicam for improvement of dissolution rate using hydrophilic carriers / M. Barzegar-Jalali, S. Ghanbarzadeh // BioImpacts, – 2014. – V. 4 (3). – P. 141–148.
10. Analysis of co-spray-dried meloxicam–mannitol systems containing crystalline microcomposites / A. Pomazi, R. Ambrus, P.r Sipos, P. Szabo-Revesz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2011. – № 56. – P. 183–190.
11. *Ветютнева Н. А.* Сравнительное исследование механизмов взаимодействия нимесулида, мелоксикама и ибупрофена с β-циклодекстрином, поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем полуэмпирических методами квантовой химии / Ветютнева Н. А., Рымар М. В., Марусенко Н. А. // Научный информационно-аналитический журнал «Фармация Казахстана». – 2014. – № 7. – С. 44–47.

Н. О. Ветютнева, М. В. Римар, В. М. Мінарченко, Н. А. Марусенко, Ш. А. Макіян

Дослідження твердих дисперсних систем мелоксикаму з високомолекулярними сполуками методами електронної мікроскопії та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області

Мелоксикам – нестероїдний протизапальний засіб, що широко використовується в медичній практиці та характеризується низькою розчинністю. Одним з методів модифікації розчинності фармацевтичних субстанцій є отримання твердих дисперсних систем на основі високомолекулярних сполук.

Мета дослідження – вивчити механізми взаємодії мелоксикаму в твердих дисперсних системах з β-циклодекстрином, поліетиленгліколем 6000, Колідоном 25 за допомогою методів скануючої електронної мікроскопії та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області.

Методи дослідження – скануюча електронна мікроскопія, абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області.

Фізичні суміші на зображеннях, отриманих за допомогою скануючої електронної мікроскопії, характеризуються частинками субстанції мелоксикаму на поверхні носія. Скануюча електронна мікроскопія твердої дисперсної системи мелоксикаму з поліетиленгліколем 6000 свідчить про утворення твердого розчину, а в твердих дисперсних системах з β-циклодекстрином та Колідоном 25 утворюються частинки, за розміром та формою відмінні від чистої субстанції та носіїв. ІЧ-спектри фізичних сумішей аналогічні спектрам мелоксикаму та носіїв. У ІЧ-спектрах твердих дисперсних систем спостерігається зниження інтенсивності смуг поглинання, що відповідають коливанням аміногруп мелоксикаму, які беруть участь в утворенні міжмолекулярних водневих зв'язків.

Проведене дослідження за допомогою скануючої електронної мікроскопії показало зміну кристалічного стану субстанції мелоксикаму та носіїв, у той час як у фізичних сумішах мелоксикам та носії зберігають свою структуру. У ІЧ-спектрах твердих дисперсних систем спостерігали зменшення інтенсивності відповідних смуг поглинання, що свідчить про утворення водневих зв'язків між мелоксикамом і полімерами.

Ключові слова: мелоксикам, тверда дисперсна система, Колідон 25, β-циклодекстрин, поліетиленгліколь 6000, ІЧ-спектроскопія, електронна мікроскопія, міжмолекулярна взаємодія

Н. А. Ветютнева, М. В. Рымар, В. Н. Минарченко, Н. А. Марусенко, Ш. А. Макиян

Исследование твердых дисперсных систем мелоксикама с высокомолекулярными соединениями методами электронной микроскопии и абсорбционной спектрофотометрии в ИК-области

Мелоксикам – нестероидный противовоспалительный препарат, который широко используется в медицинской практике и характеризуется низкой растворимостью. Одним из методов модификации растворимости фармацевтических субстанций является получение твердых дисперсных систем на основе высокомолекулярных соединений.

Цель исследования – изучить механизмы взаимодействия мелоксикама в твердых дисперсных системах с β-циклодекстрином, полиэтиленгликолем 6000, Колидоном 25 с помощью методов сканирующей электронной микроскопии и абсорбционной спектрофотометрии в ИК-области.

Методы исследования – сканирующая электронная микроскопия, абсорбционная спектрофотометрия в ИК-области.

Физические смеси на изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, характеризуются частицами субстанции мелоксикама на поверхности носителя. Сканирующая электронная микроскопия твердой дисперсной системы мелоксикама с полиэтиленгликолем 6000 свидетельствует об образовании твердого раствора, а в твердых дисперсных системах с β-циклодекстрином и Колидоном 25 образуются частицы, которые по размеру и форме отличаются от чистой субстанции и носителей. ИК-спектры физических смесей аналогичны спектрам мелоксикама и носителей. В ИК-спектрах твердых дисперсных систем наблюдается снижение интенсивности полос поглощения, соответствующих колебаниям аминогрупп мелоксикама, участвующих в образовании межмолекулярных водородных связей.

Проведенное исследование с помощью сканирующей электронной микроскопии показало изменение кристаллического состояния субстанции мелоксикама и носителей, в то время как в физических смесях мелоксикам и носители сохраняют свою структуру. В ИК-спектрах твердых дисперсных систем наблюдается уменьшение интенсивности соответствующих полос поглощения, что свидетельствует об образовании водородных связей между мелоксикамом и полимерами.

Ключевые слова: мелоксикам, твердая дисперсная система, Колидон 25, β-циклодекстрин, полиэтиленгликоль 6000, ИК-спектроскопия, электронная микроскопия, межмолекулярное взаимодействие

N. A. Vetiutneva, M. V. Rymar, V. N. Minarchenko, N. A. Marusenko, S. A. Makiyan

Research of meloxicam solid dispersions with macromolecular compounds by electron microscopy method and absorption spectrophotometry in IR-region

Meloxicam is non-steroidal anti-inflammatory drug that is widely used in medical practice and characterized by low solubility. One of solubility modifying method for pharmaceutical substances is preparation of solid dispersions based on macromolecular compounds.

The purpose of the study is to explore the mechanisms of interaction of meloxicam in solid dispersions with β-cyclodextrin, polyethylene glycol 6000, Kolidon 25 using the methods of scanning electron microscopy and absorption spectrophotometry in IR-region.

Research methods – scanning electron microscopy, absorption spectroscopy in the IR-region.

The physical mixture on the pictures obtained by scanning electron microscopy, characterized particles of meloxicam on the surface of the carrier. Scanning electron microscopy of the solid dispersion of meloxicam with polyethylene glycol 6000 showed the formation of a solid solution. In solid dispersions with β-cyclodextrin and Kolidon 25 formed particles that have different size and shape from pure substances and carriers. IR spectra of physical mixtures are similar to spectra of meloxicam and carriers. In the IR spectra of solid dispersions decreased the intensity of the absorption bands that corresponding to stratching of amino groups of meloxicam involved in the formation of intermolecular hydrogen bonds.

Study with scanning electron microscopy has showed changes in crystalline state of substance meloxicam and carriers, while in physical mixtures meloxicam and carriers save their structure. In the IR spectra of solid dispersions the intensity of the respective absorption bands decreased that indicates the formation of hydrogen bonds between meloxicam and polymers.

Key words: meloxicam, solid dispersion, Kolidon 25, β-cyclodextrin, polyethylene glycol 6000, IR spectroscopy, electron microscopy, molecular interaction

Надійшла: 12.05.2015 р.

Контактна особа: Римар М. В., аспірант, кафедра контролю якості і стандартизації лікарських засобів, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. буд. 9, вул. Дорогожицька, м. Київ, 04112. Тел.: + 38 0 96 948 22 74. Електронна пошта: maximon1@list.ru

Светлой памяти выдающегося ученого-токсиколога профессора Брониславы Самойловны Бравер-Чернобульской

Администрация ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины» и Ассоциация фармакологов Украины с глубоким прискорбием сообщают, что 20 мая 2015 года на 90 году ушла из жизни выдающийся отечественный ученый-токсиколог, многолетний сотрудник Института – руководитель лаборатории, впоследствии отдела экспериментальной терапии доктор медицинских наук, профессор Бронислава Самойловна Бравер-Чернобульская.

Б. С. Бравер-Чернобульская родилась 1 июля 1925 года в Житомире в семье врачей – отец врач-бактериолог, мать – врач-педиатр. Атмосфера семьи, ее аура способствовали выбору Брониславой Самойловной специальности врача. После окончания средней школы в 1941 году в г. Житомире она была эвакуирована в Узбекскую ССР и в 1942 году поступила на лечебный факультет Сталинабадского (Душанбинского) медицинского института, где окончила 3 курса. В связи с реэвакуацией в 1945 году была переведена на 4 курс Киевского медицинского института, после окончания которого с отличием в 1947 году была рекомендована Ученым Советом на научную работу.

Начиная с 1947 года, когда Бронислава Самойловна по конкурсу поступила в аспирантуру Украинского научно-исследовательского санитарно-химического института (ныне ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины»), вся ее жизнь была неразрывно связана с этим учреждением. Работая в Институте в течение 47 лет, Бронислава Самойловна прошла все этапы развития как научный сотрудник – от аспиранта до профессора, руководителя лаборатории.

Являясь аспирантом академика А. И. Черкеса и выполняя исследования под его руководством, а впоследствии докторантом, Бронислава Самойловна проявила большой интерес к науке, незаурядные способности, умение глубоко понимать, анализировать возникающие научные проблемы и полученные результаты, четко предвидеть перспективу проводимой работы. В 1952 году Бронислава Самойловна успешно защитила кандидатскую, а в 1971 – докторскую диссертации по специальности «токсикология».

С 1971 года Бронислава Самойловна заведовала лабораторией Института, продолжая с коллективом сотрудников актуальные исследования в области токсикологии. Основные направления

научно-исследовательской работы Брониславы Самойловны были посвящены изучению механизма действия химических веществ и на этой основе разработке принципов профилактики и терапии интоксикаций, в том числе изучению мембранотоксического действия отдельных групп химических соединений и определению возможностей направленного влияния на эти процессы с целью разработки принципиально новых подходов к профилактике и терапии интоксикаций. Большое внимание было уделено установлению закономерностей и особенностей связывания ксенобиотиков в процессе их транспорта, роли эндогенных ФАВ (лейкотриенов, простагландинов) в процессах детоксикации; разработке принципов и методов определения токсических агентов в биологических средах и методов диагностики отравлений.

В 1940–1950 годы Б. С. Бравер-Чернобульская разрабатывала вопросы токсикологии ксенобиотиков класса фторпроизводных уксусной кислоты с выраженной видовой чувствительностью и характерным влиянием на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы.

Большая группа исследований посвящена установлению антидотно-лечебных свойств созданного в Институте препарата Унитиол при отравлениях тиоловыми ядами (ртутью, кобальтом, кадмием, никелем, хромом). Проведенные исследования доказали, что Унитиол не только предотвращает гибель, но и нормализует функциональное состояние различных органов и систем (при отравлении ртутью – функцию почек, при кобальтовой интоксикации – состояние кроветворной системы, при отравлении кадмием – состояние сердечно-сосудистой системы).

Эти исследования составляют золотой фонд отечественной фармакологии и токсикологии.

С конца 1950-х годов исследования Б. С. Бравер-Чернобульской и ее сотрудников были посвящены поиску средств лечения отравлений алкилирующими соединениями, а также соединениями платины, применяемыми в качестве противоопухолевых средств. Биологической оценке были подвергнуты меркаптосоединения жирного, жирноароматического и гетероциклического ряда, меркаптопроизводные фталимида, сульфата натрия, меркаптобензойной кислоты, изотиуроневые соли жирноароматического и ароматического рядов, галловые производные, аминотиолы, производные пиридина и пиримидина. Основное внимание было уделено средствам, наиболее близким по структуре к основной «мишени» токсического действия алкилирующих соединений – нуклеиновым кислотам. Было установлено, что использование нуклеината натрия не только снижало токсичность ксенобиотиков, но и оказывало благоприятное влияние на кроветворение, иммунную систему, состояние обменных процессов. Под руководством Б. С. Бравер-Чернобульской были проведены фундаментальные исследования по изучению закономерностей транспорта и токсикодинамики алкилирующих соединений. Было установлено, что эти ксенобиотики непосредственно связываются с М-холино- и α-адренорецепторами, непосредственно алкилируют фосфоинозитид и снижают выход лейкотриенов. В ходе исследований, проведенных под руководством Б. С. Бравер-Чернобульской, было показано, что мембранотропный эффект проявляется алкилированием фосфатных групп липидов в составе мембранных структур, изменением физико-химических характеристик глубинных участков липидного бислоя, нарушением конформации белков и алкилированием их нуклеофильных центров, нарушением липид-белковых взаимоотношений, что приводит к изменению структуры липидно-белковых комплексов.

Изучение тиолового статуса при введении алкилирующих соединений дало возможность обосновать целесообразность использования препаратов с активными сульфидгидрильными группами (ацетилцистеин, меркаптопроизводные пиримидина) в комплексной терапии отравлений подобными агентами.

Брониславой Самойловной было сформулировано и активно развивалось

новое научное направление, касающееся иммунологических исследований, с целью создания принципиально новых подходов и методов диагностики отравлений различными ксенобиотиками, целенаправленного создания оригинальных антидотов при отравлении этими соединениями, в частности, тяжелыми металлами. Результаты исследований Б. С. Бравер-Чернобульской нашли отражение более чем в 165 научных публикациях (3 монографии, 14 авторских свидетельств, методические рекомендации, наставления).

Научную деятельность Бронислава Самойловна гармонично сочетала с работой в Государственном фармакологическом центре МЗ Украины с момента его образования. Она является соавтором регуляторных документов, регламентировавших экспертную деятельность Центра на первых этапах становления системы экспертизы и регистрации лекарственных средств в Украине.

Бронислава Самойловна принимала участие в ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС.

Как выдающийся ученый-токсиколог Бронислава Самойловна внесла большой вклад в отечественную токсикологию и фармакологию. Ее отличали высокий профессионализм, мастерство экспериментатора, энергичность и доброжелательность, светлый ум, логика, умение видеть главное в проблеме и находить решение трудных вопросов, широкий спектр научных интересов, эрудиция и такие прекрасные качества, как порядочность и интеллигентность.

Бронислава Самойловна обладала бесценным даром – даром Учителя, – Учителя с большой буквы. Она была открыта всем, кто хотел знать и уметь. Ее отличали исключительная доброжелательность, душевная щедрость, уважительное отношение к коллегам, строгость и требовательность в сочетании с бережным отношением к своим ученикам, молодым ученым, с которыми всегда общалась на равных, без помпезности, дарила свои знания и идеи и всегда интересовалась их мнением.

Бронислава Самойловна подготовила 12 кандидатов и 3 доктора медицинских наук. Все ученики всегда вспоминают ее с любовью, глубоким уважением и теплотой. В течение многих лет Бронислава Самойловна являлась членом Ученого совета Института, Проблемной комиссии, членом Квалификационного совета, была блестящим оратором, ее выступления всегда были понятны и доступны, несли четкую мысль, корректную, толерантную оценку рассматриваемого вопроса.

Б. С. Бравер-Чернобульская награждена рядом наград (медалью «За доблестный труд», «В память 1500-летия Киева» и др.), а также очень значимой и ценимой ею наградой, которую присудили сотрудники Института – «Наша Б. С.».

Сегодня Брониславы Самойловны уже нет с нами. Ее труды, ее Личность навсегда останутся в истории Института, в истории отечественной токсикологии и фармакологии, в памяти коллег и учеников и всех, кто знал и работал с этим замечательным человеком.

Это к Брониславе Самойловне относятся слова поэта: «Неправда, друг не умирает, – лишь рядом быть перестает».

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Кизуб И. В., Клименко К. И., Соловьев А. И. Участие протеинкиназы С (ПКС) в механизмах нарушения сосудистого тонуса при сахарном диабете. Часть 3 3

Нефедов А. А., Мамчур В. Й. Фармакотерапия рассеянного склероза – современные стандарты 10

Хайтович Н. В. Фармакогенетика бронхиальной астмы 17

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

Демченко А. В., Беленичев И. Ф. Состояние глутатионового звена тиол-дисульфидной системы мозга белых крыс после коррекции цитиколином моделированной хронической ишемии 28

Мовчан Е. Д. Противосудорожная активность повышенных доз антиконвульсантов на фоне сформированной толерантности 35

Шастун Н. П., Опрышко В. И., Павлов С. В., Бухтиярова Н. В. Сравнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндлинга 40

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Харченко О. Развитие оксидативного и нитрозативного стресса в мозге белых крыс при длительном употреблении алкоголя 49

Дроговоз С. М., Зупанец М. В., Кононенко А. В., Абдурахмонов Ж. У. Антиартритные препараты природного происхождения – альтернатива НПВС 55

Загайко А. Л., Брюханова Т. А, Шкапо А. И. Модулирующее влияние сибутрамина на изменения метаболизма, обусловленные экспериментальной инсулинорезистентностью у крыс 62

Кузнецова Е. В., Лавренчук Г. И., Буцкая В. Е., Симонова И. В. Фармакобиологические свойства экстракта шрота темных сортов винограда 70

Лукьянчук В. Д., Шебалдова Е. А. Аденилнуклеотидный компонент механизма противогипоксического действия нового координационного соединения германия ВИТАГЕРМ-3 на модели гипоксии замкнутого пространства 76

Маньковская И. Н., Носарь В. И., Гончар О. А., Гавенаускас Б. Л., Французова С. Б. , Братусь Л. В., Миронова Г. Д. Влияние модуляторов митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала на физическую выносливость крыс 82

Цуркан А. А., Делян Е. П. Определение оптимальных условий экстракции биологически активных веществ из сырья осота огородного (*Sonchus Oleraceus* L.) 90

ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА, ФАРМАКОЭКОНОМИКИ

Ветютнева Н. А., Рымар М. В., Минарченко В. Н., Марусенко Н. А., Макиян Ш. А. Исследование твердых дисперсных систем мелоксикама с высокомолекулярными соединениями методами электронной микроскопии и абсорбционной спектрофотометрии в ИК-области 98

ЛИЧНОСТИ 104

CONTENT

REVIEWS

Kizub I. V., Klymenko K. I., Soloviev A. I. Protein kinase C (PKC) participation in mechanisms of vascular tone abnormality in diabetes mellitus. Part 3 3

Nefedov A. A., Mamchur V. I. Pharmacotherapy of multiple sclerosis – modern standards 10

Khaitovych M. Pharmacogenetics of bronchial asthma 17

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

Demchenko A. V., Belienichev I. F. Glutathione link state of thiol disulfide system of white rats brain after tratment by citicoline of simulated chronical ischemia 28

Movchan O. D. The anticonvulsant action of increased doses of antiepileptic drugs on the background of formed tolerance 35

Shastun N. P., Oprishko V. I., Pavlov S. V., Buhtiarova N. B. Comparative assessment of different groups of anticonvulsants impact on cognitive processes in normal, morphological and functional characteristics of neurons of the sensorimotor cortex and neuroapoptosis under pentylenetetrazole-kindling 40

WORKING OUT OF THE NEW METHODICAL WAYS

Kharchenko O. Long-term alcohol consumption provokes oxidative and nitrosative stress in albino rats brain.....49

Drogovoz S. M., Zupanets M. V., Kononenko A. V., Abduraxmonov J. U. Antiarthritic drugs of natural origin – alternative NSAID 55

Zagayko A. L., Briukhanova T. O., Shkapo A. I. Sibutramine modulating effects on metabolic changes associated with experimental insulin resistance in rats 62

Kuznietsova E. V., Lavrenchuk G. J., Butska V. E., Simonova I. V. Pharmacobiological characteristics extract of the bagasse from dark grape varieties 70

Lukyanchuk V. D., Shebaldova K. O. Adenile nucleotides component of antihypoxic mechanism action of the new coordination compound of germanium VITAGERM-3 on the model of the enclosed space hypoxia.....76

Mankovskaya I. N., Nosar V. I., Gonchar O. A., Gavenauskas B. L., Frantsuzova S. B., Bratus L. V., Mironova G. D. Effect of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel modulators on rat physical endurance.....82

Tsurkan A. A., Delyan E. P. Determination of optimal conditions for extraction of biologically active substances from raw thistle garden (*Sonchus Oleraceus L.*) 90

ISSUES OF PHARMACY, PHARMACEUTICAL MARKET, PHARMACOECONOMICS

Vetiutneva N. A., Rymar M. V., MinarchenkoV. N., Marusenko N. A., Makiyan S. A. Research of meloxicam solid dispersions with macromolecular compounds by electron microscopy method and absorption spectrophotometry in IR-region 98

PERSONALITY 104