
СПІВЗАСНОВНИКИ

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

**Двомісячне
науково-практичне,
медичне видання**

Фармакологія та лікарська токсикологія

Заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 1 (26)/2012

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Чекман І. С., Полова Ж. М., Гребельник А. І. Наночастинки у лікарських формах: аспекти фармакології та фармацевтичної технології.....3

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Жиляєв С. О., Штриголь С. Ю. Вплив препаратів кверцетину на наркотичний сон, спричинений алкоголем..... 11

Павлов С. В. Вплив тіолових антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку..... 15

Степанюк Г. І., Маринич Л. І., Ходаківський О. А., Коваленко С. І., Берест Г. Г. Вплив похідного 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-онів (сполуки МТ-279) на стан кислотно-лужної рівноваги та рівень Ca^{2+} у крові гербел з моделлю гострого порушення мозкового кровообігу 19

Чекман І. С., Яковлева І. Ю., Бельнічев І. Ф., Бухтіярова Н. В., Горчакова Н. О. Вплив таурину та пірацетаму на біохімічні показники в головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії..... 24

Ярош О. О. Особливості фармакокінетики нової антиепілептичної сполуки AGB-31 у півкулях головного мозку щурів 29

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Горбенко Н. І., Звягіна Т. С., Шаламай А. С. Вплив таурин-вмісного препарату «Кратал» на розвиток діабетичної нефропатії в щурів 34

Новохацька Т. В., Тишкін С. М., Досенко В. Є., Іванова І. В., Добреля Н. В., Соловійов А. І. Пригнічення експресії гена дельта ізоформи протейнінази С усуває судинні порушення в щурів з генетично детермінованою гіпертензією 40

Ошитко Р. В., Грицик А. Р. Вивчення жирнокислотного складу насіння глоду одноматочкового (*Crataegus monogyna*) та глоду згладженого (*Crataegus laevigata*) і перспективи застосування жирної олії глодів у медицині 48

<i>Цуркан О. О., Ковальчук Т. В., Гергель О. В.</i> Хромато-мас-спектрометричне дослідження летких компонентів надземної частини шовковиці	54
<i>Ядловський О. Є.</i> Роль ванілоїдного компонента в антиноцицептивній дії диклофенаку	60
КЛІНІЧНА ФАРМАКОЛОГІЯ	
<i>Кашуба О. В.</i> Побічні реакції, спричинені нестероїдними протизапальними лікарськими засобами диклофенаком і німесулідом в Україні: порівняльне статистичне дослідження та прогноз (Частина 2).....	65
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ РИНОК УКРАЇНИ	
<i>Попович В. П., Громовик Б. П., Глуховський П. В.</i> Ринковий сегмент гепатопротекторів у груповому та індивідуальному вимірах	72
СТОРІНКИ ІСТОРІЇ	
<i>Трінус Ф. П.</i> До історії винаходу хірургічного наркозу	78
CONTENT	80

І. С. Чекман, Ж. М. Полова, А. І. Гребельник

Наночастинки у лікарських формах: аспекти фармакології та фармацевтичної технології

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

Ключові слова: наночастинки, лікарські форми, фармацевтична технологія, фармакологія

Значення фармацевтичної технології ліків в охороні здоров'я надзвичайно велике, тому що при наданні медичної допомоги хворим у 90 % випадків фахівці використовують ліки. Підкреслюючи значення фармакотерапії, І. П. Павлов відзначав, що ліки є універсальним знаряддям медика, і ніякі втручання, хірургічні або інші, не обходяться без використання лікарських препаратів [15].

Майже всі відомі на сьогоднішній день лікарські засоби є певною дисперсною (фармацевтичною, лікарською) системою, яка складається з активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та різних допоміжних речовин. Відповідно до державного нормування виробництва ліків їхні основні властивості (терапевтична дія, безпечність), перш за все, залежать від якості складових фармацевтичної системи, що потребує чіткого розуміння їхньої ролі у формуванні якості ліків у цілому [6].

Значне розширення асортименту активних і допоміжних речовин у виробництві ліків, зростання ролі допоміжних речовин у моделюванні ліків примусило наприкінці ХХ століття дещо змінити концепцію створення нових фармацевтичних препаратів. З'являється нове поняття – фармацевтична розробка ліків, яка передбачає обґрунтування оптимального складу та вибору технології виробництва, забезпечення якості ліків і створення умов взаємного визнання реєстраційних досьє на міжнародному рівні. Значно розширюються біофармацевтичні, клінічні та аналітичні дослідження у фармацевтичній галузі, зростають інвестиції в розробку нових фармацевтичних

препаратів, що створюються з використанням новітніх біоматеріалів та біотехнологій [6, 14, 18].

Бурхливий розвиток наук, що мають відношення до фармації, дозволив фармакотехнологам у співпраці з іншими фахівцями створювати ліки принципово нового типу, що мають спрямовану лікувальну дію та задані кінетичні властивості. Такі ліки, на відміну від традиційних, характеризуються пролонгованою дією, контрольованим вивільненням діючих речовин та цільовим транспортуванням до органа-мішені [2, 6, 18, 19].

Одним із видатних досягнень людства кінця минулого сторіччя слід вважати вивчення властивостей біологічних і синтетичних нанорозмірних матеріалів [7–9, 20]. Наноматеріали, нанобіоматеріали (англ. biofunctionalized nanomaterials) – нанорозмірні штучно синтезовані матеріали, модифіковані з метою надання їм біосумісності з живими середовищами, або наномодифіковані матеріали біологічного походження. У медичній практиці можливе їхнє використання з метою:

- ранньої діагностики захворювань;
- направленої доставки лікарських препаратів;
- відновлення пошкоджених органів і тканин.

Для надання синтетичним наноматеріалам додаткових функцій, наприклад, здатності зв'язуватися зі специфічними білками в організмі, захисту від агрегації, більш високої розчинності у воді, часто використовується прийом хімічної модифікації поверхні таких частинок [6, 27].

Наночастинка (англ. nanoparticle) – ізольований твердофазний об'єкт, розміри якого в усіх трьох вимірах становлять від 1 до 100 нм, що має чітко виражену межу з навколишнім середовищем [42].

Наночастинки – один з найзагальніших термінів для позначення ізольованих ультрадисперсних об'єктів, багато в чому дублює раніше відомі терміни (колоїдні частинки, ультрадисперсні частки), але відрізняється від них за розміром. Тверді частинки розміром менше 1 нм зазвичай відносять до кластерів, більше 100 нм – до субмікронних частинок [5, 11, 12, 21, 29, 42].

Ідея застосування наночастинок для підвищення ефективності фармакологічних засобів діагностики й терапії заснована на тому факті, що речовини в наноформі мають властивості, відмінні від властивостей речовин у макродисперсній формі. Зокрема, висока питома поверхня наноматеріалів призводить до того, що поверхневі явища (адсорбція-десорбція, адгезія) починають переважати в процесах їхньої взаємодії з макромолекулами і біологічними об'єктами [25, 31, 39]. Наслідком цього є те, що навіть невисокі концентрації наночастинок, які не мають значного токсичного ефекту, можуть значною мірою впливати на живі організми.

Деякі наноструктури, як біогенного (вірусні частинки, капсиди), так і небіогенного походження мають форму контейнера, що зумовлює їхнє застосування як засобів доставки терапевтичних чи діагностичних компонентів (у тому числі й інших наночастинок) до цільових клітин або органів. Специфічність доставки наноструктур до цільових клітин визначається використанням специфічних антигін, рецепторів або лігандів [1, 3, 9, 17, 28, 30, 33, 35, 38].

Доставка ліків або адресна доставка лікарських речовин; (англ. drug delivery) – спрямований транспорт лікарської речовини до заданої області організму, органу або клітини [30, 36, 44].

У класичній фармакології та фармації існує термін «лікарська форма», що фактично описує форму доставки ліків до організму, наприклад, у вигляді таблеток, розчинів для внутрішньовенних ін'єкцій, очних крапель, мазей та ін. Розвиток біомедичної науки та біотехнологій призвели до створення нових способів доставки лікарських речовин, наприклад, ліпосом, наносом (нанорозмірних ліпосом) та інших нано-

капсул, а також багатофункціональних, у тому числі магнітних наночастинок [10, 18, 19, 23, 24, 34, 36, 42].

Лікарська форма – зручна для вживання хворими форма готового лікарського препарату, що забезпечує раціональну фармакокінетику готового лікарського засобу та оптимальну його терапевтичну дію [6, 15, 18].

Лікарські форми бувають твердими (наприклад, таблетки, капсули), м'якими (мазі, гелі), рідкими (розчини, суспензії), газоподібними (аерозолі). Лікарський засіб готується в тій чи іншій формі для досягнення різних цілей: забезпечення певного способу введення, локального впливу, отримання заданої фармакокінетики тощо [15, 18].

Суттєва відмінність нових типів лікарських форм від стандартних полягає в можливості реалізації на їхній основі технологій адресної доставки ліків до певних тканин, клітин та внутрішньоклітинних органел. Суть адресної доставки полягає в тому, що власне лікарська речовина, а частіше спосіб її доставки (вектор, контейнер) модифікуються молекулами, що можуть розпізнати рецептори на клітинах-мішенях. Універсальними молекулами, що розпізнають поверхню клітини-мішені, можуть бути антитіла. Завдання фармацевтичної науки полягає у встановленні знань, проти яких поверхневих антигін клітини їх потрібно конструювати [28, 34, 40, 44].

Завдяки широкому розвитку фундаментальних біомедичних досліджень, антигенні портрети клітин стають все більш детальними, що дозволяє знаходити відмінності одних клітин від інших на підставі характеристик їхньої поверхні. Присутність молекул, здатних до розпізнавання на поверхні вектора, дозволяє йому концентруватися в заданій ділянці (пухлині, вогнищі запалення, біля зони ішемії) і доставляти туди лікарську речовину [1, 3, 17, 30, 37, 40].

На відміну від звичайного введення лікарської речовини, спрямована доставка дозволяє знизити дозу ліків і мінімізувати їхній вплив на інші клітини (побічна дія). Під час агресивної терапії пухлин, адресна доставка високотоксич-

них протипухлинних препаратів набуває особливого значення. Додатково з'являється можливість управляти вивільненням ліків з контейнера.

Так, при використанні як контейнерів наночастинок з металевим ядром та полімерною оболонкою, де містяться лікарські речовини, можна викликати їхнє вивільнення при обмеженому нагріванні наночастинок. Це досягається накладенням змінного магнітного поля або опроміненням світлом лазера в ближньому інфрачервоному діапазоні, який слабо поглинається біологічними тканинами, але добре поглинається металевими наночастинами [4, 34].

Прикріплений до клітини-мішені вектор з ліками може бути захоплений клітиною шляхом ендоцитозу або шляхом злиття мембрани вектора (ліпосоми) з мембраною клітини. У будь-якому випадку ліки доставляються всередину клітини і за допомогою спеціальних прийомів можуть бути направлені в ядро, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум та інші органели. Концепція внутрішньоклітинної доставки ліків знаходиться в стадії активної розробки [3, 30, 33, 36]. Для її практичної реалізації важливе значення мають знання про сигнальні послідовності білків, за допомогою яких вони направляються в різні клітинні структури. Не менш важливими є знання про моторні білки клітини, які спрямовано переміщують певні вантажі на великі відстані всередині клітин і можуть бути використані для доставки лікарських речовин, генів і терапевтичних наночастинок [44].

Для опису лікарських форм, в яких носій лікарської речовини має розміри в нанодіапазоні, широко використовують приставку нано. У фармацевтичній технології з'явилися такі поняття, як нанокapsули (наприклад, інкапсулювання ліків у ліпосоми), наноемульсія, наногель тощо [9, 10, 16].

Нанокapsули, інакше коллоїдосоми (англ. nanoparticle) – наночастинки, що складаються з полімерної, ліпідної або іншої оболонки, яка оточує її внутрішню порожнину або вміст. Зазвичай нанокapsули являють собою сферичні порожні частинки, оболонка яких утворена полімерами або фосфоліпідами (у

цьому випадку вони називаються ліпосомами або наносомами), а всередині знаходиться низькомолекулярна речовина. Оболонка нанокapsул може бути виготовлена також з інших матеріалів, наприклад, гідроксиапатиту або силікату кальцію, а також певним чином організованих молекул ДНК [24, 39, 42]. Нанокapsули повинні бути хімічно стабільні, біоактивні, біосумісні з організмом, захищати капсульовану речовину від небажаного впливу. Розміри нанокapsул зазвичай не виходять за межі 100 нм, а мікрокapsул – 600 мкм. Нанокapsули мають високу проникаючу здатність і можуть проходити навіть у такі «закриті» зони організму, як головний мозок [3].

Нанокapsули застосовують для контрольованого введення інкапсульованих біологічно активних речовин: лікарських препаратів (у тому числі нерозчинних у воді або нестабільних), пептидів і білків (що мають функції гормонів та цитокінів), а також генетичних конструкцій, що несуть гени ферментів, гормонів та цитокінів. Діапазон капсульованих речовин широкий – від засобів протипухлинної терапії та морфогенетичних білків кісткової тканини до засобів косметології. Для цільової доставки поверхня нанокapsул може бути модифікована специфічними антигенами, рецепторами або лігандами [1, 24].

Ліпосоми є одними з найзручніших нанокapsул. Мембрана ліпосом складається з природних фосфоліпідів, що визначає її здатність за певних умов поглинатися клітинами. Мембрана ліпосом може зливатися з клітинною мембраною, що призводить до внутрішньоклітинної доставки їхнього вмісту. Перспективними також є підходи доставки нанокapsул всередину еритроцитів та бактерій.

Технологія включення лікарських речовин у нанокapsули дозволяє використовувати багато лікарських сполук, доставка яких до органів і тканин сильно ускладнена через їхню нестабільність або нерозчинність у воді. У ліпосомах (наносомах) можливе капсулювання водних розчинів лікарських речовин, а полімерні нанокapsули зазвичай

використовують для жиророзчинних сполук. Ця технологія дозволяє знизити токсичність та досягти бажаної фармакокінетики для лікарських препаратів. У даний час розробляються підходи до транспорту нанокапсулами наноструктур металевої та напівпровідникової природи, а також суперпарамагнітних наночастинок для селективного руйнування клітин при електромагнітному розігріві, що важливо для лікування пухлин [25, 31, 32, 34].

Нанокапсулювання (англ. nanoencapsulation) – різновид мікрокапсулювання; технологія укладання біологічно активних речовин у нанорозмірні оболонки на основі біодеградованих полімерів та ліпідів. Мікрокапсулювання – це процес укладання в оболонку мікронних частинок твердих, рідких або газоподібних речовин. Розмір поміщених в мікрокапсулу частинок може коливатися в широких межах, від 1 до 6500 мкм, тобто до розміру дрібних гранул або капсул (6,5 мм). Найбільш широке застосування в медицині знайшли мікрокапсули розміром від 100 до 600 мкм. Сучасна технологія дає можливість наносити покриття на частинки розміром до 100 нм та менше. Такі частинки з оболонками називають нанокапсулами, а процес їхнього виробництва – нанокапсулюванням. Нанокапсулювання реалізується за допомогою фізичних, хімічних та фізико-хімічних методів, перш за все, шляхом утворення поліелектролітичних комплексів, ліпосом, випарювання розчинника, контрольованого осадження, пошарового нанесення, обробки в надкритичних розчинах тощо [4, 5, 9, 16, 21]. Розробка способів приєднання до наночасток лігандів спрямованої дії допоможе доставляти біологічно активні речовини до певних тканин. Подальший розвиток цієї технології дозволить у перспективі створювати принципово нові лікарські препарати з контрольованим терапевтичним впливом на певні тканини і органи.

Одним з напрямів розвитку нанотехнологій у фармації є використання наночастинок магнітного матеріалу для створення фармацевтичних препаратів з магнітокерованими властивостями.

Використання таких «розумних», магнітокерованих ліків суттєво збільшує ефективність та безпечність лікування, має перевагу перед традиційними методами лікування. Розробкою та виробництвом магнітних мікро- та наночасток у складі лікарських препаратів займаються американські та деякі європейські фірми: Bangs Laboratories, Polysciences Inc. Magforce Nanotechnologies AG [7–9, 34].

Феромагнітні наночастинки або магнітні терапевтичні наночастинки, наночастинки суперпарамагнітні (англ. magnetic nanoparticles for therapeutic use; ferromagnetic nanoparticles, superparamagnetic nanoparticles) – наночастинки, які мають постійний або наведений магнітний момент застосовуються в медицині для діагностики та лікування захворювань [7, 8, 32, 42, 43].

Магнітні наночастинки, що використовуються з терапевтичною метою, можуть складатися з феро-, феримагнітних або суперпарамагнітних матеріалів. Їхня основна перевага – це можливість безконтактного управління переміщенням в організмі із застосуванням зовнішнього магнітного поля. Найбільш широке застосування в медицині знаходять наночастинки на основі оксидів заліза зі структурою шпінелі (магнетит, маггеміт) [28, 42].

Магнітні наночастинки з терапевтичною метою рідко застосовують у чистому вигляді. Зазвичай їх інкапсулюють або поміщають в біоінертні матриці (різні органічні сполуки або полімери, у тому числі природного походження) з метою зниження можливого токсичного впливу магнітної фази, підвищення її фізико-хімічної стійкості та створення можливості іммобілізації на поверхні таких капсул або матриць лікарських препаратів. Капсулювання зазвичай проводять у суспензіях ультрадисперсних феро-, фери- та суперпарамагнітних частинок, що містять стабілізуючі реагенти і одержали назву «магнітні рідини» [4, 8, 12].

Однією з областей застосування магнітних наночастинок в медицині є адресна доставка ліків. До її основних переваг відносять можливість значного зменшення токсичної дії ліків на інші

органи й системи організму, можливість спрямовувати й утримувати в певному місці наночастинки з ліками за допомогою магнітного поля, візуалізувати їх методами магнітно-резонансної томографії. Важливою властивістю магнітних наночастинок є можливість здійснювати їх локальний нагрів високочастотним магнітним полем для ініціації механізму десорбції/декапсулювання ліків або для проведення магнітної гіпертермії. Для адресної доставки ліків як магнітного носія зазвичай використовують суперпарамагнітні частинки, оскільки після впливу магнітного поля вони не агрегують, однак, при цьому відбувається зниження потужності магнітного впливу, що ускладнює перенесення та утримування частинок у безпосередній близькості від цільового об'єкта [7–9, 34].

Магнітні наночастинки, вкриті біосумісними молекулами (декстран, полівініловий спирт, фосфоліпіди), до яких «пришиті» антитіла до специфічних антигенів, використовуються в технології магнітного сепарування. Так, наприклад, магнітні частинки, покриті імуноспецифічними агентами, можуть швидко зв'язуватися з червоними кров'яними клітинами, бактеріями або раковими клітинами. Методика розділення (сепарування) клітин полягає в додаванні суспензії імуномодифікованих магнітних наночастинок безпосередньо до зразка біологічної рідини. Після 10–20 хв інкубації пробірка зі зразком вміщується в магнітний сепаратор, де клітини, пов'язані з магнітними частинками, уловлюються магнітом, а надосадова рідина видаляється.

Використання з цією метою феритів різного складу з розміром частинок декілька нанометрів дозволяє одержувати магнітокеровані лікарські препарати [34].

Для застосування в медицині також привертають увагу багатофункціональні наночастинки, так звані динамічні наноплатформи (англ. multifunctional nanoparticles (in medicine)) – наночастинки та їхні комплекси, здатні виконувати декілька медичних завдань, наприклад, служити діагностичними контрастними агентами, біосенсорами,

векторами для спрямованої доставки ліків [9, 11, 16, 24, 28, 42]. Ці тектодендримери, складаються зі з'єднаних один з одним наномодулів, кожен з яких виконує певну функцію. Одні наночастинки можуть нести лікарські речовини, інші – молекули розпізнавання та адресної доставки, треті наноструктури в складі наносом можуть виконувати роль біосенсорів (рН, редокс-потенціалу, мембранного потенціалу тощо), четверті можуть бути оснащені наноантенами з нанокристалів золота, що викликають нагрівання наносом при вміщенні в електромагнітне поле певної частоти. Застосування суперпарамагнітних наночастинок у складі наносом дозволяє візуалізувати їхнє місцезнаходження в організмі за допомогою томографічних методів. На основі флуоресцентних технологій створені наномодулі, здатні сигналізувати про процеси загибелі пухлинних клітин та інших результатах наномедичних впливів [26, 38, 41, 43].

У залежності від завдань, що розв'язуються лікарем, наносоми можуть збиратися з різних функціональних модулів і здійснювати певні функції в організмі, такі, як моніторинг внутрішнього середовища, місцезнаходження та візуалізація цільових клітин, доставка ліків та їхнє контрольоване вивільнення, повідомлення про результати терапії. Варіантами немодульних багатофункціональних наночастинок є модифіковані вірусні капсиди, при складанні яких можливо змінювати як вміст капсида (вантаж), так і склад поверхневих молекул капсида, що визначають спрямовану доставку і сенсорні функції. Наносоми та інші згадані багатофункціональні нанопристрої можна розглядати як віддалений прообраз нанороботів медичного призначення [32].

Наприклад, принцип «роботи» полімерної моделі багатофункціональної наночастинки медичного призначення наступний. Солюбілізує блок (це може бути й сам по собі полімерний ланцюг) забезпечує функціонування наночастинки в біологічному середовищі (крові, лімфі). При цьому гідрофільність/гідрофобність, електростатичний заряд, його щільність впливають на

фармакокінетику й фармакодинаміку препарату. Полімерні ланцюги можуть дуже відрізнятися за стабільністю, розмірами, складом, присутністю спеціальних доменів (наприклад, гідрофобних вставок). Інтервал значень молекулярної маси полімерів важливий для мембранної проникності препарату (подолання гематоенцефалітного бар'єру, стимуляція ендцитозу). Лікарський агент (фармакон) може бути пов'язаний з полімерною основою (чи укладений безпосередньо в наноконтейнер) через стабільний зв'язок або такий, що може біодеградувати; або сам фармакон зв'язується у формі неактивного попередника ліків, або як активний метаболіт (активний початок лікарського препарату). «Націлюючий пристрій» діє як вектор (можливо, це молекули антитіл, молекулярні компоненти, що з'являються в зоні ураження, білкові домени зі специфічними сорбційними властивостями тощо), що направляє наночастинку до певної ділянки тканини або органу-«мішені». Конформація, придбана кон'югатом у біосистемі, сприяє формуванню на його основі багатофункціональної наночастинок медичного призначення [30, 33, 35, 36].

При необхідності візуалізації наночастинок (наприклад, для діагностичних цілей) використовуються такі підходи, як ядерно-магнітний резонанс (магнітні частинки), і детектування за допомогою спеціальних пристроїв специфічної флуоресценції небіогенного (наприклад, квантові точки) або біогенного (наприклад, зелений флуоресціюючий білок) походження [7, 22, 26].

Лікарські речовини у вигляді наночастинок мають не до кінця вивчені властивості, що впливають на їхню фармакокінетику, тобто на всмоктування, розподіл у тканинах, біотрансформацію та виведення з організму. Систематичне вивчення закономірностей дії лікарських речовин у наноформі дозволить визначити їхній терапевтичний потенціал, також можливі ризики для

здоров'я людини [29, 31, 39]. Адже за класичним визначенням ВООЗ, активний фармацевтичний інгредієнт – це стандартизована біологічно активна речовина (БАР) або їх суміш (з певною терапевтичною ефективністю), одержана шляхом синтезу, біотехнології або з об'єктів людського, тваринного, рослинного чи мінерального походження, і дозволена до медичного застосування з метою виробництва (виготовлення) лікарських препаратів [6, 13].

Активний фармацевтичний інгредієнт має відповідати вимогам Державної фармакопеї України (ДФУ) або аналітично-нормативної документації (АНД), затвердженої вповноваженим державним органом. Остаточний висновок про якість активного фармацевтичного інгредієнта будь-якого виробника складається з урахуванням відповідності його виробництва вимогам GMP за конкретною технологією та умовами реалізації (дистрибуції, транспортування, зберігання).

Висновок

Натепер в Україні відсутня нормативно-правова база, що регулює питання безпечного використання об'єктів, лінійні розміри яких знаходяться в нанодіапазоні. Саме тому вкрай необхідною є організація системи сертифікації в галузі нанотехнологій, яка могла б забезпечити оцінку відповідності наноматеріалів заявленим характеристикам і параметрам безпечності, гарантії якості нанопродукції на всіх стадіях виробництва та споживання, підтвердження відповідності підприємств та об'єктів наоіндустрії міжнародним вимогам безпеки виробництва.

Для вирішення поставлених питань потрібно сформувати сучасну технічну базу, освоїти адекватні методи ідентифікації наночастинок та методи визначення біологічної активності нанорозмірних речовин, а також створення чіткої системи реєстрації та обліку продуктів нанотехнологій.

1. Арчаков А. И. Нанотехнологии в диагностике и терапии / А. И. Арчаков, Ю. Д. Иванов // Медико-социальные аспекты отечественного здравоохранения. Актуальные вопросы диагностики и лечения в клинике внутренних болезней. – М.: Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2007. – С. 10–18.

2. Взаимодействие лекарств и эффективность фармакотерапии / Л. В. Деримедведь, И. М. Перцев, Е. В. Шуванова [и др.]. – Х.: Изд-во «Мегаполис», 2002. – 784 с.
3. Головенко М. Адресна доставка наносистемами лікарських засобів до головного мозку / М. Головенко, В. Ларіонов // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 4. – С. 8–16.
4. Головин Ю. И. Введение в нанотехнику / Ю. И. Головин. – М.: Машиностроение, 2007. – 496 с.
5. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А. И. Гусев. – 2-е изд. испр. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 416 с.
6. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність: навч. посіб. / І. М. Перцев, Д. І. Дмитрієвський, В. Д. Рибачук [та ін.]; за ред. І. М. Перцева. – Х: Золоті сторінки, 2010. – 600 с.
7. Жоаким К. Нанонауки. Невидимая революция / Жоаким К., Плевнер Л.: пер. с фр. А. Кавтаскина. – М.: КоЛибри, 2009. – 240 с.
8. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию / Н. Кобаяси: пер. с японск. – М. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 134 с.
9. Нанотехнологии и перспективы их использования в медицине и биотехнологии / Лахтин В. М., Афанасьев С. С., Лахтин М. В. [и др.] // Вестн. РАМН. – 2008. – № 4. – С. 50–55.
10. Наукові основи наномедицини, нанофармакології та нанофармації / Москаленко В. Ф., Лісовий В. М., Чекман І. С. [та ін.] // Вісник Національного медичного університету. – 2009. – № 2. – С. 17–31.
11. Нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія: стан, перспективи наукових досліджень, впровадження в медичну практику / Москаленко В. Ф., Розенфельд Л. Г., Мовчан Б. О., Чекман І. С. // 1 національний конгрес «Человек и лекарство – Украина». Київ, 2008. – С. 167–168.
12. Нанотехнологии. Азбука для всех : под ред. Ю. Д. Третьякова. – М.: Физматлит, 2008. – 368 с.
13. Настанова 42–02–2002. Належна виробнича практика активних фармацевтичних інгредієнтів. – К.: МОЗ України, 2002. – 36 с.
14. Настанова 42–3.1:2004 Фармацевтична розробка. – К.: МОЗ України, 2004.
15. Промышленная технология лекарств: Учебник; в 2-х т / В. И. Чуешов, М. Ю. Чернов, Л. М. Хохлова [и др.]; под ред. В. И. Чуешова. – Харьков: Основа, Вид-цтво УкрФА, 2010. – Т. 2. – 704 с.
16. Пул Ч.-мл. Нанотехнологии / Ч.- мл. Пул, Ф. Оуенс. – 2-е, доп. изд. – Москва: Техносфера. – 2006. – 336 с.
17. Нанотехнології в медицині, фармації та фармакології / Розенфельд Л. Г., Чекман І. С., Тертишна А. І. [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 1–3. – С. 3–7.
18. Фармацевтична енциклопедія. Видання друге / Голова ред. ради В. П. Черних. – К.: МОПІОН, 2010. – 1632 с.
19. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків: за ред. проф. І. М. Перцева. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 728 с.
20. Фейнман Р. Ф. Внизу полным полно места: приглашение в новый мир физики / Р. Ф. Фейнман // Рос. хим. ж. – 2002. – Т. XLVI, № 5. – С. 406–409.
21. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации и возможности / Л. Фостер. – Москва: Техносфера, 2006. – 352 с.
22. Квантові мітки: клінічні та фармакологічні аспекти / Чекман І. С., Корнейкова Я. М., Загородний М. І. [та ін.] // Мистецтво лікування. – 2008. – Т. 50, № 4. – С. 72–74.
23. Чекман І. С. Нанофармакологія: стан та перспективи наукових досліджень / І. С. Чекман, О. В. Ніцак // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 11. – С. 7–10.
24. Agoramoorthy G. Re: introduction to nanotechnology: potential applications in physical medicine and rehabilitation / Agoramoorthy G., Chakraborty C. // Am. J. Phys. Med. Rehabil. – 2007. – V. 86, № 12. – P 1031 – 1032.
25. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing / Baun A. N. B., Hartmann J. K., Grieger J. [et al.] // Ecotoxicology. – 2008. – V. 17. – P. 387–395.
26. Behanna H. A. Modulation of fluorescence through coassembly of molecules in organic nanostructures / Behanna H. A., Rajangam K., Stupp S. I. // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – V. 129, № 2. – P. 321–327.
27. Cao G. Template-based synthesis of nanorod, nanowire and nanotube / Cao G., Liu D. // Advances in Colloid and Interface Science. – 2008. – V. 136. – P. 45–64.
28. Caruthers S. D. Nanotechnological application in medicine / Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. // Current Opinion in Biotechnology. – 2007. – V. 18. – P. 26–30.
29. Christian P. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media / Christian P., Von der Kammer F. Baalousha M. // Ekotoxicology. – 2008. – V. – P. 326–343.
30. Decuzzi P. Non-specific interaction of nanoparticles as drug delivery and nanoharvesting agents within the vasculature / Decuzzi P., Ferrari M. // Ann. Biomed. Eng. – 2002. – V. 30. – P. 156–166.
31. Fischer H. C. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study / Fischer H. C., Chan W. C. W. // Current Opinion in Biotechnology. – 2007. – V. 18. – P. 565–571.
32. Freitas R. A. Current status of nanomedicine and medical nanorobotics / Freitas R. A. // J. Comp. Theo. Nanosci. – 2005. – V. 2. – P. 1–25.

-
33. Hoffman Allan S. The origins and evolution of «controlled» drug delivery systems / Hoffman Allan S. // J. Contr. Release.– 2008.– V. 132.– P. 153–163.
 34. Hofmann A. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles / Hofmann A., Wenzel D. [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2009.– V. 106.– P. 44–49.
 35. Jain K. K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice / K. K. Jain // Med. Princ. Pract.– 2008.– V. 17, № 2.– P. 89–101.
 36. Jain K. K. The role of nanobiotechnology in drug discovery / Jain K. K. // Med. Princ. Pract.– 2005.– V. 10, № 21.– P. 1435–1442.
 37. Nanomedicine opportunities for cardiovascular disease with perfluorocarbon nanoparticles / Lanza G. M., Winter P. M., Caruthers S. D. [et al.] // Nanomedicine.– 2006.– V. 1.– P. 321 – 329.
 38. Leary S. P. Toward the emergence of nanoneurosurgery. Part II. Nanomedicine: diagnostics and imaging at the nanoscale level / Leary S. P., Liu C. Y., Apuzzo M. L. // Neurosurgery. 2006.– V. 58.– P. 805–823.
 39. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance / Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A. [et al.] // Br. J. Pharmacol.– 2007.– V. 150.– P. 552–558.
 40. Mironov V. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication / Mironov V., Kasyanov V., Markwald R. R. // Trends in biotechnology.– 2008.– V. 20, № 6.– P. 338–343.
 41. Mustafa S. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light / Mustafa S. // Nature Materials.– 2009.– V. 8.– P. 935–939.
 42. Nanotechnologies. Terminology and definitions for nano-objects // Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. ISO/TS 27687:2008.
 43. Rosi N. L. Nanostructures in biodiagnostics / Rosi N. L., Mircin C. A. // Chem. Rev.– 2005.– V. 10, № 5.– P. 1547–1562.
 44. Sengupta S. Temporal targeting of tumor cells and neovasculature with a nanoscale delivery system / Sengupta S. // Nature.– 2005.– V. 43, № 6.– P. 568–572.

И. С. Чекман, Ж. Н. Полова, А. И. Гребельник

Наночастицы в лекарственных формах: аспекты фармакологии и фармацевтической технологии

В обзорной статье рассматривается использование наночастиц в фармацевтической разработке принципиально нового типа лекарственных препаратов. Описаны основные средства адресной доставки лекарственных веществ, такие как наносомы, нанокапсулы и магнитные наночастицы. Приведены перспективы изучения механизмов действия и биологических эффектов нанолечкарств.

Ключевые слова: наночастицы, лекарственные формы, фармацевтическая технология, фармакология

I. S. Chekman, Z. N. Polova, A. I. Grebelnik

Nanoparticles in dosage forms: pharmacological aspect and pharmaceutical technology

In the review article was discussed the use of nanoparticles in the pharmaceutical development for new types of drugs. Described the main means of targeted delivery of drugs such as nanosomes, nanocapsules and magnetic nanoparticles. It have been reviewed the perspective of studying the mechanism of action and biological effects of nanodrugs.

Key words: nanoparticles, dosage forms, pharmaceutical technology, pharmacology

Надійшла: 23.11.2011 р.

Контактна особа: Полова Жанна Миколаївна, канд. фарм. наук, асистент, кафедра аптечної та промислової технології ліків, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, вул. Пушкінська, 22, м. Київ, 01601. Тел.: (44) 235-90-66. E-mail: zpolova@yandex.ru

С. О. Жилияєв, С. Ю. Штриголь

Вплив препаратів кверцетину на наркотичний сон, спричинений алкоголем

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: корвітин, ліпофлавіон, наркотичний сон

Зловживання алкоголем являє собою актуальну медичну й соціальну проблему. Гостра алкогольна інтоксикація часто призводить до тяжких негативних наслідків через глибоке пригнічення центральної нервової системи та порушення функціонального стану вісцеральних систем, що може призвести до смерті. Тому пошук нових ефективних алкопротекторних засобів слід вважати важливою задачею.

У патогенезі алкогольної інтоксикації суттєву роль відіграє гіпоксія головного мозку, що розвивається як внаслідок прямого токсичного впливу етанолу, так і опосередковано за рахунок дії ацетальдегіду [6]. Проводиться пошук нових препаратів та випробувань їхніх комбінацій для лікування гіпоксичних уражень головного мозку [2]. У цьому аспекті привертають увагу препарати кверцетину – корвітин (водорозчинна форма) та ліпофлавіон (ліпосомальна форма), які чинять церебропротекторну дію при церебральній ішемії [8] та нейротравмі [4, 9]. Корвітин має переваги перед ліпофлавоном як антигіпоксант на моделях гіпоксії замкнутого простору та гемічної гіпоксії [8], проте, на моделі гострого порушення мозкового кровообігу ліпофлавіон перевершує корвітин як церебропротектор [8], а за умов нейротравми [4] обидва препарати демонструють близьку церебропротекторну ефективність [4]. Алкопротекторні властивості є одним із проявів церебропротекторної дії, оскільки головний мозок виявляє високу чутливість до токсичної дії етанолу. У 40 % випадків черепно-мозкова травма відбувається саме в стані алкогольного сп'яніння [5].

Кверцетину притаманні властивості, спрямовані безпосередньо на патогене-

тичні механізми токсичної дії алкоголю, а саме стабілізація клітинної мембрани, активація ферментативних систем і захист від пошкоджувальної дії метаболіту етанолу – ацетальдегіду [1, 2, 10]. Отже, з'ясування впливу препаратів кверцетину різного складу на перебіг гострої алкогольної інтоксикації являє безсумнівний інтерес.

Мета дослідження – визначення впливу препаратів кверцетину (корвітину та ліпофлавіону) на наркотичний сон як один із проявів гострої етанолової інтоксикації в експерименті на тваринах.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 80 безпородних самцях білих мишей масою близько 20 г. Група № 1 – контрольні тварини, яким внутрішньоочеревинно (в/о) вводили 0,9 % розчин NaCl. Тваринам групи № 2 вводили препарат «Пірацетам» (Дарниця) у дозі 200 мг/кг в/о, обраний як препарат порівняння за наявністю алкопротекторної дії [3]. Мишам груп № 3, 4 та 5 вводили в/о препарат «Корвітин» (Борщагівський ХФЗ) у дозах 50; 100 та 150 мг/кг, що еквівалентно 5; 10 та 15 мг/кг кверцетину відповідно. Тваринам груп № 6, 7 та 8 вводили внутрішньоочеревинно препарат «Ліпофлавіон» (Біолік) у дозах 185; 370 і 555 мг/кг (5; 10 та 15 мг/кг за кверцетином). Усі препарати вводили за 30 хв до моделювання алкогольного наркозу, який відтворювали шляхом в/о введення 12,5 % розчину етилового спирту в дозі 5,5 г/кг у розрахунок на етанол [7]. Реєстрували кількість мишей, що приймали бічне положення (критерій розвитку наркозу), час настання наркотичного сну та виходу з нього. Результати обробляли статистично з використанням t-критерію Ст'юдента та кутового перетворення Фішера.

Результати та їх обговорення. Як видно з рисунку, алкогольний наркоз

розвинувся в усіх мишей контрольної групи. 2 тварини із 10, що отримали пірацетам (20 %, $P > 0,05$ відносно контролю), бічне положення не приймали – відзначали лише загальмованість із порушенням координації рухів, рогівковий рефлекс зберігався. На тлі корвітину в 30–40 % мишей етаноловий наркоз не наставав. Ліпофлавон у дозі 185 мг/кг (5 мг/кг за кверцетином) демонстрував таку саму тенденцію, що й пірацетам. Зі збільшенням дози ліпофлаону в 2 і 3 рази (10 і 15 мг/кг за кверцетином) кількість мишей, нечутливих до наркотичної дії етанолу, вірогідно зростала відповідно до 30 і 40 %.

Обидва препарати кверцетину за профілактичного введення статистично значуще збільшували час настання бічного положення (без урахування тварин з відсутністю наркотичного сну) відносно контрольної патології (таблиця). Виняток склав лише ліпофлавон у дозі 5 мг/кг за кверцетином, де спостерігалася лише тенденція до збільшення часу на 29 %.

За введення корвітину в дозах 5; 10 і 15 мг/кг за кверцетином наркотичний сон відтермінувався в порівнянні з контрольною патологією на 121, 177, і 198 % відповідно.

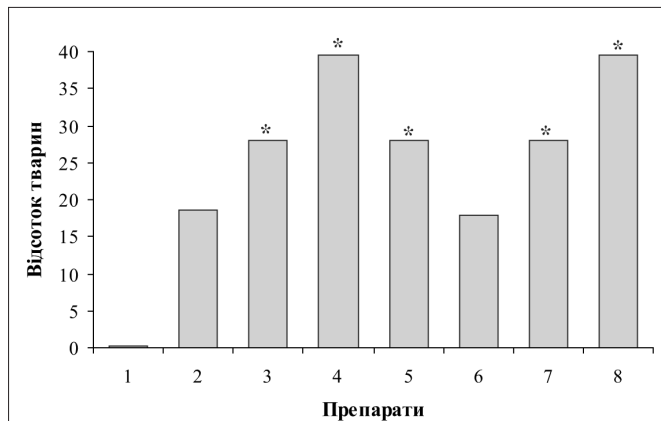


Рисунок. Вплив пірацетаму, корвітину та ліпофлаону на відсоток тварин, у яких наркотичний сон не наставав. 1 – контрольна патологія, 2 – пірацетам (200 мг/кг),

3 – корвітин (50 мг/кг), 4 – корвітин (100 мг/кг), 5 – корвітин (150 мг/кг), 6 – ліпофлавон (185 мг/кг), 7 – ліпофлавон (370 мг/кг), 8 – ліпофлавон (555 мг/кг).

Примітка. * – вірогідні відмінності ($P < 0,05$) щодо показника контрольної патології. Кількість тварин у кожній групі – 10.

Ліпофлавон збільшив латентний період бічного положення на 274 і 188 % у дозовому еквіваленті за кверцетином відповідно 10 і 15 мг/кг. У дозі, еквівалентній 5 мг/кг за кверцетином, ліпофлавон вірогідно зменшував цей показник у порівнянні з корвітином. Референс-препарат пірацетам сприяв збільшенню часу настання бічного положення лише на 36 % ($P > 0,05$).

Тривалість перебування в бічному положенні пірацетам несподівано збільшив на 64 % ($P < 0,01$) у порівнянні з контрольною патологією. Під впливом корвітину даний показник дозозалежно зменшувався на 42; 48 та на 58 % при введенні в дозах відповідно 5; 10 та 15 мг/кг за кверцетином. Ліпофлавон у найменшій застосованій дозі виявляв тенденцію до зменшення тривалості бічного положення на 31 % ($P > 0,05$). Доза 370 мг/кг (10 мг/кг за кверцетином) виявилась найефективнішою – зменшення часу перебування тварин у наркозі склало 71 % ($P < 0,001$). Подальше збільшення дози, на відміну від корвітину, не посилювало ефект – час перебування у бічному положенні зменшувався на 39 % ($P < 0,02$).

Час виходу з наркозу по групах змінювався аналогічним чином. Максимальний антинаркотичний ефект виявив ліпофлавон у дозі 370 мг/кг, перевершуючи препарат порівняння пірацетам ($P < 0,001$), що виявився неефективним.

Токсична дія етилового спирту на відміну від інших психотропних чи наркотичних речовин не пов'язана зі специфічними рецепторами. Вона реалізується через безпосередню взаємодію з компонентами ліпідного бішару мембрани. Це призводить до збільшення текучості ліпідної оболонки, зміни функціонального стану іонних каналів, порушення трансмембранного перенесення іонів, зокрема, кальцію, і як наслідок – до посилення ліпідної

Порівняльний вплив пірацетаму, корвітину та ліпофлакону на перебіг етанолового наркозу в мишей

Показник	Контрольна патологія	Пірацетам, 200 мг/кг	Корвітин			Ліпофлакон		
			50 мг/кг (5 мг/кг) [^]	100 мг/кг (10 мг/кг) [^]	150 мг/кг (15 г/кг) [^]	185 мг/кг (5 мг/кг) [^]	370 мг/кг (10 г/кг) [^]	555 мг/кг (15 мг/кг) [^]
n	10	8	7	6	7	8	7	6
Маса тварин, г	19,8± 1,0	21,8± 1,6	21,4± 1,7	22,9± 1,1	21,8± 1,3	20,4± 0,9	20,4± 1,1	19,1± 1,3
Час прийняття бічного положення, с	66,0± 6,0	90,0± 11,3	146,0± 12,1*#	183,0± 34,8*#	197± 17*#	85,7± 12,1&	247± 28 *#	190,0± 18,4*#
Тривалість перебування в бічному положенні, с	748,0± 94,8	1230± 100*	429,0± 45,6*#	387,0± 82,3*#	314,0± 55,8*#	514,0± 89,6#	217± 35*#	460,0± 48,1*#
Час виходу з бічного положення, с	814,0± 93,6	1320± 98*	575,0± 94,3 #	570,0± 75,1*#	511,0± 61,5*#	600,0± 96,2#	464,0± 37,9*#	650,0± 62,7#

*Примітка. n – кількість тварин, в яких настав етаноловий наркоз; ^ – перерахунок дози на кверцетин; вірогідні відмінності (p<0,05): * з показником модельної патології, # з показниками групи пірацетаму, & з показником групи корвітину в еквівалентній за кверцетином дозі.*

пероксидації та розвитку оксидативного стресу [6, 10]. Кверцетин є потужнішим антиоксидантом ніж α -токоферол, і реалізує свою дію через пригнічення активності прооксидантних і протеолітичних ферментів, попереджує порушення компонента клітинної мембрани фосфатидилінозину, сприяє нейтралізації продуктів пероксидного окиснення [1, 2, 10]. Також кверцетину притаманна здатність активувати мітохондріальну ДНК з наступним підвищенням концентрації цитохрому С – компонента дихального ланцюга. Це може відігравати важливу роль у патогенетичному лікуванні етанолової інтоксикації [6, 11]. Також кверцетин здатен захищати клітини від токсичної дії метаболіту етанолу ацетальдегіду та прискорювати метаболізм алкоголю в організмі [1].

Докладне з'ясування механізмів захисної дії препаратів кверцетину та їхня порівняльна ефективність при комбінованій патології (гострій, алкогольній інтоксикації та черепно-мозковій травмі) буде предметом подальших досліджень.

Висновок

Препарати кверцетину – Ліпофлакон у дозі 370 мг/кг (10 мг/кг за кверцетином) та Корвітин у дозі 150 мг/кг (15 мг/кг за кверцетином) виявляють максимальну активність на моделі етанолового наркозу за критеріями зменшення кількості тварин з наркотичним сном, збільшенням часу настання положення наркотичного сну та швидкістю відновлення функціонального стану центральної нервової системи після наркозу.

1. Билык О. В. Биофлавоноид кверцетин и перспективы его использования в медицине / О. В. Билык, В. К. Рыбальченко, Б. П. Романюк // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2007. – Т. 2, № 1. – С. 4–9.
2. Віничук С. М. Клінічне та біохімічне обґрунтування доцільності комплексного використання цераксону і корвітину в лікуванні гострого ішемічного інсульту / С. М. Віничук, М. М. Проколів, Г. С. Трепет // Международный неврологический журнал. – 2011. – № 1 (39). – С. 81–91.
3. Єсева О. А. Діакамф підвищує виживаність тварин при гострій алкогольній інтоксикації / Єсева О. А., Шатілов О. В., Севрюков О. В. [та ін.] // Український вісник психоневрології. – 2008. – Т. 16, № 3 (56). – С. 78–79.

4. Жияев С. О. Препарати кверцетину як церебропротектори при експериментальній черепно-мозковій травмі / С. О. Жияев, С. Ю. Штриголь // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т. 5, № 4. – С. 100–104.
5. Каримов Р. Х. Эпидемиологические аспекты своевременности оказания медицинской помощи пострадавшим с черепно-мозговой травмой / Р. Х. Каримов, В. И. Данилов, В. П. Панкова // Неврологический вестник. – 2006. – Т. 38, Вып. 1–2. – С. 43–48.
6. Руководство по наркологии / В. Б. Альтшулер, И. П. Анохина, Ю. Л. Арзуманов, [и др.]; под ред. чл.-корр. РАМН проф. Н. Н. Иванца. – М.: ИД Медпрактика, 2002. – Т. 1. – 2002. – 504 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Е. В. Арзамцев, Э. А. Бабаян, Ю. Б. Белоусов [и др.]; под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р. У. Хабриева. – [2-е изд.]. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
8. Слесарчук В. Ю. Церебропротекторні ефекти препаратів кверцетину: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм наук.: спец. 14.03.05. «Фармакологія» / В. Ю. Слесарчук. – Київ, 2009. – 20 с.
9. Садовник О. В. Фармакотерапевтична ефективність корвітину при травматичному пошкодженні головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм наук.: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / О. В. Садовник. – Харків, 2011. – 20 с.
10. Chen X. Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol / X. Chen // Phcog. Mag. – 2010. – Nov. – P. 135–141.
11. Davis J. M. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance / J. M. Davis, E. A. Murphy, M. D. Carmichael [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2009. – V. 296. – R1071–R1077.

С. А. Жияев, С. Ю. Штриголь

Влияние препаратов кверцетина на наркотический сон, вызванный алкоголем

В опытах на мышах с моделью алкогольного наркоза установлено, что препараты кверцетина липофлаво (липосомальная лекарственная форма) и корвитин (водорастворимая форма) уменьшают чувствительность к угнетающему действию этанола на центральную нервную систему. Максимальный антиалкогольный эффект липофлаво оказывает в дозе, эквивалентной 10 мг/кг по кверцетину, корвитин – в дозе 15 мг/кг по кверцетину. Пирацетам (200 мг/кг) не проявил алкопротекторных свойств.

Ключевые слова: корвитин, липофлаво, наркотический сон

S. O. Zhylyayev, S. Y. Shtrygol'

The influence of quercetin contained preparations on the narcotic sleep induced by alcohol

In experiments on mice with narcotic sleep induced by alcohol was established that preparations of quercetin contained medicines: lipoflavin (liposomal form) and corvitin (water-soluble form) reduced the sensitivity to the inhibitory effect of ethanol on the central nervous system. The maximum anti-alcohol effect of lipoflavin was in dose equivalent to 10 mg / kg of quercetin, corvitin – 15 mg/kg. Piracetam (200 mg / kg) didn't reveal anti-alcohol properties.

Keywords: corvitin, lipoflavin, narcotic sleep

Надійшла: 23. 11. 2011 р.

Контактна особа: Жияев Станіслав Олександрович, аспірант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, б. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002.
Тел.: (67) 767-99-20. E-mail: stanislav_zhilya@mail.ru

С. В. Павлов

Вплив тіолових антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: тіолові антиоксиданти, стрес-білок HSP70, ішемія головного мозку

Відомо, що ішемія головного мозку супроводжується виснаженням енергетичних ресурсів; ексайтотоксичністю та утворенням активних форм кисню (АФК), що пов'язано з втратою електронів, накопичених у проміжних ділянках дихального ланцюга. Порушення енергетичного метаболізму призводить до зміни трансмембранних іонних потоків та накопичення внутрішньоклітинного кальцію. Одночасно посилюються процеси вільно-радикального окиснення (ВРО) та відбувається пошкодження активними формами кисню білків, нуклеїнових кислот, ліпідів. Некерована та некомпенсована активація процесів ВРО, виснаження ендогенних антиоксидантів та порушення регуляторних механізмів антиоксидантного захисту розглядаються як ключові ланки пошкодження нейрональних клітин за умов ішемії [1–3].

Крім того, у сучасній літературі широко обговорюється захисна дія стрес-білка HSP70 при ішемічних пошкодженнях головного мозку на тлі активації процесів ВРО. Білки HSP (heat shock proteins) уперше були виявлені в клітинах за умов термічного стресу. У подальшому було встановлено, що при різних видах стресу різко підвищується синтез HSP, які за умов норми практично не виявляються. Підвищення експресії та нейропротекторна дія HSP70 виявлена за умов глутаматної нейротоксичності, при депривації кисню, глюкози та при відтворенні різноманітних моделей ішемії головного мозку [4–6]. З іншого боку, при зниженні концентрації

HSP70 збільшуються клітинні пошкодження, викликані локальною ішемією мозку в нокаутних та інтактних щурів [5, 6]. Експериментальними дослідженнями була встановлена здатність HSP70 взаємодіяти з лігандною частиною мембрани та ініціювати фолдінг окисно модифікованих функціонально активних макромолекул [4, 6].

Таким чином, наведене вище зумовлює пошук нейропротективних засобів серед сполук, здатних пригнічувати процеси ВРО та впливати на синтез HSP-білків.

Останніми роками як за умов експериментальної ішемії головного мозку, так і в клінічних дослідженнях, досить інтенсивно застосовуються так звані «тіолові антиоксиданти». Особливу увагу привернули до себе похідні 3-оксипіридину – емоксипін, мексидол та вітчизняний оригінальний препарат – тіотриазолін, що мають антиоксидантні властивості [7, 8]. Крім того, деякими дослідниками обговорюється можливість тіолових антиоксидантів впливати на синтез протективних HSP-білків [6, 9].

Мета дослідження – встановлення здатності емоксипіну, мексидолу та тіотриазоліну впливати на вміст HSP70 білків у гіпокампі монгольських піщанок за умов гострої церебральної ішемії.

Матеріали та методи. Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом перев'язки сонної артерії в монгольських піщанок (*Meriones uniculatus*) масою 65–70 г [10]. Тварини утримувалися на стандартному раціоні харчування віварію при природній зміні дня та ночі. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях» [11]. Досліджувані препарати вводили тва-

ринам один раз на день внутрішньоочеревинно протягом 4 діб у наступних концентраціях: емоксипін – 100 мг/кг; мексидол – 50 мг/кг; тіотриазолін – 50 мг/кг.

Інтенсивність процесів ВРО визначали за концентрацією маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину, який досліджували імуноферментним методом [10].

Вміст у гіпокампі HSP70-білка визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу. Тканину гомогенізували в буфері (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100), pH 7,5 при температурі 4 °C у співвідношенні 1:6 тканина/буфер. Після центрифугування при 13 000 об./хв та 4 °C з пробірки вилучали супернатант з білками цитозолу та аналізували з використанням електрофорезу та блотінгу. Білки розподіляли в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенос білків з ПААГ до мембрани PVDF здійснювали електроелюцією протягом 45 хв. Преінкубацію Вестерн-блотів проводили в розчині TBST (з додаванням 1 % Tween-200) протягом 1 год. Після цього блоти інкубували з первинними моноклональними антитілами (Santa Cruz Biotechnology) проти HSP70 у розведенні 1:1000 протягом 1 год. Після промивання блоти інкубували із вторинними антитілами (Santa Cruz Biotechnology), кон'югованими з пероксидазою хрому (1:2000) протягом 1 год. Детекцію HSP70-білків здійснювали за допомогою денситометричного аналізу в програмі Adobe Photoshop [10].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Statistica® for Windows 6.0» (Stat-Soft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність відмінностей визначали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Експериментальними дослідженнями встановлено, що моделювання ішемії головного мозку в монгольських піщанок на 4 добу експерименту супроводжувалося розвитком оксидативного стресу, про що свідчило суттєве, більш ніж на 82 % відносно показників інтактних тварин накопичення в гіпокампі маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину. Нітротирозин, на думку

багатьох дослідників – є специфічним маркером окисного стресу головного мозку. Окисна модифікація функціонально активних білкових молекул призводить до порушення здатності мембран генерувати та проводити нервовий імпульс [3, 8]. Важливо відмітити, що головний мозок найчутливіший до окисного стресу. За умов ішемічного пошкодження тканин головного мозку антиоксидантна система виснажується. Виникає накопичення маркерних продуктів окисної деградації білків, а саме, нітротирозину, гідропероксидів жирних кислот, малонового діальдегіду, що призводить до загибелі нейрональної клітини. HSP70, у свою чергу, запобігає агрегації білків, бере участь у протеолітичній деградації нестабільних білків [6, 9]. У зв'язку з цим, на 4 добу ішемії мозку рівень білка в даних дослідженнях був зниженим відносно показника інтактних тварин, про що свідчило зменшення площини HSP70-позитивно забарвленого комплексу та зниження оптичної щільності HSP70-позитивно забарвленого комплексу більш ніж на 68 та 75 % відповідно. Зменшення концентрації HSP70 пояснюється, на нашу думку, ще й тим, що за умов розвитку оксидативного стресу та зриву компенсаторних можливостей організму під дією АФК модифікуються самі HSP70-білки, що порушує їхнє функціонування.

4-разове введення емоксипіну – 100 мг/кг, мексидолу – 50 мг/кг та тіотриазоліну – 50 мг/кг призводило до покращання стану антиоксидантної системи на 4 добу досліджень, про що свідчило статистично значиме зниження концентрації нітротирозину в гіпокампі. Фармакологічна дія досліджуваних препаратів була односпрямована, але відрізнялась за силою ефекту. Так, з таблиці видно, що тіотриазолін перевищував показники емоксипіну й мексидолу та знижував рівень нітротирозину більш ніж на 75 %.

За рахунок досить високої антиоксидантної активності, досліджувані препарати позитивно впливають на вміст у гіпокампі протекторних HSP70-білків. Механізм цього впливу пояснюється здатністю тіолових антиоксидантів, за

Вплив тіолових антиоксидантів на вміст нітротирозину та HSP70-білка в гіпокампі монгольських піщанок на 4 добу експериментальної ішемії головного мозку

Групи тварин	Нітротирозин, у.о./г білка (M±m)	Площа позитивно забарвленого комплексу, у.о. (M±m)	Оптична концентрація позитивно забарвленого комплексу, у.о. (M±m)
Інтактні	1,20±0,11	54,8±1,7	0,28±0,041
Ішемія, 4 доба (контроль)	6,80±0,34	17,4±1,7	0,07±0,02
Ішемія + Емоксипін, 100 мг/кг	2,70±0,48*	38,7±2,4*	0,200±0,056*
Ішемія + Мексидол, 50 мг/кг	3,10±0,36*	33,7±2,2*	0,140±0,038*
Ішемія + Тіотриазолін, 50 мг/кг	1,70±0,19**	58,6±2,4**	0,27±0,05**

Примітка. * $P \leq 0,05$ відносно контролю;

** $P \leq 0,05$ відносно показників групи емоксипіну та мексидолу.

рахунок наявності в молекулярній структурі вільних SH-груп, зменшувати накопичення цитотоксичних дериватів АФК, що в свою чергу призводить до модуляції глобальних факторів транскрипції, які запускають синтез HSP-білків [6, 12]. Крім того, за рахунок прямої антиоксидантної активності, досліджувані препарати пригнічують окисну деструкцію самих HSP70-білків, що пролонгує їхню протекторну дію.

Порівняльний аналіз показав, що за своїм впливом на концентрацію HSP70-білків серед представлених тіолових антиоксидантів переважав тіотриазолін. Перевага тіотриазоліну пояснюється, по-перше, його більш вираженим, ніж у емоксипіну та мексидолу антиоксидантним ефектом. Тіотриазолін здатен не тільки зв'язувати АФК своїми тіоловими групами, але й зменшувати АФК у мітохондріях за рахунок утилізації відновлених форм піридиннуклеотидів та інгібування впливу на NADH-оксидазні системи мітохондрій, що підтверджено дослідями *in vitro* [13].

По-друге, тіотриазолін, здатний захищати від надлишку АФК чутливі до окисного стресу залишки цистеїну в ДНК-зв'язуючих доменах протеїнкаїназ, зокрема MAPK, які в свою чергу активують синтез HSP70-білків [13, 14].

Встановлений вплив тіолових антиоксидантів на концентрацію HSP70-білків є, на нашу думку, ключовим моментом у механізмі їхньої нейропротективної дії. Останнім часом зростає інтерес до використання в медицині антистресорних властивостей шаперонів, до яких належать і HSP70. Однак на сьогодні є труднощі в застосуванні екзогенних білків теплового шоку. У зв'язку із цим ведеться пошук лікарських засобів, що впливають на синтез ендогенних HSP70. Тому той факт, що тіолові антиоксиданти, а саме тіотриазолін, емоксипін та мексидол, за умов ішемії, збільшують синтез ендогенних HSP70, становить значний інтерес з огляду на перспективу застосування цих лікарських засобів при ішемічних ураженнях головного мозку.

1. Стаднік В. М. Нейровізуалізація в діагностиці церебрального інсульту / В. М. Стаднік, В. В. Куценко // Здоров'я України. – 2010. – № 1. – С. 78.
2. Дубенко О. Є. Причини і наслідки лакунарних інсультів головного мозку / О. Є. Дубенко, Г. Є. Костровська, С. Л. Костровський // Укр. неврологічний журнал. – 2007. – № 1. – С. 7–10.
3. Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов – Донецк: Издательский дом Заславский, 2009. – 348 с.
4. Plumier J. C. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury / J. C. Plumier, A. M. Krueger, R. W. Currie, D. Kontoyiannis // Cell Stress Chaperones. – 1997. – № 2. – P. 162–167.

5. Yenari M. A. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70) / M. A. Yenari, R. G. Giffard, R. M. Sapolsky, G. K. Steinberg // *Mol. Med. Today.*– 1999.– V. 5.– P. 525–531.
6. Беленичев И. Ф. Возможная роль HSP-белков в реализации энерготропного механизма нейропротективного действия цереброфурина / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.*– 2010.– Т. 6, № 1.– С. 31–36.
7. Скромец А. А. Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта / А. А. Скромец, Л. В. Стаховская, А. А. Белкин // *Журн. неврол. и психиатрии.*– 2008.– Т. 22.– С. 32–38.
8. Беленичев И. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / І. Ф. Беленічев, Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький // *Совр. пробл. токсикол.*– 2002.– № 3.– С. 24–31.
9. Katschinski D. M. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization / D. M. Katschinski, L. Le, S. G. Schindler [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.*– 2004.– V. 14.– P. 351–360.
10. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев.– К.: «ДФЦ МОЗ України», 2010.– 81 с.
11. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов – К.: «Авіцена», 2002.– 527 с.
12. Эндогенная защита миокарда, роль белков теплового шока в механизмах preconditionирования / И. В. Бабушкина, А. А. Рунович, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.*– 2006.– № 5 (51).– С. 27–31.
13. Павлов С. В. Нейропротективное действие тиотриазолина в условиях 30-дневной алкоголизации крыс / С. В. Павлов, Д. С. Зуева // *Актуальні питання фармац. та медичної науки та практики.*– 2008.– № 11, Т. 2.– С. 142–149.
14. Мазур И. А. Метаболитотропные препараты / И. А. Мазур, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев.– Киев, 2008.– 375 с.

С. В. Павлов

Влияние тиоловых антиоксидантов на содержание стресс-белка HSP70 в гиппокампе монгольских песчанок с острой ишемией головного мозга

В экспериментальных исследованиях на модели острой ишемии головного мозга была установлена способность тиольных антиоксидантов влиять на синтез стресс-белков HSP70 в гиппокампе. Введение тиотриазолина (50 мг/кг); эмоксипина (100 мг/кг); мексидола (50 мг/кг) приводило к существенному снижению в гиппокампе цитотоксического маркера окислительного повреждения белков – нитротирозина, а также повышало концентрацию HSP70. Сравнительная характеристика исследуемых препаратов показала статистически достоверное преимущество тиотриазолина.

Ключевые слова: тиоловые антиоксиданты, стресс-белок HSP70, ишемия головного мозга

S. Pavlov

Thiol antioxidants influence on the stress-protein HSP70 in hippocampus of the *meriones unguiculatus* with acute cerebral ischemia

In experiment on the model of acute cerebral ischemia was shown thiol antioxidants ability to influence on the stress-proteins HSP70 synthesis in hippocampus. Administration of the Tiotriasolin (50 mg/kg), Emoxipine (100 mg/kg), Mexidol (50 mg/kg) leads to the significant decrease of the cytotoxic marker of the oxide injury of the proteins – nitrotyrosine, and to the increase of the HSP70 concentration. Comparative characteristics of the mentioned drugs showed statistically significant advantage of the Tiotriasolin.

Key words: thiol antioxidants, stress-proteins HSP70, acute cerebral ischemia.

Надійшла: 16.11.2011 р.

Контактна особа: Павлов С. В., Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: (61) 224-64-69.

Г. І. Степанюк¹, Л. І. Маринич¹, О. А. Ходаківський¹,
С. І. Коваленко², Г. Г. Берест²

Вплив похідного 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4] триазино [2,3-с]хіназолін-2-онів (сполуки МТ-279) на стан кислотно-лужної рівноваги та рівень Ca^{2+} у крові гербел з моделлю гострого порушення мозкового кровообігу

¹Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

²Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, похідні 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с]хіназолін-2-онів, мексидол, кислотно-лужна рівновага

Серед хвороб нервової системи, які значно погіршують якість життя людства, ішемічний інсульт уособлює та символізує особливу трагедійність, і являється однією з найчастіших причин інвалідності та смертності населення у світі [4].

Ключове місце в патогенезі ішемічного інсульту посідає гіпоксія тканин, яка разом з енергодефіцитом призводить до порушення показників кислотно-лужної рівноваги, що у свою чергу викликає розширення зони некрозу [2, 6, 7, 13]. Саме тому корекція показників кислотно-лужної рівноваги (КЛР) при ішемічних ураженнях головного мозку є одним з основних напрямів сучасної фармакотерапії гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) [3, 11]. Разом із цим відомо, що в основі розвитку некрозу на тлі ішемії мозку лежить запуск глутамат-кальцієвого каскаду, що в кінцевому результаті призводить до внутрішньоклітинного накопичення іонів Ca^{2+} , створюючи перевантаження мітохондрій із порушенням окиснюваного фосфорилування та посиленням катаболічних процесів [5, 15, 17].

Тому на думку багатьох провідних учених, корекція КЛР, як і відновлення біоенергетичних процесів у нейронах, є одним з основних патогенетич-

них механізмів захисту нервових клітин від ішемії та гіпоксії [10, 13, 14].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що похідне 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с]хіназолін-2-онів (сполука МТ-279) має виразний церебропротекторний ефект на моделі двобічної оклюзії загальних сонних артерій у ненаркотизованих щурів [9]. Це проявлялось вірогідним зниженням показника летальності досліджуваних тварин у критичний період експерименту та відстроченням їхньої загибелі.

У зв'язку з цим представляло інтерес дослідити вплив сполуки МТ-279 на стан КЛР та рівень Ca^{2+} в крові за умов експериментального ішемічного інсульту в порівнянні з мексидолом, який натеper широко застосовується як церебропротекторний засіб при даній патології [1, 12].

Мета роботи – охарактеризувати вплив сполуки МТ-279 у порівнянні з мексидолом на стан КЛР і рівень Ca^{2+} в крові при ГПМК.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 28 статевозрілих монгольських піщанках (гербелах) масою 42–53 г, розподілених на 4 групи по 7 тварин у кожній. ГПМК моделювали шляхом однобічної перев'язки правої загальної сонної артерії через 20 хв після виходу тварин з наркозу. Лігатури під судини підводити під пропофоловим (60 мг/кг, внутрішньоочеревинно (в/о) наркозом. І групу становили псевдооперовані тварини, яким після підведення лігатур не проводили оклю-

зію загальної сонної артерії; II групу – тварини з ГПМК без лікування (контроль). У III та IV групах монгольських піщанок із ГПМК лікували відповідно сполукою МТ-279 (10 мг/кг, в/о) або мексидолом (100 мг/кг, в/о), які вводили тричі з інтервалом між введеннями 8 год протягом доби. Перше введення виконували через 20 хв після оклюзії загальної сонної артерії. Контрольна група отримувала аналогічним чином еквівалентну кількість 0,9 % фізіологічного розчину натрію хлориду (2 мл/кг, в/о). МТ-279 та мексидол досліджували в оптимальних дозах, запозичених з літератури [11].

Через 8 год після останнього введення речовин проводили забір крові ($V = 0,4\text{--}0,5$ мл) у шприц з гепарином (0,05 мл) шляхом прямої візуальної пункції яремної вени на боці ураження. Забраний матеріал поміщали в термос із льодом ($t = 3\text{--}4^\circ\text{C}$). Дослідження показників КЛР проводили протягом 15 хв з моменту пункції на апараті мікро-Аступ фірми «Radiometer» (Данія). Ефективність лікування оцінювали за динамікою рівнів рН крові, парціального тиску вуглекислого газу ($p\text{CO}_2$), АВ (істинний бікарбонат), ВВ (сума всіх буферних систем крові), SB (стандартний бікарбонат), BE (дефіцит буферних основ) та рівня Ca^{2+} у сироватці крові. Статистичну обробку цифрових даних проводили методом варіаційної статистики з визначенням t -критерію Стюдента. Зміни показників вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Отримані дані представлені на рисунках 1, 2 та 3. Проведене дослідження показало, що у групі нелікованих тварин з ГПМК через добу після моделювання патологічного стану мали місце зміни показників КЛР, що за даними літератури [16, 18] можна характеризувати як ознаки декомпенсованого змішаного ацидозу (метаболічного та дихального) в ішемізованій півкулі головного мозку. На це вка-

зувало, перш за все, вірогідне зменшення показника рН венозної крові в контрольних гербел у середньому до $6,99 \pm 0,03$ проти $7,22 \pm 0,01$ у псевдооперованих тварин. Згідно з точкою зору вищезазначених дослідників, рН крові є величиною постійною, і коливання цього показника всього на 0,3–0,4 одиниці в будь-який бік, особливо в структурах головного мозку, де швидкість перебігу всіх метаболічних процесів напряму залежить від сталості КЛР, може призвести до незворотних змін у нейронах (запуск процесів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, апоптозу, некрозу та ін.).

Даний ацидоз є метаболічним, на що вказувало вірогідне відносно до псевдооперованих тварин зменшення концентрації буферних основ, а саме: АВ, SB, ВВ та BE у середньому відповідно на 44,1; 43,8; 28,7 та 188,8 % (рис. 1).

На метаболічний характер ацидозу вказували також зсув рН крові в кислий бік та дефіцит буферних основ (BE). Поряд із цим, у нелікованих тварин з ГПМК мало місце вірогідне відносно псевдооперованих тварин підвищення рівня $p\text{CO}_2$ у середньому на 15,2 %, що, згідно з точкою зору [8, 12], може бути ознакою як виснаження компенсаторних можливостей дихальної системи (некомпенсований ацидоз), так і розвитку диспноє за рахунок порушення діяльності дихального центру вна-

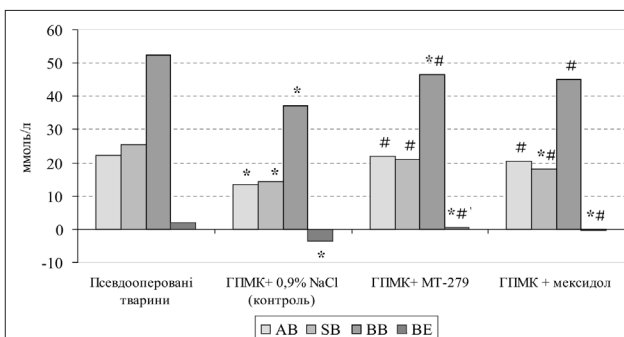
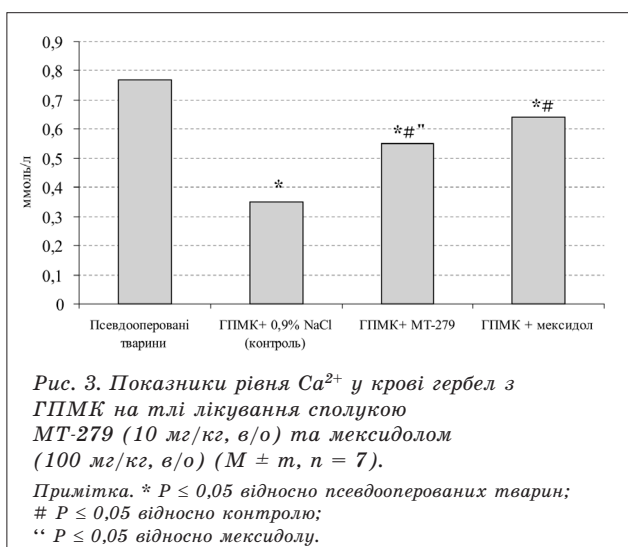
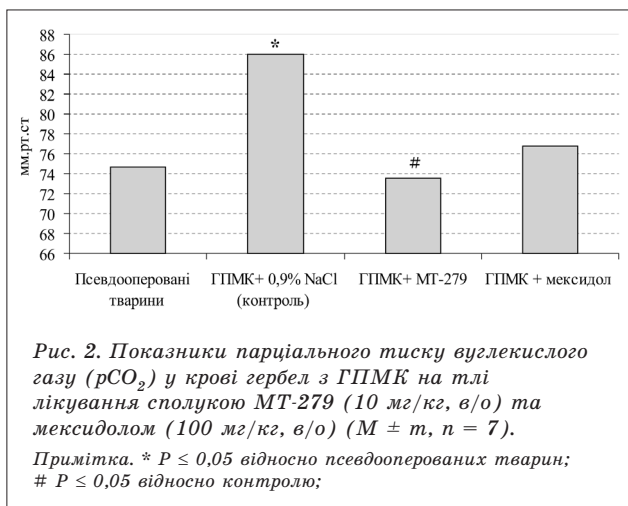


Рис. 1. Показники кислотно-лужної рівноваги в крові гербел з ГПМК на тлі лікування сполукою МТ-279 (10 мг/кг, в/о) та мексидолом (100 мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 7$).

Примітка. * $P \leq 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;

$P \leq 0,05$ відносно контролю;

** $P \leq 0,05$ відносно мексидолу.



слідок глобальної ішемії головного мозку.

Уведення гербелам з ГПМК сполуки МТ 279 (10 мг/кг) так само, як і мексидолу (100 мг/кг), вірогідно перешкоджало розвитку ознак ацидозу. Так, на тлі застосування даних речовин рН крові через 24 год після моделювання патології становив у середньому відповідно $7,21 \pm 0,02$ та $7,17 \pm 0,01$, не відрізняючись практично від значення даного показника у псевдооперованих тварин. Разом з цим на тлі лікування МТ-279, як і мексидолом, поряд із відновленням рівня рН крові, відмічалась нормалізація рівнів $p\text{CO}_2$ та буферних основ (рис. 1 та 2). Так, під впливом зазначених речовин, показник концентрації $p\text{CO}_2$ у венозній крові, що відті-

кала від ішемізованої півкулі гербел з ГПМК, статистично не відрізнявся від відповідного показника в псевдооперованих тварин. При цьому, на тлі МТ-279, як і під дією мексидолу, мало місце відновлення рівнів буферних основ АВ, SB, ВВ та ВЕ, що за величиною наближалися до фонових показників псевдооперованих тварин. Слід зазначити, що під впливом сполуки МТ-279 дефіцит буферних основ (ВЕ) був достовірно меншим, ніж під впливом мексидолу ($P \leq 0,05$). Зазначені зміни показників КЛР, викликані МТ-279 та мексидолом у крові гербел з ГПМК, на нашу думку, можуть свідчити про нормалізацію цими речовинами метаболічних процесів в ішемізованій півкулі та послаблення явищ ацидозу. Останній, як відомо, є тригерним фактором розвитку процесів оксидативного стресу, які у свою чергу, у кінцевому результаті призводять до загибелі нейрону як структурно-функціональної одиниці нервової тканини головного мозку [5, 8].

У ході даного експерименту було також встановлено, що субтотальна ішемія головного мозку в нелікованих гербел призводить до розвитку гіпокальціємії (рис. 3). Так, через 24 год у нелікованих тварин із ГПМК у венозній крові на боці ураження рівень Ca^{2+} був у 2,2 разу меншим порівняно із псевдооперованими тваринами ($P \leq 0,05$). Така динаміка досліджуваного іону в крові може свідчити про розвиток глутаматної «ексайтотоксичності» і надмірне накопичення та депонування Ca^{2+} у нейронах.

Лікувальне введення гербелам з ГПМК сполуки МТ 279 (10 мг/кг), як і мексидолу (100 мг/кг), перешкоджало розвитку гіпокальціємії: наприкінці курсу терапії рівень Ca^{2+}

у крові на тлі введення вказаних речовин був вищим відносно нелікованих тварин відповідно на 57 та 83 %, наближаючись до рівня псевдооперованих тварин.

Отримані дані щодо змін рівня Ca^{2+} можуть вказувати на те, що введення МТ-279, як і мексидолу, монгольським піщанкам з ішемією головного мозку зменшує явища глутаматної «ексайтотоксичності» протягом першої доби експерименту. Така дія досліджуваних речовин, на наш погляд, може сприятливо позначатись на розмірах зони ушкодженої ділянки головного мозку і свідчить про наявність у них церебропротекторного ефекту.

Таким чином, оцінюючи результати проведеного дослідження, можна зазначити, що похідному 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с]хіназолін-2-онів (сполуці – МТ-279) притаманна захисна дія на ішемізований головний мозок, що проявлялася нормалізацією показників КЛР та рівня Ca^{2+} у крові. Зазначені властивості досліджуваної сполуки, імовірно,

лежать в основі механізму її церебропротекторного ефекту.

Висновки

1. Лікувальне, тричі протягом доби, введення в організм гербел з односторонньою перев'язкою СА сполуки МТ-279 (10 мг/кг), як і мексидолу (100 мг/кг), викликає нормалізацію показників КЛР у крові, що відтікає із ішемізованої півкулі головного мозку.
2. Експериментальна терапія монгольських піщанок з ГПМК досліджуваними речовинами сприяє нормалізації рівня кальціємії.
3. За здатністю нормалізувати порушені показники КЛР та рівень кальціємії за умов ГПМК протягом першої доби сполука МТ-279 (10 мг/кг, в/о) співставляється з мексидолом (100 мг/кг, в/о).
4. Спроможність обох речовин зменшувати явища ацидозу та перешкоджати появі гіпокальціємії може свідчити про наявність у них нейропротекторного ефекту.

1. Антигипоксанта́ное действие фитоновоседа, силимара и мексидола после гипоксической гипоксии у крыс / Н. В. Кондакова, Л. Б. Стрелкова, М. Ф. Минева [и др.] // Человек и лекарство: XV конгр., 14–18 апреля 2006.: матер. конф.– Москва, 2006.– С. 639.
2. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / Биленко М. В.– М.: Медицина, 1989.– 368 с.
3. Викторов И. В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И. В. Викторов // Вестн. РАМН.– 2000.– № 4.– С. 5–9.
4. Вінничук С. М. Нейропротекція в гострий період мозкового інсульту: аналіз причин неефективності нейропротекторів при клінічних випробуваннях / С. М. Вінничук // Укр. мед. часопис.– 2008.– № 3 (65).– С. 4–11.
5. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова – М.: Медицина, 2001.– 328 с.
6. Експериментальні моделі ішемії головного мозку у фармакологічних дослідженнях / І. Ф. Беленічев, С. В. Горбачова, Н. В. Бухтіярова [та ін.] // Ліки.– 2006.– № 3–4.– С. 13–19.
7. Оглобина М. В. Фармакокорекція прооксидантно-антиоксидантного состояния производными тиазолидинового ряда в условиях острой цереброваскулярной недостаточности / М. В. Оглобина // Акт. питання фармакології: 4 науково-практична конференція з клінічної фармакології. Матеріали. Вінниця, 2004.– Ч. 2.– С. 103–104.
8. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник [та ін.].– Донецк.– Издатель Заславский А. Ю, 2009.– 261 с.
9. Степанюк Г. І. Скринінг церебропротекторної дії серед нових похідних 1,2,4 триазинохіназоліну в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку / Г. І. Степанюк, Л. І. Маринич, Г. Г. Берест, С. І. Коваленко // Фармакологія та лікарська токсикологія.– 2010.– № 1–2 (14–15).– С. 75–78.
10. Сучасні принципи діагностики та лікування хворих із гострими порушеннями мозкового кровообігу: метод. рекомендації / Ю. П. Зозуля, Волошин П. В., Міщенко Т. С. [та ін.].– Харків, 2007.– 61 с.
11. Хо́даківський О. А. Нейропротекторна дія похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну при експериментальній ішемії головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія»: Одес. держ. мед. ун-т.– Одеса, 2009.– 21 с.
12. Черний В. И. Острая церебральная недостаточность / В. И. Черный.– Донецк.– Издатель Заславский А. Ю, 2010.– 433 с.
13. Эволюция проблемы нейропротекции / Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол.– 2003.– Т. 66, № 2.– С. 32–37.

-
14. Этиология, патогенез, клиническая диагностика и лечение острых нарушений мозгового кровообращения / И. А. Измаилов, А. В. Иванова, И. Т. Косарева [и др.] // Русский мед. журн.– 2003.– Т. 11, № 10.– С. 28–34.
 15. Adibhatla R. J. Cytidine 5 -diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders / R. J. Adibhatla, J. R. Hatcher // J. Neurochem. Res, 2005.– V. 30.– P. 15–23.
 16. Kobayashi T. Ca^{2+} -channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia / T. Kobayashi, J. Mory // Eur. J. Pharmacol.– 1998.– V. 363.– P. 1–15.
 17. Nagakura A. Effects of a phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on microsphere embolism-induced and cerebral cyclic AMP signal transduction system in rats / A. Nagakura, J. M. Robert, M. Thomas // Br. J. Pharmacol.– 2002.– V. 135.– P. 1783–1793.
 18. Torp R. Differential expression of the glial glutamate transporters in the rat brain / R. Torp // Eur. J. Neurosci.– 2000.– V. 6, № 1.– P. 936–942.

**Г. И. Степанюк, Л. И. Маринич, А. А. Ходаковский,
С. И. Коваленко, Г. Г. Берест**

Влияние производного 6-замещенных 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с] хиназолин-2-онов (соединения МТ-279) на состояние кислотно-щелочного равновесия и уровень Ca^{2+} в крови гербел с моделью острого нарушения мозгового кровообращения

На модели острого нарушения мозгового кровообращения (односторонняя окклюзия общей сонной артерии) у гербел установлено, что производное 6-замещенных 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с]хиназолин-2-онов (соединение МТ-279, внутривенно 3 раза в сутки в дозе 10 мг/кг) так же, как и мексидол (100 мг/кг) проявляет признаки церебропротекторного действия. Это сопровождается нормализацией показателей кислотно-щелочного равновесия и уровня Ca^{2+} в крови, отменяющей от ишемизированного полушария головного мозга. По степени защитного эффекта на ишемизированный мозг соединение МТ-279 сопоставимо с референс-препаратом.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, производное 6-замещенных 3R-2H-[1,2,4]триазино [2,3-с]хиназолин-2-онов, мексидол, кислотно-щелочное равновесие

G. I. Stepanyuk, L. I. Marynich, O. A. Khodakivskiy, S. I. Kovalenko, G. G. Berest
The impact of derivative of 6-substituted 3R-2H [1,2,4] triazin (2,3-c) chinazolin-2-ons (compound MT-279) on the state of acid-alkaline balance and level Ca^{2+} in blood of herbels with model of acute ischemic brain

On the model of acute ischemic brain (unilateral occlusion of the common carotid artery) in herbels it was founded that derivative of 6-substituted 3R-2H [1,2,4] triazin (2,3-c) chinazolin 2-ons (compound MT-279) after three times daily intraperitoneal administration at dose of 10 mg/kg as well as meksidol at dose of 100 mg/kg showed signs cerebroprotectory action. This confirmed by normalization of indicators of acid-base balance and Ca^{2+} level in the blood that flowing from ischemic hemisphere of the brain. On the degree of protection effect on ischemic brain compound MT-279 is almost matched with reference drug.

Key words: acute ischemic brain, 6-substituted derivatives of 3R-2H [1,2,4] triazin (2,3-c) chinazolin 2-ons, meksidol

Надійшла: 10. 10.2011 р.

Контактна особа: Степанюк Г. І., докт. мед. наук, професор, зав. кафедри фармакології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56; м. Вінниця, 21018. Тел.: (432) 61-14-00.

І. С. Чекман, І. Ю. Яковлева, І. Ф. Беленічев,
Н. В. Бухтіярова, Н. О. Горчакова

Вплив таурину та пірацетаму на біохімічні показники в головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії

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

Ключові слова: таурин, пірацетам, циркуляторна гіпоксія, енергетичний обмін, антиоксидантна дія, мітохондрії

Цереброваскулярні захворювання досить широко розповсюджені в усьому світі та є одними з найнебезпечніших для населення. Високі показники летальності та інвалідизації хворих обумовлюють зацікавленість учених світу до цієї патології протягом останніх десяти років. Мозкові інсульти нерідко закінчуються смертю, повною або частковою втратою працездатності, значним зниженням якості життя хворих [1]. Виходячи із цього, надзвичайно важливим є попередження загибелі нервових клітин та захист їх від пошкодження за умов ішемії, відновлення порушеного кровопостачання при патологічних змінах кровообігу.

Перспективним напрямом первинної нейропротекції при церебральній ішемії є корекція дисбалансу збудливих та гальмівних нейротрансмітерних систем за допомогою нормалізації фізіологічних шляхів утворення енергії [2]. У зв'язку з цим, привертає увагу природний нейротрансмітер таурин [3]. Таурин згідно з сучасними класифікаціями належить до метаболічних та кардіологічних лікарських засобів [3–6]. Таурин поліпшує енергетичний обмін, АТФ-залежний зв'язок кальцію з сарколемою, за окремими даними має антигіпоксичний, нейропротекторний ефект при гемічній та гістотоксичній гіпоксії [7, 8]. У той самий час вірогідна нейропротекторна активність таурину при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) у щурів не встановлена [2]. Однією з загальноприй-

нятих моделей гіпоксії є циркуляторна гіпоксія, яка дозволяє вивчити вплив препаратів на різні ланки енергетичного метаболізму, тіол-дисульфідної системи та оксидативного стресу.

Мета дослідження – встановити нейропротективну дію таурину за біохімічними показниками у головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії в порівнянні з пірацетамом.

Матеріали та методи. Досліди проведені на 80 білих щурах обох статей стадного розведення лінії Вістар масою 220–240 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію при природній зміні дня і ночі. Модель циркуляторної гіпоксії відтворювалася згідно з Методичними рекомендаціями ДЕЦ МОЗ України [9]. В експериментах на білих щурах викликали двобічну оклюзію загальних сонних артерій, що призводило до ГПМК зі зменшенням мозкового кровообігу на 50–60 % та поступовим відновленням його до 85–90 % від вихідного рівня через 2–3 доби за рахунок компенсаторного включення колатерального кровообігу [10]. Досліджувані препарати вводили тваринам внутрішньоочеревино: таурин у дозі 100 мг/кг [11], пірацетам у дозі 500 мг/кг [12]. Евтаназію тварин проводили на 4-ту добу під легким ефірним наркозом. Для визначення біохімічних показників у гомогенаті тканини та мітохондріях головний мозок тварин гомогенізували та центрифугували за методами, описаними в [9]. Оцінку мітохондріальної дисфункції проводили шляхом спектрофотометричної реєстрації відкриття мітохондріальної пори при 540 нм (D_{540}), що була викликана набуханням мітохондрій, а також за збереженням заряду мітохондрій [13, 14]. Для оцінки

біоенергетичних процесів в окремих пробах гомогенату головного мозку визначали активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) і цитохром-С-оксидази (ЦХО) [15]. Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії [15]. Уміст малату та лактату в тканині мозку визначали методом Хохорста, визначення концентрації ізоцитрату проводили за методом Зибера [15]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за вмістом у мітохондріальній фракції маркерів окиснювального пошкодження білків – альдегідфенілгідрозонів (АФГ), кетонфенілгідрозонів (КФГ) та маркера окиснювальної модифікації нуклеїнових кислот 8-гідроксигуаніну (8-OHG) [16], а також за активністю мітохондріальної Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) [17]. Стан тіол-дисульфідної системи вивчали за концентрацією цистеїну та метіоніну й за вмістом гомоцистеїну в цитозольній фракції [18].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартного пакету аналізу програм статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excell 2003. Дані представлені у вигляді вибіркового середнього значення $\pm$ стандартної середньої похибки середнього значення. Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента та U-критерієм Уїтні-Манна (комп'ютерна програма «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5).

Результати та їх обговорення. Моделювання ГПМК призводить до стійких порушень енергетичного обміну в головному мозку. Зниження енергетичних ресурсів головного мозку відбувалося на фоні дискоординації реакцій циклу Кребса, про що свідчило зниження рівня малату, ізоцитрату, пригнічення активності СДГ та ЦХО в клітинах головного мозку. Спостерігалася компенсаторна активація гліколізу, про що свідчить збільшення лактату в тканинах мозку. Ці зміни відбувалися на фоні мітохондріальної дисфункції,

активації вільно-радикальних реакцій, порушень у тіол-дисульфідній системі та підвищення окиснених еквівалентів. Так, моделювання ГПМК пришвидшувало відкриття мітохондріальної циклоспорин-А-залежної пори та призводило до зниження мембранного потенціалу мітохондрій. Таурин, введений щурам з ГПМК, гальмував відкриття мітохондріальної пори в суспензії мітохондрій нейронів ішемізованого мозку на 18 % у порівнянні з контролем, дещо підвищував мембранний потенціал мітохондрій (рис. 1). Це свідчить про підвищення функціональної активності мітохондрій мозку тварин з ГПМК, яким вводили таурин, хоча й не спостерігали досягнення величин показників інтактних тварин. На відміну від таурину, пірацетам взагалі не впливав на вищезазначені показники.

При моделювання ГПМК відбувається стійке порушення енергетичного обміну. Дефіцит енергетичних ресурсів головного мозку щурів виникає на фоні дискоординації реакцій циклу Кребса, про що свідчить пониження активності СДГ та ЦХО.

Уведення таурину тваринам з ГПМК сприяло підвищенню активності СДГ у 1,78 разу та ЦХО в 2,77 разу ($P < 0,05$). Однак призначення таурину вірогідно не відновлювало енергетичну продукцію у головному мозку, спостерігалася лише тенденція до підвищення рівня АТФ (табл. 1).

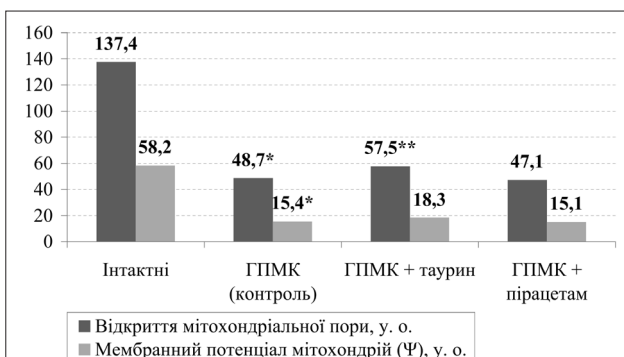


Рис. 1. Вплив таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на показники мітохондріальної активності в головному мозку щурів на 4-у добу ГПМК; $n = 20$.

Примітка. * $P < 0,05$ відносно інтактних тварин; ** $P < 0,05$ відносно групи тварин з ГПМК.

**Вплив таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг)
на показники енергетичного обміну в головному мозку щурів з ГПМК
на 4-у добу експерименту; n = 20**

Умови експерименту	Показник					
	АТФ, мкмоль/г	Лактат, мкмоль/г	Малат, мкмоль/г	Ізоцитрат, мкмоль/г	СДГ, мкмоль/хв · мг білка	ЦХО, мкмоль/хв · мг білка
Інтактні тварини	2,87±0,07	3,10±0,07	0,44±0,02	0,51±0,05	7,21±0,10	3,77±0,10
Тварини з ГПМК	1,11±0,15*	8,11±0,20*	0,14±0,03*	0,21±0,02*	2,31±0,15*	1,00±0,05*
Тварини з ГПМК + таурин	1,41±0,10**	7,17±0,18**	0,22±0,06**	0,31±0,03	4,12±0,10**	2,77±0,10**
Тварини з ГПМК + пірацетам	1,52±0,07**	15,70±0,14**	0,16±0,04*	0,23±0,03*	3,25±0,15**	1,21±0,15

Примітка. Тут та в табл. 2 і 3: * P < 0,05 відносно показників інтактних тварин;

** P < 0,05 відносно показників групи нелікованих тварин з ГПМК.

При моделюванні ГПМК спостерігалася гальмування окиснювальної продукції енергії, активація компенсаторного шляху утворення АТФ-гліколізу, який, однак, не забезпечує потребу мозку в енергії і викликає розвиток лактат-ацидозу. При цьому рівень малату й ізоцитрату в тканині знижувався. Таурин нормалізував показники гліколізу: вірогідно підвищував рівень малату в 1,57 разу (P < 0,05), сприяв зменшенню рівня лактату і викликав тенденцію до підвищення ізоцитрату. Пірацетам у тварин з ГПМК викликає помірну енерготропну дію, тому що препарат активує анаеробні реакції гліколізу, посилює явища лактат-ацидозу, не впливає на показники активності мітохондрій [12], тим самим стимулюю-

чи механізми ішемічного пошкодження мозку (табл. 1).

Уведення таурину сприяло пониженню рівнів маркерів окиснювальної модифікації білка – АФГ у 1,51 разу та КФГ у 1,89 разу в мітохондріальній фракції, підвищенню активності Мп-СОД у мітохондріях у 1,43 разу і зниженню в добовій сечі рівня маркера окиснювальної модифікації нуклеїнових кислот 8-OHГ у 1,38 разу (P < 0,05) (табл. 2). Це свідчить про позитивний вплив таурину на функціональну активність мітохондрій та інгібуючу дію щодо різних ланцюгів окислювального стресу. Таурин, на відміну від пірацетаму, має антиоксидантну дію, що підтверджено в наших попередніх роботах [12].

Встановлено також, що таурин при застосуванні тваринам з ГПМК призво-

Таблиця 2

**Вплив таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на показники
антиоксидантної системи в мітохондріальній фракції головного мозку
тварин з ГПМК на 4-у добу експерименту; n = 20**

Показник	Інтактні	ГПМК (контроль)	ГПМК + таурин	ГПМК + пірацетам
АФГ, у.о./г білка	5,3±0,3	21,3±1,2*	14,1±0,7**	19,3±1,1
КФГ, у.о./г білка	2,10±0,15	17,8±2,1*	9,4±0,5**	18,0±3,1
8-OHГ, нг/л	24,4±1,6	121,4±11,5*	87,4±3,2**	118,4±11,5
Мп-СОД, у.о./хв · мг білка	140,1±11,2	72,20±2,17*	103,7±4,2**	64,2±2,1

**Вплив таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на показники
тіол-дисульфідної системи; n = 20**

Умови експерименту	Показник		
	Цистеїн, мкмоль/г білка	Метіонін, мкмоль/г білка	Гомоцистеїн, мкмоль/г білка
Інтактні тварини	46,0±1,1	28,8±9,0	5,8±0,3
ГПМК	17,1±1,7*	15,6±2,1*	41,4±6,0*
Таурин + ГПМК	34,4±2,1**	26,1±1,2**	7,1±0,2**
Пірацетам + ГПМК	16,3±1,3*	14,0±2,7*	37,6±3,7*

див до підвищення вмісту амінокислот з відновленими тіоловими групами – цистеїну в 2 рази і метіоніну в 1,67 разу та зниження вмісту гомоцистеїну в 5,83 разу, що свідчить про регулюючий вплив препарату на тіол-дисульфідну рівновагу в головному мозку за умов ішемії ($P < 0,05$). Позитивний вплив на тіол-дисульфідну рівновагу, контроль за підвищеним утворенням окиснених еквівалентів – важлива ланка антиоксидантної дії таурину. Окисна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну, що спостерігається за умов ішемії мозку, призводить до порушення транспорту NO з утворенням його цитотоксичних дериватів (пероксинітриту, нітрозонію тощо) [12]. Підвищення під дією таурину активності тіолової антиоксидантної системи, здатної регулювати транспорт NO, забезпечує стійкість нейрона до нітрозуючого стресу – найбільш раннього нейродеструктивного механізму за умов ішемії [12]. Пірацетам вищезазначені показники не відновлював (табл. 3).

Таурин, проникаючи в мітохондрії, здатний попереджати інгібіцію мітохондріальної Mn-SOD гомоцистеїном і тим самим гальмувати «паразитарні» реакції утворення АФК у мітохондріях. Позитивна дія таурину на функціональну активність мітохондрій забезпечується за рахунок анти-

оксидантних ефектів, відновлення тіолових білків та регуляції активності мітохондріальної пори. Останній механізм можливо і є головним у нейропротективній дії даного лікарського засобу. Подібний факт можна пояснити тим, що таурин як кінцевий продукт обміну цистеїну має захисний ефект при пошкодженнях, що викликані гомоцистеїном [19].

Отримані результати не суперечать даним інших дослідників, які встановили, що таурин є метаболітотропним нейропротектором з антиоксидантним та енерготропним механізмом [6, 12].

Висновки

1. Таурин, на відміну від пірацетаму, при внутрішньоочеревинному введенні щурам з циркуляторною гіпоксією головного мозку в дозі 100 мг/кг гальмував відкриття мітохондріальної пори в суспензії мітохондрій нейронів ішемізованого мозку, і проявляв тенденцію до відновлення мембранного потенціалу мітохондрій.
2. Таурин, на відміну від пірацетаму, при внутрішньоочеревинному шляху введення щурам з циркуляторною гіпоксією головного мозку в дозі 100 мг/кг, відновлював показники гліколізу, циклу Кребса, антиоксидантної та тіол-дисульфідної систем.

1. Лукьянова Л. Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л. Д. Лукьянова // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2011. – № 1. – С. 3–19.
2. Вивчення ефективності мембранопротекторних засобів в умовах ішемічного та реперфузійного пошкодження мозку / В. П. Кутняк, Н. О. Горчакова, Т. В. Кава [та ін.] // Наук. вісник нац. мед. унів. ім. О. О. Богомольця. – 2008. – № 1. – С. 35–39.
3. Вислобоков А. И. Мембранотропное действие фармакологических средств / А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, П. А. Галенко-Ярошевский, П. Д. Шабанов. – Краснодар: Просвещение Юг, 2010. – 528 с.

4. Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе церебролизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, Е. И. Гусев [и др.] // Трудный пациент.– 2010.– № 2.– С. 25–31.
5. Чекман И. С. Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции / И. С. Чекман, Н. А. Горчакова, С. Б. Французова, Е. А. Нагорная.– К., 2009.– 155 с.
6. Taurine activates glycine and [gamma]-aminobutyric and A receptors in rat substantia gelatinosa neurons / J. Wu, T. Kohno, S.K. Georgiev [et al.] // Neuroreport.– 2008.– V. 19, № 3.– P. 333–337.
7. Нові шляхи патогенетичної корекції гемічної гіпоксії / І. М. Маньковська, А. І. Назаренко, В. І. Носар [та ін.] // Физиол. журн.– 1992.– Т. 38, № 2.– С. 43–47.
8. Бабак В. В. Фармакодинамика сочетанного применения сердечных гликозидов с цистеином, ацетилцистеином, таурином: Автореф. дис. канд. мед. наук / В. В. Бабак.– К.: Киев. мед. институт, 1990.– 22 с.
9. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов. Методические рекомендации / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев [и др.].– К., 2010.– 80 с.
10. Tyson G. W. Focal cerebral ischemia in the rat: Topography of hemodynamic and histopathological changes / G. W. Tyson, G. M. Teasdale, D. I. Graham, J. McCulloch // Ann. Neurol. –1984.– V. 15.– P. 559–567.
11. Таурин: стресс-протекторное действие в эксперименте / Т. В. Звягинцева, Л. Т. Киричек, А. С. Кратенко [и др.] // Эксперим. і клін. мед.– 2006.– № 3.– С. 33–36.
12. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник [и др.].– Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009.– 262 с.
13. Акопова О. В. Инструкция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс / О. В. Акопова, В. Ф. Сагач // Укр. биохим. журнал.– 2004.– Т. 76, № 1.– С. 48–50.
14. Lenartowicz E. Phenylarsine oxide induces the cyclosporine A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria / E. Lenartowicz, P. Bernardi, G. F. Azzone / J. Bioenerg. Biomembr.– 1999.– V. 23, № 4.– P. 679–688.
15. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): под ред. М. И. Прохоровой.– Л.: Изд-во Ленинградского ун-та 1982.– 272 с.
16. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. Gutteridge.– Oxford: Clarendon Press, 1985.– 346 p.
17. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Сеней // Лаб. дело.– 1988.– № 11.– С. 678–681.
18. Соколовский В. В. Тиодисульфидные соотношения крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В. В. Соколовский.– СПб, 1996.– 30 с.
19. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium / J. Hanna, R. Chahine, G. Aftimos [et al.] // Exp. toxicol. pathol.– 2004.– V. 50, № 3.– P. 189–194.

**И. С. Чекман, И. Ю. Яковлева, И. Ф. Беленичев,
Н. В. Бухтиярова, Н. А. Горчакова**

Влияние таурина и пирацетама на биохимические показатели в головном мозге крыс при циркуляторной гипоксии

Экспериментальными исследованиями на крысах установлено нейропротективное действие таурина при циркуляторной гипоксии по функциональной активности митохондрий, показателям гликолиза, цикла Кребса, антиоксидантной и тиол-дисульфидной систем.

Ключевые слова: таурин, пирацетам, циркуляторная гипоксия, энергетический обмен, антиоксидантное действие, митохондрии

**I. S. Chekman, I. Yu. Yakovleva, I. F. Belenichev, N. V. Buchtijarova,
N. A. Gorchakova**

Taurine and piracetam influences on the biochemical parameters in brain of rats with circulatory hypoxia

Taurine neuroprotective action on functional activity of mitochondrions, parameters of glycolysis, Krebs' cycle, antioxidant and thiol-disulfide systems has been established in brain of rats with circulatory hypoxia.

Key words: taurine, piracetam, circulatory hypoxia, energetic metabolism, antioxidant action, mitochondrions

Надійшла: 23.01.2012 р.

Контактна особа: Чекман І. С., завідувач кафедри фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, м. Київ.
Тел.: (44) 454-49-24.

О. О. Ярош

Особливості фармакокінетики нової антиепілептичної сполуки AGB-31 у півкулях головного мозку щурів

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

Ключові слова: антиепілептична сполука AGB-31, ВЕРХ, кров, фармакокінетика, півкулі головного мозку

Нейрофармакологія та неврологія, зокрема епілептологія, останнім часом розглядають великі півкулі головного мозку не як загальну ціль для лікарських засобів, а як окремі складові, роль кожної з яких у формуванні судомної відповіді на протиепілептичний препарат може суттєво відрізнятися в залежності від переважного функціонування лівої чи правої мозкової гемісфери при формуванні епілептичного вогнища [1, 5, 6, 9, 12, 13]. З одного боку, це викликано півкульною функціональною асиметрією й, відповідно, – організацією взаємодії між гемісферами мозку з визначенням домінуючої половини, неоднаковою проникністю та чутливістю нейронів різних мозкових півкуль до протиепілептичних препаратів (ПЕП). З іншого – у кожного фармакологічного засобу з групи протисудомних препаратів існують свої особливості фармакокінетики, тобто кожна антиепілептична сполука має різну здатність до перетину гемато-енцефалічного бар'єру (ГЕБ) у залежності від її хімічної структури, функціонального стану гісто-гематичних бар'єрів та особливостей різних вікових періодів [8, 11, 15, 17]. Відповідно, кожен протисудомний засіб може мати різну біодоступність та накопичення в окремих півкулях, неоднаковий розподіл, тонкощі метаболізму, швидкість виведення з головного мозку і його гемісфер і т. ін.

Звісно, таких даних бракує для вже добре відомих ПЕП, що застосовуються тривалий час у клініках та амбулаторно, і, звичайно, вони повністю від-

сутні для нових молекул ПЕП із групи монокарбаматів, до якої належить потенційний протисудомний препарат. Виходячи із цього була спланована серія досліджень, результати якої представлені в статті.

Мета роботи – дослідження динаміки абсорбції, розподілу, метаболізму та елімінації (APME) антиепілептичної сполуки AGB-31 у різних півкулях головного мозку щурів після її перорального введення.

Матеріали та методи. У роботі використані вирошені в стандартних умовах утримання у віварії ДУ «ІФТ НАМН України» 120 білих статевозрілих щурів обох статей масою 200–320 г. Тваринам через спеціальний металевий зонд перорально вводили досліджувану сполуку AGB-31 у розрахунку 100 мг/кг маси тіла з додаванням поверхнево-активної речовини Твін-80. Кров, праву та ліву півкулі головного мозку вилучали після декапітації тварин під ефірним наркозом через 0,5; 1; 2; 4; 5; 6; 8 та 10 год після введення досліджуваної сполуки.

Підготовку проб для хроматографування виконували в декілька етапів. Спочатку до проб крові додавали по 0,5–0,8 мл метанолу, а до подрібнених механічно тканин окремих півкуль мозку в такій самій кількості – хлороформ для осадження білково-ліпідних складових. Проби витримували протягом 5 хв при температурі 55 °C в ультразвуковій бані для суспендування, а потім вміст центрифугували протягом 30 хв при 8000 об/хв. При необхідності проби досушували, а сухий залишок розводили в рухомій фазі: суміш 0,5 % розчину мурашиної кислоти і 90 % – 10 % водний розчин ацетонітрилу за загальноприйнятими процедурами згідно з регламентами та методичними рекомендаціями [7, 10, 14, 16].

Детекцію та кількісне визначення AGB-31 здійснювали методом ВЕРХ за допомогою хроматомас-спектрометра «Agilent 1200» (США). Визначення проводили з використанням двох аналітичних колонок Rapid Resolution HT Cartridge 4,6×30 mm, 1,8 μm Zorbax SB-C18 та Agilent XDB-C18 4,6×50 mm 1,8 μm, з'єднаних послідовно. Об'єм ін'єкції становив 5 мкл, швидкість потоку – 1,0 мл/хв при температурі 45 °С. Рухома фаза H₂O – MeOH (50:50). Детектор G6130A Quadrupole LC/MS System, спосіб іонізації – електроспрей (ES) позитивних іонів (Positive Ion), метод реєстрації – SIM Method (238 m/z). Фрагментор 120, напруга на капілярі 4000 В, температура газу 250 °С, швидкість газу 12 л/хв, тиск розпилювача 35 psig. Загальна тривалість аналізу дорівнювала 8,5 хв.

Валідація методики хроматографічного визначення речовини AGB-31 у сироватці крові та тканинах мозку здійснювалася у відповідності з настановами та рекомендаціями з валідації аналітичних методик за статтями Державної Фармакопеї України (ДФУ) [2, 14].

Статистичну обробку отриманих цифрових даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Excel Microsoft Statistika 6,0, різницю вра-

жали достовірною при відповідності t-критерію Ст'юдента [3, 4, 14].

Результати та їх обговорення. Отримані результати дослідження свідчать, що після перорального введення початкова концентрація AGB-31 у крові досягла на 30-й хв у середньому $53,0 \pm 7,5$ нг/мл. У той самий період (30 хв) у півкулях мозку вона була значно нижчою і становила від 10,2 % (права півкуля) до 16,9 % (ліва півкуля), тобто, біодоступність до мозкових структур виявилася значно нижчою, ніж проникність у кров (табл. 1). При цьому в лівій півкулі початкова концентрація становила $9,0 \pm 1,6$ нг/г, а в правій вона була нижчою на 66,7 % і реєструвалася на рівні $5,4 \pm 1,4$ нг/г мозкової тканини. Тобто, можна констатувати, що початкове проникнення в мозок потенційного ПЕП AGB-31 відбувалося, у першу чергу, у ліву півкулю, а потім – у праву. Однак у подальшому, не дивлячись на все вищу концентрацію сполуки в крові, що піднялася до $76,4 \pm 11,3$ нг/мл, у мозкових півкулях накопичення залишалося значно нижчим, ніж у крові. Загальна концентрація сполуки в правій півкулі підвищилася майже в 4 рази, а в лівій – майже вдвічі. Тобто, попереднє превалювання накопичення сполуки в лівій півкулі в перші 30 хв у

Таблиця 1

Вміст сполуки AGB-31 у крові та півкулях мозку щурів після її введення тваринам у дозі 100 мг/кг маси

Показник	Концентрація AGB-31 у крові та півкулях мозку							
	Час після перорального введення сполуки (год)							
	0,5	1	2	4	5	6	8	10
Концентрація AGB-31 у крові (нг/мл)								
М	53,0	76,4	83,8	47,4	52,9	92,2	23,4	13,9
±m	7,5	11,3	20,8	11,3	5,3	10,5	3,6	2,1
Концентрація AGB-31 у правій півкулі мозку (нг/г тканини)								
М	5,4	20,7	16,8	4,8	4,7	11,8	1,2	0,7
±m	1,4	6,2	7,3	0,2	1,6	3,5	0,15	0,3
% до концентрації в крові	10,2	27,1	20,1	10,1	8,9	12,8	5,1	5,0
Концентрація AGB-31 у лівій півкулі мозку (нг/г тканини)								
М	9,0	16,4	16,1	7,3	4,3	14,9	0,97	0,47
±m	1,6	5,3	6,0	1,1	3,9	2,8	0,2	0,1
% до концентрації в крові	16,9	21,5	19,2	15,4	8,1	16,2	4,1	3,4
% до концентрації в правій півкулі	+66,7	-20,8	-4,2	+52,1	-8,5	+26,2	-19,2	-32,9

подальшому вирівнялося, уміст ПЕП-сполуки в правій півкулі був трохи більшим, ніж у лівій. Таке співвідношення зберігалося в період 1 і 2-ї год після введення препарату.

Через 2 год після перорального введення в мозкових структурах спостерігалось вирівнювання вмісту сполуки в обох півкулях. Так, на 2-й год у правій половині мозку вміст AGB-31 становив $16,8 \pm 7,3$ нг/г, а в лівій – $16,1 \pm 6,0$ нг/г тканини, тобто вміст сполуки ставав майже однаковим в обох півкулях.

Натомість, на 4-й год після перорального введення знову повторилася ситуація, яку спостерігали на початку: загальний вміст на 4-й год ставав значно нижчим не тільки в крові, але й в обох гемісферах, що можна розцінити як початок фази елімінації, коли процес екскреції сполуки з мозку став переважати проникнення до нього AGB-31. У цей період уміст протиепілептичної сполуки в лівій півкулі був на 52,1 % вищим, ніж його рівень у правій гемісфері.

Виведення сполуки зростало і в подальшому, зокрема, на 4-й та 5-й год у крові та півкулях мозку спостерігалось зниження її концентрації. У крові цей процес відбувався повільніше, а в півкулях мозку – швидше. Процес виведення був швидшим з правої півкулі, де концентрація AGB-31 знижувалася з $16,8 \pm 7,3$ нг/г до $4,8 \pm 0,2$ нг/г (тобто майже в 4 рази), у лівій гемісфері концентрація зменшувалася з $16,1 \pm 6,0$ нг/г до $7,3 \pm 4,1$ нг/г, тобто у правій півкулі швидкість виведення була майже вдвічі (–65,8 %) вищою за елімінацію сполуки з лівої півкулі (–45,3 %).

У подальшому, на 5-ту год після введення, процес перетину гісто-гематичного бар'єру і всмоктування ПЕП збільшувався, хоча і значно повільніше, ніж у попередній період, як у кров (кишково-гематичний бар'єр), так і в мозковій структурі (гемато-енцефалічний бар'єр), про що свідчить збільшення рівня сполуки в крові та тканинах півкуль мозку. Через 5 год рівень AGB-31 підвищувався в крові до $52,9 \pm 5,3$ нг/мл, а в півкулях він мав свої особливості:

зокрема, у правій гемісфері він залишався практично без змін у порівнянні з 4-ю год, у той час як у лівій продовжував знижуватися до $4,3 \pm 3,9$ нг/г мозкової тканини.

У цей період (5 год) процес накопичення сполуки в крові, тобто альфа-фаза, ще продовжувався, про що свідчило поступове підвищення вмісту AGB-31 з $47,4 \pm 11,3$ нг/мл до $52,9 \pm 5,3$ нг/мл. Той самий період для мозкових півкуль характеризувався закінченням всмоктування, і розпочиналася бета-фаза, оскільки спостерігалось утримання концентрації в правій мозковій півкулі на тому самому рівні, що і в попередній термін ($4,8 \pm 0,2$ нг/г до $4,7 \pm 1,6$ нг/г), а потім поступове зниження її концентрації в обох гемісферах. Це було більш виразним у мозковій тканині лівої півкулі, де вміст сполуки зменшився з $7,3 \pm 1,1$ нг/г до $4,3 \pm 3,9$ нг/г, тобто на 41,1 %. Такі зміни можуть свідчити про проходження в мозкових півкулях декількох процесів одночасно: з одного боку, зменшення швидкості накопичення і завершення всмоктування речовини з крові до мозку, з другого – початок періоду, коли швидкість виведення AGB-31 з тканин мозку в кров переважає всмоктування.

На 6-й год спостерігалось повторне підвищення концентрації сполуки як у крові, так і в мозкових півкулях. У цей термін у крові реєструвалось значне підвищення концентрації AGB-31 до рівня $92,2 \pm 10,5$ нг/мл, вищого за попередній пік на 2-й год після введення сполуки. Загалом концентрація сполуки в крові зростала майже на 75 % з 5-ї до 6-ї год.

У мозку також спостерігалось значне зростання вмісту сполуки AGB-31 у порівнянні з попереднім рівнем (5-а год). Так, у правій гемісфері концентрація зростала в 1,5 разу, а в лівій – тобто майже в 2,5 разу. Отже, у цей період підйом концентрації в мозкових півкулях був значно вищим, ніж у крові, що може свідчити про вищу тканинну біодоступність, а отже й таргетність сполуки до мозкової тканини, ніж до крові.

**Фармакокінетичні параметри протиепілептичної сполуки AGB-31
у правій та лівій півкулях головного мозку після перорального введення
щуром у дозі 100 мг/кг**

Статистичні показники	Фармакокінетичні параметри								
	T _{1/2} abs	T _{1/2} elim	K _{abs}	K _{el}	T _{Cmax}	C _{max}	V _d	CI	AUC
Права півкуля									
M	6,5	19,7	0,11	0,04	0,37	1,9	4533,8	195,5	1806,7
m	1,85	5,5	0,03	0,01	0	0,20	379,2	20,9	209,10
Ліва півкуля									
M	6,7	19,3	0,12	0,04	0,37	2,6	2799,2	109,2	2076,4
m	0,21	6,2	0,04	0,01	0,002	0,17	210,3	7,6	192,3
% до показників правої півкулі	+1,9	-1,9	+9,1	0	0	+33,3	-38,3	-44,1	+14,9
P ≤	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,05	0,05	0,5

Примітка. $P \leq 0,05$ – достовірні показники лівої півкулі відносно показників правої.

У подальшому, на 8-й та 10-й год, концентрація сполуки неухильно зменшувалася як у крові, так і, особливо, – у півкулях мозку. У ці терміни метаболізм та елімінація досліджуваної сполуки відбувалися швидко, її концентрація зменшувалася майже до межі визначення.

При математичному моделюванні кінетичних процесів, що відбувалися після проникнення протиепілептичної сполуки з крові в мозок, виявилось, що деякі параметри у лівій півкулі в певні терміни, суттєво ($P \leq 0,05$) відрізнялися один від одного (табл. 2).

Дані, наведені в таблиці 2, свідчать, що за показниками періоду напіввсмоктування ($T_{1/2abs}$) сполуки AGB-31 та періоду її напівелімінації ($T_{1/2elim}$) та константами цих показників гемісфери мозку практично не відрізняються. Однак, при більш ретельному визначенні фармакокінетичного профілю сполуки та його окремих показників, зокрема: досягнення максимальної концентрації в півкулях, показника розподілу по гемісферах (V_d) та швидкості виведення з них, а також інтегративного показника – площі під кривою концентрація-час (AUC) існують значні відмінності.

Наприклад, за порівнянням модельованого досягнення максимальної концентрації (C_{max}) показники лівої півкулі становили $2,6 \pm 0,17$ нг/г, у той час як у правій – $1,9 \pm 0,2$ нг/г,

тобто були вищими на 33,3 % ($P < 0,05$). Ще більша різниця спостерігалася між показниками розподілу (V_d) досліджуваної сполуки в півкулях мозку: він виявився достовірно вищим у правій півкулі, ніж у лівій: відповідно – $4533,8 \pm 379,2$ та $2799,2 \pm 210,3$, що складало різницю в 38,3 % ($P < 0,05$).

Швидкість виведення (CI) з мозкових півкуль сполуки AGB-31 була вищою на 44,1 % з правої гемісфери, ніж з лівої (відповідно $195,9 \pm 20,9$ нг/г та $109,2 \pm 7,6$ нг/г).

Інтегративний показник – площа під кривою концентрація-час (AUC), був майже на 15 % більшим ($P < 0,05$) у лівій мозковій півкулі, ніж у правій.

Висновки

1. Сполука «AGB-31» має тенденцію до першочергового, майже вдвічі вищого рівня, проникнення в ліву півкулю, ніж у праву.
2. Вищий рівень протиепілептичної сполуки в мозковій тканині лівої півкулі утримувався довше ніж у правій гемісфері.
3. Більша площа під кривою концентрація-час (AUC) сполуки AGB-31 реєструвалася в лівій півкулі, ніж у правій, що характеризувало більшу спрямованість або вищий афінітет сполуки до мозкової тканини лівої півкулі, ніж до правої.

1. *Александрин В. В.* Вейвлет-анализ локального кровотока в симметричных областях правого и левого полушарий крыс / В. В. Александрин // Матер. Всерос. конф. с межд. уч., Москва, 2–3.12.2010. – С. 6–9.
2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. Фармакоп. Центр». (1-е вид.). – Харків: PIPEГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – С. 58–67.
3. *Варфоломеев С. Д.* Биокинетика / С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
4. *Гельман В. Я.* Медицинская информатика: практикум / В. Я. Гельман. – СПб: Питер, 2001. – 480 с.
5. *Гринкевич Л. Н.* Молекулярно-генетические аспекты функциональной асимметрии и латерализации памяти / Л. Н. Гринкевич // Матер. Всерос. конф. с межд. уч. Москва 2–3.12.2010. – С. 16–20.
6. *Доброхотова Т. А.* Функциональная асимметрия и психопатология очаговых поражений мозга / Т. А. Доброхотова. – М.: Медицина, 1997. – 359 с.
7. *Фармакокинетика* / Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В., Сергеева С. А., Каркищенко В. Н. – Ростов-на-Дону: «Феникс», 2001. – 384 с.
8. *Кузнецов В. В.* Полушарные особенности реорганизации, метаболизма, морфологии мозга и церебральной гемодинамики у мужчин и женщин пожилого возраста, перенесших ишемический инсульт, в восстановительный период // Автореф. дисс. д. м. н. – Киев, 2006. – 31 с.
9. *Кузнецова С. М.* Полушарные особенности постинсультной реорганизации метаболизма и церебральной гемодинамики / С. М. Кузнецова. // Матер. Всерос. конф. с межд. уч., Москва, 2–3.12.2010. – С. 182–186.
10. Методичні рекомендації по доклінічному вивченню фармакокінетики лікарських засобів: під ред. М. Я. Головенко. – 1995. – 28 с.
11. *Моренков Э. Д.* Поведенческая асимметрия и распределение моноаминов, а также их метаболитов в структурах правой и левой сторон мозга крыс / Э. Д. Моренков, В. С. Кудрин // Матер. Всерос. конф. с межд. уч., Москва, 2–3.12.2010. – С. 33–37.
12. *Ногина С. П.* Особенности гемодинамического режима в правой и левой общих сонных артериях кошки / Ногина С. П., Саноцкая Н. В., Мацневский Д. Д. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1988. – Т. 5, № 4. – С. 414–417.
13. Прогностическая значимость особенностей межполушарной асимметрии пространственной синхронизации ЭЭГ при фокальной эпилепсии / Петряев В. А., Лаврова С. А., Золотухина А. Р., Растягаева О. Л. // Матер. Всерос. конф. с межд. уч., Москва, 2–3.12.2010. – С. 229 – 233.
14. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. Центр». 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – С. 187–214.
15. *Ярош А. К.* Особливості фармакокінетики ламотриджину у щурів різного віку / Ярош А. К., Мандзюк Я. П. // Ліки. – 2005. – № 1–2. – С. 85 – 89.
16. *Gaviraghi G.* Pharmacokinetic Challenges in Lead Optimization / Gaviraghi G., Barnaby R. J. and Pellegatti M. // Verona. – 2002. – V. 24 – P. 14–21.
17. Retention rate of levetiracetam in children with intractable epilepsy at 1 year / Peacke D., Mordekar S., Gosalakal J. [et al.] // Seizure. – 2007. – V. 16. – P. 185–189.

О. А. Ярош

Особенности фармакокинетики нового антиэпилептического соединения AGB-31 в полушариях головного мозга крыс

Экспериментами на крысах установлено, что биодоступность соединения AGB-31 в мозговые полушария обусловлена тенденцией к разной скорости проницаемости, в первую очередь, и более высокая концентрация соединения регистрировалась в левом полушарии, где она достигала почти вдвое более высокого уровня. Более высокая концентрация противозепилептического соединения в мозговой ткани левого полушария удерживалась дольше, чем в правой гемисфере. Большая площадь под кривой концентрация-время (AUC) AGB-31 регистрировалась в левом, чем правом полушарии, то есть, ткани левого полушария обладают более высоким аффинитетом к новому противозепилептическому соединению.

Ключевые слова: антиэпилептическое соединение АУВ-31, ВЭЖХ, фармакокинетика, кровь, полушария головного мозга

О. А. Iarosh

Pharmacokinetic features of a new antiepileptic compound AGB-31 in rat brain hemispheres

In experiments on rats it was founded that the bioavailability of new antiepileptic compound AGB-31 in the brain hemisphere tends to be different rates of permeability in the first place and a higher concentration of compound detected in the left hemisphere, where it reached almost twice as high. Higher concentrations of antiepileptic compound in brain tissue of the left hemisphere held longer than in the right hemisphere. Most of the area under the concentration-time curve (AUC) AGB-31 detected in the left than in the right hemisphere, i.e. tissue of the left hemisphere have more affinity for the new antiepileptic compound.

Key words: antiepileptic compound AGB-31, HPLC, pharmacokinetics, blood, brain hemispheres

Надійшла: 23.01.2012 р.

Контактна особа: Ярош О. О., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потье, 14, м. Київ, 03680. Тел.: (44) 456-42-56.

Н. І. Горбенко¹, Т. С. Звягіна¹, А. С. Шаламай²

Вплив таурин-вмісного препарату «Кратал» на розвиток діабетичної нефропатії в щурів

¹ДУ «Інститут проблем ендокринної патології
імені В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків

²НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ

Ключові слова: діабетична нефропатія,
таурин, Кратал

Діабетична нефропатія розвивається в третини хворих на цукровий діабет (ЦД) і є головною причиною всіх випадків кінцевої стадії ниркової недостатності [1]. Розвиток мікросудинної патології, що супроводжується підвищенням артеріального тиску, зниженням рівня клубочкової фільтрації та розвитком запальних процесів у нирках, обумовлює високий ризик інвалідизації та смертності внаслідок серцево-судинних захворювань [2].

На сьогоднішній основним індукуючим фактором у розвитку судинної патології у хворих на ЦД вважають гіперглікемічний стан. Пошкоджуюча дія підвищеної концентрації глюкози на стінку судин може реалізовуватися такими метаболічними шляхами: 1) посиленням поліолового шляху; 2) надмірним утворенням внутрішньоклітинних продуктів кінцевого глікозилювання; 3) підвищенням експресії рецепторів до них та активуючих лігандів; 4) активацією ізоформ протеїнкінази C; 5) посиленою індукцією гексозамінного шляху. Універсальним пусковим фактором усіх вищевказаних механізмів є надмірне утворення активних форм кисню в мітохондріях внаслідок гіперглікемії та підвищеного окиснення жирних кислот [3].

У зв'язку з тим, що на практиці досягнення близького до норми рівня глікемії супроводжується підвищенням ризику гіпоглікемічних станів, виникає необхідність у розробці специфічних препаратів, що блокують головні патофізіологічні процеси та ведуть до розвитку діабетичних мікросудинних ускладнень, незалежно від ступеня глікемічного контролю.

Таурин (2-аміноетансульфонова кислота) – вільна амінокислота, яка присутня в цитозолі клітин майже всіх органів ссавців. Основна кількість таурину надходить до організму з їжею, але він також може синтезуватися з цистеїну за участю декарбоксилази цистеїнсульфонілової кислоти. Таурин залучений до реалізації багатьох біологічних функцій, включаючи кон'югацію жовчних кислот; регуляцію осмотичного тиску в клітинах, стабілізацію фоторецепторних клітин сітківки та антиоксидантний захист [4].

На сьогодні накопичено велику кількість експериментальних даних про позитивні результати застосування таурину для запобігання розвитку діабетичних ускладнень, зокрема діабетичної нефропатії, викликаних довготривалою некомпенсованою гіперглікемією. Встановлено, що таурин у високих дозах запобігає розвитку функціональних та структурних порушень нирок у тварин зі стрептозотоциновим діабетом. Показано, що таурин знижує ступінь протеїнуриї, попереджує гіпертрофію клубочків та розвиток гломерулосклерозу, знижує рівень продуктів ліпопероксидації та трансформуючого фактора росту (TGF-1 β) у нирках, не впливаючи на рівень глюкози в крові [5].

Таким чином, існує теоретичне обґрунтування перспективності дослідження впливу препарату «Кратал», який містить таурин, на метаболічні порушення, що спричиняють розвиток діабетичної нефропатії.

Мета роботи – дослідження впливу таурин-вмісного препарату «Кратал» виробництва ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» на розвиток діабетичної нефропатії в щурів за умов абсолютної інсулінової недостатності.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар вагою 200–250 г. Діабет викликали одноразовим внутрішньоочеревинним уведенням стрептозотоцину в дозі 60 мг/кг маси тіла [6]. Через тиждень після індукції діабету тварин із базальною глікемією більш ніж 14 ммоль/л включали до експерименту. Кратал вводили перорально за допомогою зонда у вигляді водної суспензії в дозі 100 мг таурину на 1 кг маси тіла з першого дня експерименту протягом 8 тижнів. Контрольна група діабетичних щурів за аналогічною схемою отримувала плацебо. Тварин було розподілено на 3 групи: інтактний контроль; діабет + плацебо; діабет + Кратал.

Вплив Краталу на глікемічний контроль оцінювали за рівнем базальної глікемії та глюкозурії, а також за концентрацією фруктозаміну в сироватці крові [7].

Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) [8] у сироватці крові та гомогенаті нирки, малонового діальдегіду (МДА) [9] у гомогенаті нирки. Стан антиоксидантної системи захисту характеризували за вмістом відновленого глутатіону (ВГ) [10], а також за активністю ферментів – глутатіонпероксидази (ГПО) [11] і супероксиддисмутази в нирках (СОД) [12]. Вміст білка у гомогенатах тканин нирок оцінювали за методом Лоурі [13].

Рівень стабільних метаболітів окису нітрогену – NOx визначали в сироватці крові та сечі [14].

З метою верифікації мікросудинної патології в нирках щурів із індукованим стрептозотоциновим діабетом проводили гістологічне дослідження за допомогою світлової та електронної

мікроскопії [15]. Товщину гломерулярної базальної мембрани визначали за методом Hirose et al. [11].

Функціональний стан нирок характеризували за показниками добового діурезу, концентрації креатиніну [17] і сечовини [18] у сечі та сироватці крові, а також за рівнем мікроальбумінурії, яку визначали за допомогою ІФА-наборів фірми «Гранум».

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Для визначення характеру розподілу отриманих результатів дослідження використовували критерій Шапіро-Уїлка. У разі нормального розподілу проводили дисперсійний аналіз ANOVA, для множинного порівняння використовували критерій Н'юмена-Кейлса. Отримані дані надавали у вигляді середнього та похибки середнього [19].

Результати та їх обговорення. У результаті проведеного експерименту було встановлено, що застосування Краталу протягом двох місяців призводило до достовірного зниження базальної гіперглікемії на 30 % у порівнянні з діабетичним контролем (табл. 1).

Відомо, що концентрація фруктозаміну є індикатором не тільки глікемічного контролю за останній місяць, але й інтенсивності початкових реакцій неферментативного глікозилювання [20].

Уведення препарату в дозі 100 мг на 1кг маси тіла не впливало на процеси приєднання глюкози до білків (табл. 1).

Розвиток абсолютної інсулінової недостатності супроводжувався посиленням катаболічних процесів за умов відсутності інсуліну. Підтвердженням цьому було значне підвищення кон-

Таблиця 1

Вплив Краталу (100 мг/кг) на показники глюкозного гомеостазу в крові щурів зі стрептозотоциновим діабетом, ($X \pm S_x$, $n = 6$)

Показник	Інтактний контроль	Діабет + Плацебо	Діабет + Кратал
Базальна глікемія, ммоль/л	4,77±0,13	15,72±0,53 ¹	11,28±0,90 ^{1,2}
Фруктозамін, ммоль/л	1,83±0,12	3,19±0,31 ¹	3,23±0,22 ¹

Примітка. Тут і в табл. 2–4: ¹статистично значущі відмінності в порівнянні з показниками для групи «інтактний контроль», $P < 0,05$;

²статистично значущі відмінності в порівнянні з показниками для групи «діабет + плацебо», $P < 0,05$.

центрації сечовини в сироватці крові та сечі, що свідчить про посилений розпад білків (табл. 2). Уведення Краталу суттєво не впливало на концентрацію сечовини в сироватці крові та сечі (табл. 2).

Встановлено, що через два місяці після індукції діабету у тварин значно підвищується добовий діурез, що зумовлено зниженням реабсорбції води в ниркових каналцях за умов підвищеного осмотичного тиску, який створює висока концентрація глюкози в первинній сечі. Останнє підтверджується виразною глюкозурією, яку спостерігали в даній групі тварин (табл. 2). Застосування препарату знижувало добовий діурез та глюкозурію в діабетичних тварин, що корелює з поліпшенням глікемічного контролю під його впливом.

Характерною морфологічною ознакою діабетичної нефропатії є збільшення мезангіального матриксу та товщини гломерулярної базальної мембрани, що являється результатом змін в її біохімічному складі [21].

За допомогою електронної мікроскопії було показано, що в групі діабетичного контролю товщина гломерулярної базальної мембрани майже вдвічі пере-

вищувала аналогічні показники в інтактних тварин (табл. 3). При цьому товщина вищезазначених мембран у тварин, які отримували Кратал, практично не відрізнялася від контролю.

Слід зазначити, що ультраструктурні зміни в нирках діабетичних тварин корелюють із функціональними змінами в даному органі, зокрема, посиленням екскреції альбуміну та зниженням кліренсу креатиніну, який характеризує швидкість клубочкової фільтрації (табл. 3).

Встановлено, що застосування Краталу запобігає розвитку функціональної неповноцінності нирок, про що свідчила нормалізація кліренсу креатиніну та швидкості клубочкової фільтрації в діабетичних тварин. Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень, в яких відмічали запобігання клубочкової гіпертрофії, зниження проявів гломерулосклерозу та протеїнурії при застосуванні таурину в щурів зі стрептозотциновим діабетом [5].

На сьогодні відомо, що одним із основних патогенетичних механізмів діабетичних ускладнень є порушення окисно-відновлювального балансу – оксидативний стрес. Активні форми

Таблиця 2

Вплив Краталу (100 мг/кг) на функціональний стан нирок у щурів зі стрептозотциновим діабетом, ($\bar{X} \pm S_x$, n = 6)

Показник	Інтактний контроль	Діабет + Плацебо	Діабет + Кратал
Добовий діурез, мл	4,73±0,50	19,02±0,96 ¹	16,10±0,76 ^{1,2}
Глюкоза в сечі, ммоль/л	–	134,52±20,17 ¹	83,11±13,08 ^{1,2}
Сечовина в сечі, ммоль/л	174,03±13,82	338,65±19,95 ¹	309,34±22,09 ¹
Сечовина в сироватці крові, ммоль/л	6,5±0,53	25,1±1,59 ¹	26,91±3,14 ¹

Таблиця 3

Вплив Краталу (100 мг/кг) на кліренс креатиніну, рівень мікроальбумінурії та товщину базальної мембрани в самців щурів зі стрептозотциновим діабетом, ($\bar{X} \pm S_x$, n = 6)

Показник	Інтактний контроль	Діабет + плацебо	Діабет + Кратал
Креатинін в сечі, ммоль/л	17,38±1,52	3,45±0,20 ¹	5,88±0,61 ^{1,2}
Креатинін в сироватці крові, мкмоль/л	55,31±3,16	125,38±4,26 ¹	68,83±10,37 ²
Кліренс креатиніну, мл/хв	1,02±0,10	0,36±0,04 ¹	1,06±0,19 ²
Мікроальбумінурія, мкг/л	0,63±0,13	2,16±0,34 ¹	0,78±0,21 ²
Товщина базальної мембрани, мкм	0,197±0,009	0,357±0,005 ¹	0,203±0,009 ²

кисню, що утворюються внаслідок автоокиснення глюкози та кінцевих продуктів неферментативного глікозилювання, можуть, як безпосередньо пошкоджувати макромолекули клітин нирок, так і опосередковано впливати на процеси їхньої проліферації/апоптозу, через активацію РКСВІІ [3].

Виходячи з цього, було доцільним вивчення впливу Краталу на інтенсивність вільно-радикальних процесів та стан антиоксидантної системи в нирках тварин зі стрептозотоциновим діабетом.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що інтенсивність ПОЛ у нирках діабетичних тварин, яку оцінювали за рівнем ДК та МДА, була значно вищою в порівнянні з показниками в контрольній групі (табл. 4). Аналогічне посилення ПОЛ також спостерігали в сироватці крові діабетичних тварин, про що свідчило значне підвищення концентрації ДК (табл. 4).

Інтенсифікація процесів ПОЛ у нирках діабетичних тварин супроводжувалася зниженням рівня відновленого глутатіону, що є характерним для оксидативного стресу (табл. 4) [22].

У той самий час, активність ключових ферментів антиоксидантного захисту – СОД та глутатіонпероксидази у тварин з тривалим стрептозотоциновим діабетом підвищувалася в порівнянні з інтактним контролем.

У діабетичних тварин, які отримували Кратал, рівень ДК у нирках та сироватці крові був значно зниженим у порівнянні з групою плацебо, тоді як рівень МДА у нирках практично не від-

різнявся від показників у контрольній групі (табл. 4).

Показано, що рівень відновленого глутатіону в нирках тварин, які отримували Кратал, значно перевищував показники не тільки діабетичного, але й інтактного контролю.

У тварин, яким вводили Кратал, також спостерігали нормалізацію активності СОД, що може бути результатом зниження стимулюючої дії активних форм кисню. Активність іншого ферменту антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидази залишалась підвищеною незалежно від введення препарату, що може бути зумовлено високою концентрацією відновленого глутатіону, яку спостерігали при його застосуванні (табл. 4).

У результаті проведених досліджень було встановлено, що в групі діабетичних тварин, які отримували плацебо, рівень стабільних метаболітів окису нітрогену в сироватці крові та сечі був вищим у порівнянні з інтактним контролем (табл. 4). Останнє може бути пов'язане з розвитком оксидативного стресу, індукованого гіперглікемією, який спричиняє активацію стрес-чутливих сигнальних шляхів, зокрема, за участю ядерного фактора NF- κ B, що призводить до збільшення експресії індукцйбельної NO-синтази та гіперпродукції NO [3].

Застосування Краталу призводило до нормалізації рівня метаболітів окису нітрогену в сироватці крові та сечі діабетичних тварин, що, імовірно, зумовлено його здатністю пригнічувати розвиток оксидативного стресу за умов гіперглікемії.

Таблиця 4

Вплив Краталу (100 мг/кг) на показники оксидативного статусу та нітрозуючого стресу в самців щурів зі стрептозотоциновим діабетом, ($X \pm S_x$, $n = 6$)

Показник	Інтактний контроль	Діабет + плацебо	Діабет + Кратал
ДК в нирках, нмоль/мг білка	0,16 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,04 ¹	0,38 $\pm$ 0,06 ^{1,2}
ДК в сироватці крові, мкмоль/л	1,50 $\pm$ 0,17	5,15 $\pm$ 0,35 ¹	3,2 $\pm$ 0,26 ^{1,2}
МДА в нирках, нмоль/мг білка	0,57 $\pm$ 0,04	1,51 $\pm$ 0,12 ¹	0,87 $\pm$ 0,07 ²
ВГ в нирках, нмоль/мг білка	59,83 $\pm$ 4,93	32,67 $\pm$ 6,86 ¹	90,04 $\pm$ 5,63 ^{1,2}
СОД в нирках, у.о./мг білка	10,11 $\pm$ 1,61	28,07 $\pm$ 2,87 ¹	10,75 $\pm$ 1,78 ²
ГПО в нирках, нмоль/мин · мг білка	79,60 $\pm$ 6,88	109,33 $\pm$ 3,57 ¹	138,94 $\pm$ 10,57 ¹
NO _x в сироватці крові, мкмоль/л	33,79 $\pm$ 0,17	55,47 $\pm$ 4,71 ¹	34,25 $\pm$ 2,32 ²
NO _x в сечі, мкмоль/л	70,89 $\pm$ 4,49	100,68 $\pm$ 7,48 ¹	72,60 $\pm$ 2,41 ²

Висновки

Показано, що застосування таурин-вмісного препарату Кратал протягом двох місяців сприяє зниженню базальної гіперглікемії, глюкозурії, нормалізації кліренсу креатиніну та швидкості клубочкової фільтрації, ослабленню оксидативного та

нітрозуючого стресу в нирках, гальмуванню виразності мікроальбумінурії та морфоструктурних змін у нирках діабетичних тварин.

2. Отримані дані обґрунтовують перспективність використання Краталу для профілактики та лікування діабетичної нефропатії.

1. Maric C. Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy [Text] / C. Maric, J. E. Hall // Contrib. nephrol. – 2011. – V. 170. – P. 28–35.
2. Паньків В. І. Цукровий діабет, переддіабет і серцево-судинні захворювання. Аналіз рекомендацій Європейського товариства з кардіології (ESC) і Європейської асоціації з вивчення діабету (EASD) [Текст] / В. І. Паньків // Практична ангіологія. – 2007. – № 2. – С. 6–8.
3. Giacco F. Oxidative stress and diabetic complications [Text] / F. Giacco, M. Brownlee // Circ. Res. – 2010. – V. 107, Suppl. 9. – P. 1058–1070.
4. Chesney R. W. Taurine and the renal system [Text] / R. W. Chesney, X. Han, A. B. Patters // JBS. – 2010. – V. 17, Suppl. 1. – P. 1–4.
5. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy [Text] / S. Lin, J. Yang, G. Wu [et al.] // JBS. – 2010. – V. 17, Suppl. 1. – P. 41–46.
6. Лапчинская И. И. В центре внимания нефрологов диабетическая нефропатия [Текст] / И. И. Лапчинская // Здоров'я України. – 2004. – № 91. – С. 27–28.
7. Fructosamine test-plus, a modified fructosamine assay evaluated [Text] / J. Baker [et al.] // Clin. Chem. – 1991. – V. 37, № 4. – P. 552–556.
8. Сопоставление различных подходов к определению перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови [Текст] / И. А. Волчегорский [и др.] // Вопросы мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127–131.
9. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты [Текст] / И. Д. Стальная, Г. Л. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – 1977. – С. 66–68.
10. Определения содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) [Текст] : учеб. пособие / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – С. 183–187.
11. Биохимические исследования в токсикологическом эксперименте [Текст] / под ред. М. Ф. Савченкова, В. М. Прусакова. – Иркутск : Изд-во Иркутского университета, 1990. – С. 110–119.
12. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма [Текст] : метод. рекомендации; [авт. А. В. Арутюнян и др.]. – С. Пб, 2000. – 104 с.
13. Miller, G. L. Protein determination for large numbers of samples [Text] / G. L. Miller // Analyt. Chem. – 1959. – V. 31, № 5. – P. 964–966.
14. Орлова Е. А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной почечной недостаточности [Текст] / Е. А. Орлова // Укр. Журн. Экспер. медицины. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 79–82.
15. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники [Текст] / Г. А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленинградское отделение, 1969. – 424 с.
16. Development of glomerular lesions in experimental longterm diabetes in the rats [Text] / K. Hirose, R. Osterby, M. Nosava [et al.] // Kidney Int. – 1982. – V. 21. – P. 689–695.
17. Van Pilsen, J. F. Effect of various protein precipitants on recoveries of creatinine added to plasma [Text] / J. F. Van Pilsen, M. Bovis // Clin. Chem. – 1957. – V. 3. – P. 90.
18. Breinek P. Determination of urea using diacetylmonoxim without deproteinization in a sulfuric acid medium [Text] / P. Breinek, J. Bouda // Vnitri lek. – 1970. – P. 186.
19. Гланс С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланс ; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
20. Kostolanska J. Monitoring of early and advanced glycation in relation to the occurrence of microvascular complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus [Text] / J. Kostolanska, V. Jakus, L. Barak // Physiol. Res. – 2009. – V. 58. – P. 553–561.
21. Yurchenko P. D. Development and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly [Text] / P. D. Yurchenko, B. L. Patton // Curr. Pharm. Des. – 2009. – V. 15, Suppl. 12. – P. 1277–1294.
22. Livingstone C. Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications [Text] / C. Livingstone, J. Davis // Br. J. Diabetes Vasc. Dis. – 2007. – V. 7. – P. 258–265.

Н. И. Горбенко, Т. С. Звягина, А. С. Шаламай

Влияние таурин-содержащего препарата «Кратал» на развитие диабетической нефропатии у крыс

Исследовано влияние таурин-содержащего препарата «Кратал» на развитие диабетической нефропатии у самцов крыс со стрептозотоциновым диабетом. Установлено, что таурин-содержащий препарат способствует снижению базальной гликемии, глюкозурии, нормализации клиренса креатинина и скорости клубочковой фильтрации, ослаблению оксидативного и нитрозирующего стресса в почках, тормозит выраженность микроальбуминурии и морфоструктурных изменений в почках животных с диабетом. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего использования таурин-содержащего препарата для профилактики и лечения диабетической нефропатии.

Ключевые слова: диабетическая нефропатия, таурин, Кратал

N. I. Gorbenko, T. S. Zvyagina, A. S. Shalamay

The impact of taurine-containing drug «Kratall» on diabetic nephropathy development in rats

The effect of taurine-containing drug «Kratall» on the diabetic nephropathy development has been investigated in rats with streptozocin-induced diabetes. It has been established taurine-containing drug reduces basal glucose, glucosuria, improves creatinine clearance, glomerular filtration rate, inhibits development of oxidative and nitrosative stress. These data are the base for further taurine-containing drug application for prevention and treatment of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy, taurine, Kratal

Надійшла: 13.12.2011 р.

Контактна особа: Горбенко Наталія Іванівна, докт. біол. наук, ст. наук. співр., завідувач лабораторії біохімічних досліджень, ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В. Я. Данилевського НАМН України», вул. Артема, 10, м. Харків, 61002. Тел.: (57) 700-45-36. E-mail: admin@iper.com.ua

Т. В. Новохацька¹, С. М. Тишкін¹, В. Є. Досенко², І. В. Іванова¹,
Н. В. Добреля¹, А. І. Соловійов¹

Пригнічення експресії гена дельта ізоформи протеїнкінази C усуває судинні порушення в щурів з генетично детермінованою гіпертензією

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

²Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, м. Київ

Ключові слова: дельта ізоформа протеїнкінази C, РНК-інтерференція, гладенькі м'язи, $ВК_{Ca}$ канали, артеріальна гіпертензія

Порушення моторики судинної стінки та, як наслідок, артеріальна гіпертензія продовжує домінувати серед серцево-судинних захворювань та основних причин смертності та втрати працездатності населення. На даний час стало зрозумілим, що головна, якщо не вирішальна, роль у розвитку гіпертонусу судин та вазоспазму належить місцевим регуляторним механізмам, локалізованим на рівні ефекторних елементів, тобто ендотелію та гладеньких м'язів (ГМ) судинної стінки. Головними факторами, що визначають судинну дисфункцію при розвитку артеріальної гіпертензії є зменшення ендотелій-залежного розслаблення і підвищення констрикторної здатності судинної стінки. Встановлено, що ці аномалії супроводжуються зменшенням активності кальцій-залежних калієвих каналів великої провідності як в ендотеліальних, так і в ГМ клітинах [6, 10]. Аналогічні результати було отримано нами при вивченні розвитку артеріальної гіпертензії на експериментальній моделі опромінених щурів. Дані літератури свідчать, що такі порушення характерні для різних типів артеріальної гіпертензії і є спільною визначною рисою цього патологічного процесу. Нещодавно було продемонстровано, що гіпертензивний стан характеризується підвищеною чутливістю скоротливого апарату до кальцію, що теж може бути однією із причин розвитку гіперскоротливості судин [14].

Результати чисельних досліджень свідчать про те, що протеїнкіназа C (ПКС) є одним із ключових факторів, що беруть участь у регуляції міогенного тонусу стінки кровоносних судин [5]. ПКС-опосередковані шляхи альтерації Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату гладеньких м'язових клітин (ГМК), активності іонних каналів сарколеми та ендотелій-залежної регуляції судинного тонусу, залучені до формування багатьох патологій серцево-судинної системи [3, 11]. Як збільшення кальцієвої чутливості міофіламентів, так і зменшення ефективності NO-залежного механізму розслаблення, можуть відбуватись у результаті збільшення активності ПКС [15, 16]. Останні дані свідчать, що в розвиток серцево-судинних дисфункцій, які супроводжують підвищення артеріального тиску, залучена δ -ізоформа ПКС, хоча достеменно її роль та вклад у формування цього патологічного стану не встановлені, проте показано, що її експресія/активність збільшується за даних умов [12, 20].

Для пригнічення активності δ -ізоформи ПКС у судинній стінці та встановлення можливості нормалізації судинної функції була застосована технологія РНК-інтерференції – один з найсучасніших високоспецифічних методів цільової генотерапії, суть якої полягає в пригніченні експресії певного гена на стадії трансляції чи порушення його транскрипції (пост-транскрипційний сайленсинг) [9, 13].

Мета дослідження – встановлення ефективності блокування експресії гена δ -ізоформи ПКС (δ ПКС) за допомогою малих інтерферуючих РНК (міРНК) та оцінка можливості корекції судинної

дисфункції в щурів з генетично детермінованою гіпертензією.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на статевозрілих самцях (250–300 г) щурів лінії Вістар, які були розділені на 3 групи: 1 – контрольна група, 2 – щури з генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ), 3 – щури з ГДГ після застосування міРНК. Усі досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях, та були ухвалені комітетами з етики обох інститутів.

Ізоляція гладеньком'язових клітин аорти щура. Гладеньком'язові клітини виділяли з попередньо очищеної від сполучної тканини й витриманої протягом 5–10 хв у безкальцієвому розчині Кребса торакальної аорти. Склад розчину: (в ммоль/л) 140 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 MgCl₂, 11,5 глюкози, 10 HEPES (pH 7,4). Сегмент аорти 1,0–1,5 см довжиною розрізали на шматочки розміром 2x2 мм, які інкубували протягом 33 хв при температурі 37 °C у номінально безкальцієвому розчині Кребса з додаванням колагенази тип ІА (2 мг/мл), пронази Е (0,5 мг/мл), сироваткового альбуміну бика (2 мг/мл). Потім шматочки відмивали від ферментів у безкальцієвому розчині, клітини виділяли шляхом багаторазового піпетування. Міоцити, які зберігалися в холодильнику при температурі +5 °C, залишалися у функціональному стані протягом 4 год.

Електрофізіологія. Вихідні трансмембранні струми вимірювали за допомогою методу фіксації потенціалу в модифікації «whole-cell perforated patch» із використанням антибіотика амфотерицину В. Реєстрацію іонних струмів проводили за допомогою підсилювача Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., USA), аналого-цифрового перетворювача (АЦП) Digidata 1200B (Axon Instruments Inc., USA) та програмного забезпечення pClamp Software (V.6.02, Axon Instruments Inc., USA). Сигнал з виходу підсилювача надходив через фільтр низьких частот (частота зрізу 2 кГц) на АЦП і оцифровувався з частотою дис-

кретизації 10 кГц. Типові значення мембранного опору клітин у наших експериментах складали 2–5 ГОм. Макроскопічні струми були нормалізовані до пА/пФ. Індиферентний Ag-AgCl-електрод було розміщено безпосередньо в камері для клітин об'ємом 200 мкл.

Мікропіпетки виготовляли з боросилікатного скла (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England) та заповнювали розчином наступного складу (у ммоль/л): 140 KCl; 10 NaCl; 1,2 MgCl₂; 10 HEPES; 2,5 CaCl₂; 11,5 D-глюкоза (pH 7,3); амфотерицин В 250 мкг/мл. Опір піпеток становив 2,5–5 МОм. Зовнішній розчин містив (у ммоль/л): 140 NaCl; 5,9 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,2 MgCl₂; 10 HEPES; 11,5 D-глюкоза (pH 7,4).

Виділення РНК. Загальну РНК виділяли з торакальної аорти щура за допомогою набору Trizol RNA-prep (Isogen). Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA). Комплементарну ДНК синтезували з використанням Random hexamer праймера та зворотної транскриптази RevertAid™ H Minus (Fermentas, Литва) на однаковій кількості тотальної РНК (1,2–1,5 мкг).

ПЛР у реальному часі в термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System проводили в об'ємі 10 мкл реакційної суміші SYBR Green PCR Master Mix, яка містила по 30 пмоль праймерів для відповідних генів: PKC delta-S-5'- CTG GAA TAG TGA GCT CCC AGA C -3', PKC delta-A-5'- ATC ACC AGT CAC CCA CTC TTC T -3', beta-actin-S-5'- TCA TCA CTA TCG GCA ATG AGC -3' та beta-actin-A-5'- GGC CAG GAT AGA GCC ACC A-3'. Об'єм зразків було доведено до 20 мкл деіонізованою водою.

РНК для специфічного сайленсингу гена PRKCD були синтезовані на замовлення фірмою Metabion (Німеччина) і мали наступну послідовність нуклеотидів: PKC delta-S-5'-GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU-3' та PKC delta-A-5'-GAU UGC AAA GUA CCU UUC CUU-3'. Дволанцюгові РНК отримували перед дослідом наступним чином: розчини відповідних сенсових і антисенсових олігонуклеотидів розводили в два рази

за допомогою буфера для анелінгу, який містив (у ммоль/л): 100 KCl, 2 MgCl₂, 50 NH₄Ac, 30 HEPES-KOH (pH 7,4). В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і вдвічі менший об'єм буфера. Отриману суміш інкубували протягом 1 хв при 90 °C і протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури в термоциклері «GeneAmp System 2700». Дворазове введення специфічних до матричної РНК δПКС дволанцюгових РНК здійснювали у хвостову вену щурів у кількості 25 мкг з 24-год інтервалом.

Скорочувальна активність аорти щура. Для вивчення скорочувальної активності аорту видаляли та розміщували в препарувальній чашці зі стандартним буферним розчином Кребса при кімнатній температурі. Частину аорти довжиною 1,0–1,5 см ретельно очищували від сполучної тканини і розрізали на кільця шириною 0,5–1,0 мм. Кільцеві фрагменти аорти монтували в проточній термостабілізованій камері об'ємом 0,5 мл при температурі 37 °C на сталевих гачках у ізометричному режимі за вихідного навантаження 10–20 мН, та перфузували сольовим буферним розчином Кребса (pH – 7,4) з постійною швидкістю 2,5–3,0 мл/хв. Вихідне тонічне скорочення ізольованих фрагментів судин викликали введенням у перфузуючий розчин артеренолу в концентрації 10⁻⁵ моль/л. Реєстрацію скорочень здійснювали за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax 4/16 (World Precision Instruments, USA), з'єданого з персональним комп'ютером. Ендотелій-залежне розслаблення викликали ацетилхоліном (10⁻⁹–10⁻⁵ моль/л), який додавали в перфузуючий розчин (зміну концентрації ацетилхоліну здійснювали протягом 10–15 с).

Реєстрація артеріального тиску в щурів. Виміри артеріального тиску проводили неінвазивним шляхом у хвостовій артерії щурів з генетично детермінованою гіпертензією протягом 7 діб після РНК-інтерференції. Для цього був використаний вимірювальний комплекс Sphygomanometer S-2 («HSE», Німеччина). Слідкування за наявністю пульсацій проводили за допомогою

осцилоскопа НМ 303-4 («HAMEG GmbH», Німеччина).

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Origin 7.5 (Microcal Software Inc.) з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) та методу Т'юкі за наявності достовірної різниці. Різниця вважалась статистично достовірною при P < 0,05. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Аналіз результатів «whole-cell perforated patch» експериментів було проведено за допомогою програмного забезпечення pCLAMP версія 6.02 (Axon Instruments Inc., США).

Результати та їх обговорення. Головними показниками збільшення судинного тону при розвитку артеріальної гіпертензії (АГ) є ослаблення дилаторного контролю ендотелію з відповідним зменшенням ендотелій-залежних реакцій у відповідь на стимуляцію ендотелію розслаблюючими агентами, такими, наприклад, як ацетилхолін, та збільшення скорочувальної спроможності гладеньком'язових клітин (ГМК) судин.

Скорочувальна активність судинних ГМК пов'язана, перш за все, з сумарною калієвою провідністю клітинної мембрани, що значною мірою визначається провідністю ВК_{Ca} каналів, стан яких, у свою чергу, корелює з активністю ПКС [21]. Відомо, що розвиток артеріальної гіпертензії супроводжується гіперактивацією ПКС та зменшенням активності ВК_{Ca} каналів [2]. Показано, що блокада ПКС за допомогою селективних інгібіторів челеритрину та стауроспорину призводить до нормалізації певною мірою скоротливої функції судинної стінки [17]. Останнім часом з'являється все більше доказів, що поряд з іншими факторами у формуванні гіпертензивного стану бере участь δ-ізоформа ПКС. Встановлено, що підвищення рівня експресії δПКС спостерігається в аорті щурів з генетично-детермінованою гіпертензією, при старінні порушення реактивності коронарних артерій супроводжуються пригніченням експресії мРНК δПКС [7, 8].

Наші зусилля були спрямовані на встановлення ролі та вкладу в розвиток АГ саме цієї ізоформи родини ПКС. Мета дослідження – встановлення можливості нормалізації підвищеного тиску, констрикторної активності та усунення іонної каналопатії в щурів із ГДГ, використовуючи малі інтерферуючі РНК (міРНК) з метою посттрансляційного сайленсингу гена δ ПКС. Завдання даного дослідження – проаналізувати на моделі ГДГ зміни судинного тону, активність інтегральних трансмембранних струмів та експресії гена PRKCD у ГМК судин при блокуванні експресії δ ПКС. Нещодавно розроблений метод РНК-інтерференції є потужним засобом для високо специфічного пригнічення гена-мішені за допомогою селективної деградації відповідної матричної РНК [9, 13]. Інтерферуючі міРНК вводили безпосередньо в кров'яне русло без застосування додаткових РНК-носіїв. Є дані, що, не зважаючи на швидке руйнування міРНК у крові, такий метод введення дозволяє досягти бажаного ефекту інтерференції [18], тому мірою доцільності застосування такої схеми експерименту є наявність або відсутність ефекту.

За допомогою молекулярно-біологічного методу «кількісна ПЛР у реальному часі» (РЧ-ПЛР) було визначено відносні рівні експресії мРНК δ -ізоформи ПКС в аорті контрольних щурів – $11,80 \pm 1,71$, щурів з ГДГ – $43,6 \pm 6,35$ та щурів із ГДГ після введення міРНК δ ПКС – $33,80 \pm 1,27$ (рис. 1.). РЧ-ПЛР експерименти показали вірогідне зниження рівня експресії мРНК δ ПКС у ГМК аорти тварин, оброблених міРНК, у порівнянні зі щурами з ГДГ. Це чітко підтверджує факт здійснення РНК інтерференції, хоча слід зазначити, що отриманий рівень експресії значно і вірогідно перевищує цей показник у здорових тварин, що може бути пов'язано з недостатньою ефективністю інтерференції внаслідок малої біодоступності міРНК.

Встановлено, що судини щурів із ГДГ знаходяться в стані гіперскоротливості, що характеризується зниженим дилататорним ендотеліальним контро-

лем та зменшеною функціональною активністю BK_{Ca} каналів та підвищеним артеріальним тиском [1].

Наші експерименти були спрямовані на вивчення можливого коригуючого впливу сайленсингу гена ПКС на стан скоротливості судин з реєстрацією саме цих показників.

Насамперед було встановлено вплив сайленсингу гена ПКС на артеріальний тиск щурів. Було з'ясовано, що вже на 1-у добу після введення міРНК щурам з ГДГ виявляється достовірне зменшення систолічного тиску – з $156,0 \pm 1,8$ мм рт. ст. ($n = 8$) до $136,0 \pm 3,2$ мм рт. ст. ($n = 8$), $P < 0,05$ (рис. 2.). Протягом наступних 7-ми діб тиск суттєво не змінювався і залишався на рівні близько 135 мм рт. ст.

Добре відомо, що артеріальний тиск значною мірою визначається станом скоротливості гладеньких м'язових клітин судинної стінки, рівень скорочення яких регулюється внутрішньоклітинною концентрацією кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), що надходить у клітину через активовані потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу [4]. Значну роль у регуляції Ca^{2+} -гомеостазу відіграють BK_{Ca} канали. Зменшення функціональної активності BK_{Ca} каналів може призвести до деполяризації мембрани клітини, неконтрольованого росту внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та виникнення гіперскоротливості м'язових клітин. Функціональний стан провідності

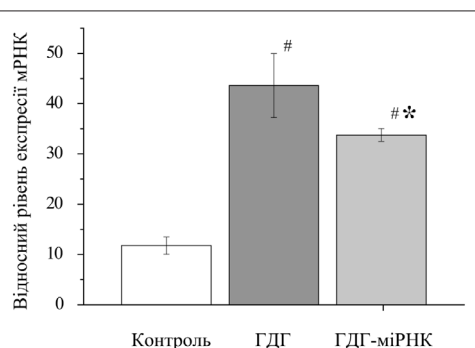
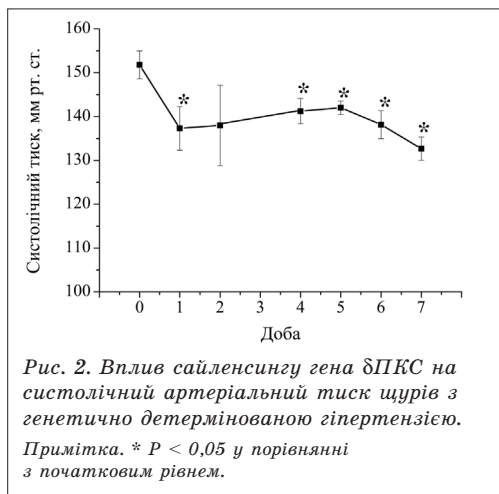


Рис. 1. Вплив РНК інтерференції на рівень мРНК дельта ізоформи ПКС у гладеньком'язових клітинах аорти щурів із генетично детермінованою гіпертензією.

Примітка. Показник експресії δ ПКС нормовано за рівнем експресії β -актину; $n = 8$; * $P < 0,05$ – у порівнянні з ГДГ; # $P < 0,05$ – у порівнянні з контролем.



$ВК_{Ca}$ клітинної мембрани, який визначається величиною калієвого струму крізь канали цього типу, є одним із показників констрикторної спроможності ГМК судинної стінки. Ще одним показником стану скоротливості судин є дилататорний потенціал ендотелію, тобто його спроможність контролювати та обмежувати скорочення за рахунок секреції потужного вазодилатора – оксиду азоту.

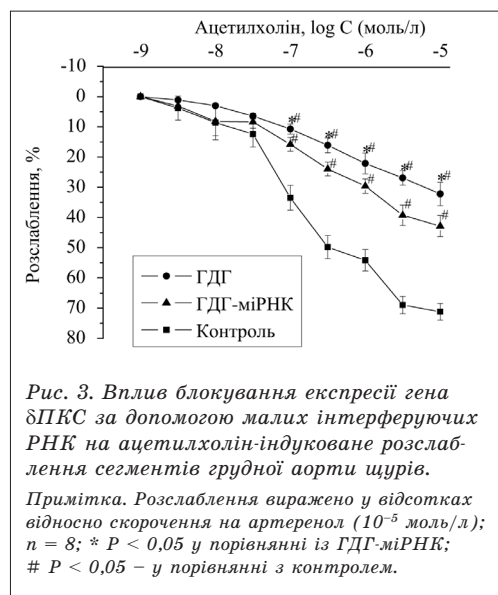
Експерименти з дослідження скоротливої активності гладенько-м'язових сегментів показали, що торакальна аорта щурів з ГДГ демонструє значно менше розслаблення у відповідь на дію ендотелій-залежного дилатора ацетилхоліну порівняно з контролем. На рисунку 3 представлені залежності доза-ефект для ацетилхоліну, які були зареєстровані на препаратах торакальної аорти щурів усіх експериментальних груп. Величина розслаблення нормована на величину скорочення у відповідь на артеренол у концентрації 10^{-5} ммоль/л і представлена у відсотках. Встановлено, що концентрація, необхідна для досягнення половинного ефекту для судин щурів з ГДГ співпадає з контрольними значеннями ($\log EC_{50} = -7,20 \pm 0,05$ і $\log EC_{50} = -7,40 \pm 0,05$ відповідно, $P > 0,05$, $n = 12$), тоді як максимальне розслаблення в щурів з ГДГ є значно зменшеним у порівнянні з контролем ($32,20 \pm 3,87$ % і $71,20 \pm 2,77$ % відповідно (рис. 3).

Застосування РНК інтерференції дельта ізоформи ПКС у щурів з ГДГ

викликало зміни скоротливих реакцій аорти та збільшення максимального розслаблення на ацетилхолін до $42,80 \pm 3,47$ %, проте концентрація, необхідна для досягнення половинного ефекту при цьому також не змінювалась ($\log EC_{50} = -7,50 \pm 0,04$, $P > 0,05$, $n = 12$).

Електрофізіологічні експерименти також продемонстрували часткове відновлення функціональної активності $ВК_{Ca}$ каналів після сайленсингу гена ПКС. В ізольованих гладеньких м'язових клітинах аорти контрольних щурів при деполяризуючому зміщенні мембранного потенціалу від підтримуваного потенціалу -60 мВ до $+70$ мВ виникав струм вихідного напрямку із щільністю 52 ± 5 пА/пФ ($n = 8$) (рис. 4). Щільність струму в ГМК аорти тварин із ГДГ була значно й вірогідно меншою та складала 25 ± 2 пА/пФ ($n = 19$, $P < 0,05$). Сайленсинг гена PRKCD викликав вірогідне збільшення вихідного струму до 35 ± 3 пА/пФ ($n = 15$, $P < 0,05$), однак ця величина не досягала контрольних значень і була вірогідно меншою в порівнянні з клітинами здорових тварин.

Для виділення з сумарного струму компоненти, яка переноситься крізь $ВК_{Ca}$ канали, використовували селективний блокатор даних каналів – паксилін, який додавали в зовнішній розчин у концентрації 500 нмоль/л [19].



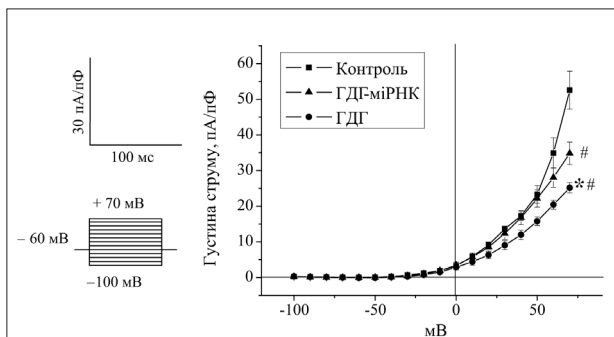


Рис. 4. Вольт-амперні характеристики вихідного струму, зареєстрованого в гладеньком'язових клітинах аорти щурів.

Протокол досліджу змещення мембранного потенціалу імпульсами тривалістю 300 мс кроком 10 мВ від підтримуваного потенціалу -60 мВ до $+70$ мВ, викликало струм вихідного напрямку.

Примітка. $n = 8$; * $P < 0,05$ – у порівнянні з ГДГ-міРНК; # $P < 0,05$ – у порівнянні з контролем.

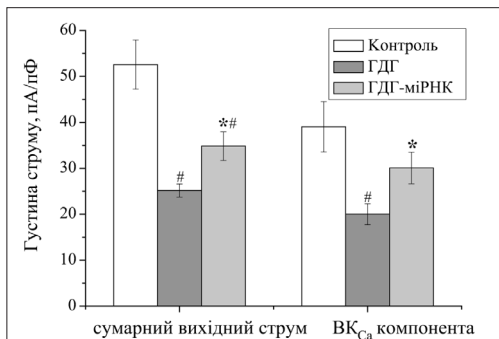


Рис. 5. Дія паксиліну на вихідні струми при потенціалі $+70$ мВ, зареєстровані в ГМК з аорти щурів.

Примітка. * $P < 0,05$ – у порівнянні з ГДГ; # $P < 0,05$ – у порівнянні з контролем.

Виявилося, що в ГМК аорти контрольної групи щурів паксилін-чутливий струм дорівнював 39 ± 5 пА/пФ, при цьому щільність струму в щурів з ГДГ складала 20 ± 2 пА/пФ. У нокаутних тварин величина струму крізь BK_{Ca} канали була суттєво збільшена і скла-

дала 30 ± 3 пА/пФ, однак не досягала контрольних значень (рис. 5). Отримані результати свідчать, що зменшення вихідного струму в гладеньких м'язових клітинах аорти щурів з ГДГ виникає за рахунок пригнічення паксилін-чутливої компоненти струму. Після дії міРНК відбувається часткове відновлення цієї компоненти, однак дефіцит провідності через BK_{Ca} канали зберігається.

Отримані дані свідчать, що δ -ізоформа ПКС відіграє важливу роль у розвитку підвищеної вазоконстрикції в щурів з ГДГ. Застосування РНК-інтерференції гена $PRKCD$ частково відновлює ендотелій-залежне розслаблення та функцію BK_{Ca} каналів у гладеньком'язових клітинах судин щурів із ГДГ. Отже, РНК інтерференція може бути вдалим методом для «нокдауну генів» ПКС та часткового нормалізування вазодилаторного потенціалу в щурів із ГДГ. Неповне відновлення показників може свідчити про те, що δ -ізоформа ПКС є не єдиним фактором, що визначає судинні дисфункції при АГ, або може мати місце неповна трансфекція ГМК міРНК, що є досить вразливими під час перебування в кров'яному руслі.

Найважливіше, що інтегральний показник стану серцево-судинної системи в щурів зі спонтанною гіпертензією – артеріальний тиск, значною мірою знизився після блокування гена δ -ізоформи ПКС міРНК, що дає підстави вважати доцільним використання в майбутньому методу блокування експресії генів протеїнкінази C за допомогою РНК-інтерференції з метою корекції судинних дисфункцій при есенціальній гіпертензії.

1. Amberg G. Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension / G. Amberg, L. Santana // Circ. Res. – 2003. – V. 93, № 10. – P. 965 – 971.
2. Amberg G. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca^{2+} activated K^{+} channels in vascular smooth muscle during hypertension / G. Amberg, A. Bonev, C. Rossow // J. Clin. Invest. – 2003. – V. 112, № 5. – P. 717 – 724.
3. Cox R. H. Ca^{2+} influx inhibits voltage-dependent and augments Ca^{2+} -activated K^{+} currents in arterial myocytes / R. H. Cox, S. Petrou // Am. J. Physiol. – 1999. – V. 277. – P. C. 51 – 56.
4. Ding Y. Hypotonic swelling stimulates L-type Ca^{2+} channel activity in vascular smooth muscle cells through PKC / Y. Ding, D. Schwartz, P. Posner, [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2004. – V. 287, № 2. – P. C. 413 – C. 421.

5. *Figueroa X. F.* Connexins: gaps in our knowledge of vascular function / X. F. Figueroa, B. E. Isakson, B. R. Duling // *Physiology* – 2004. – V. 19, № 5. – P. 277–284.
6. *Friedman S.* Cell permeability, sodium transport, and the hypertensive process in the rat / S. Friedman, C. Friedman // *Circ. Res.* – 1976. – V. 39. – P. 433–441.
7. *Fukumoto S.* Protein kinase C δ inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G 1 cyclin expression / S. Fukumoto, Y. Nishizawa., M. Hosoi, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 13816–13822.
8. *Gao P.* Expression of protein kinase C gene in the brain and heart of spontaneously hypertensive rats / P. Gao, G. Zhao, X. Yuan, [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* – 1995. – V. 1. – P. S204–S206.
9. *Gonzalez-Alegre P.* Technology insight: Therapeutic RNA interference — how far from the neurology clinic? / P. Gonzalez-Alegre, H. Paulson // *Nat. Clin. Pract.* – 2007. – V. 3, № 7. – P. 394–404.
10. *Jones A. W.* Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats / A. W. Jones // *Circ. Res.* – 1973. – V. 33. – P. 563 – 572.
11. *Olsson M. C.* Basal myosin light chain phosphorylation is a determinant of Ca^{2+} sensitivity of force and activation dependence of the kinetics of myocardial force development / M. C. Olsson, J. R. Patel, D. P. Fitzsimons // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – V. 287. – P. H2712 – H2718.
12. *Sabri A.* Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure / A. Sabri, S. Steinberg // *Mol. Cell. Biochem.* – 2003. – V. 251. – P. 97–101.
13. *Sledz C. A.* RNA interference in biology and disease / C. A. Sledz, B. R. Williams // *Blood* – 2005. – V. 106. – P. 787–794.
14. *Soloviev A.* The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C / A. Soloviev, S. Bershtein // *J Hypertens* – 1992. – V. 10. – P. 131–136.
15. *Soloviev A.* Evidence for the involvement of protein kinase C in development of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats / A. Soloviev, A. Parshikov, A. Stefanov // *J. Vasc. Res.* – 1998. – V. 35. – P. 325–331.
16. *Soloviev A.* Depression of endothelium-dependent relaxation despite normal release of nitric oxide in the aorta of spontaneously hypertensive rats: possible role of protein kinase C / A. Soloviev, S. Tiskin, A. Parshikov // *Endothelium-derived hyperpolarizations* Ed. by P. Vanhoutte. – Harwood Academic Publishers, 1999. – P. 289–296.
17. *Soloviev A.* Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C / A. Soloviev, S. Tishkin, S. Zelensky [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – V. 289. – P. R755–R762.
18. *Ventura B.* Is siRNA the tool of the future for in vivo mammalian gene research? / B. Ventura // *Physiol. Genomics.* – 2004. – V. 18. – P. 252–254.
19. *Wei A.* International union of pharmacology. III. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels / A. Wei, G. Gutman, R. Aldrich // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – V. 57. – P. 463–472.
20. *Yamanouchi D.* Protein kinase C delta mediates arterial injury responses through regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis / D. Yamanouchi, K. Kato, E. Ryer, [et al.] // *Cardiovascular Research.* – 2010. – V. 85. – P. 434–443.
21. *Zhou X.* Dual role of protein kinase C on BK channel regulation / X. Zhou, I. Wulfsen, E. Utku // *PNAS.* – 2010. – V. 107, № 17. – P. 8005–8010.

**Т. В. Новохацкая, С. М. Тишкин, В. Е. Досенко, И. В. Иванова,
Н. В. Добреля, А. И. Соловьев**

Подавление гена дельта изоформы протеинкиназы С устраняет сосудистые дисфункции у крыс с генетически детерминированной гипертензией

В опытах на крысах с генетически детерминированной гипертензией изучена роль δ -изоформы протеинкиназы С (ПКС) в повышении артериального давления. Применение метода РНК-интерференции для подавления экспрессии гена PRKCD путем введения малых интерферирующих РНК (миРНК) в хвостовую вену крыс приводит к увеличению эндотелий-зависимого расслабления изолированных сегментов аорты в ответ на аппликацию ацетилхолина (10^{-5} моль/л) с $32,20 \pm 3,87\%$ до $42,80 \pm 3,47\%$, которое, однако, не достигает контрольного значения ($71,20 \pm 2,77\%$). При помощи метода фиксации потенциала в модификации «whole-cell perforated patch» продемонстрировано частичное восстановление функции BK_{Ca} каналов в гладкомышечных клетках аорты. Амплитуда выходящего тока, активированного смещением мембранного потенциала от -60 мВ до $+70$ мВ, увеличилась с 25 ± 2 пА/пФ до 35 ± 3 пА/пФ, оставаясь, однако, меньше контрольных значений (52 ± 5 пА/пФ). Систолическое артериальное давление у крыс на 1-й день после введения миРНК достоверно снизилось со $156,0 \pm 1,8$ мм рт. ст. до $136,0 \pm 3,2$ мм рт. ст. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования метода блокирования экспрессии генов ПКС для коррекции сосудистых дисфункций при эссенциальной гипертензии.

Ключевые слова: дельта изоформа протеинкиназы С, РНК-интерференция, гладкие мышцы, BK_{Ca} каналы, артериальная гипертензия

**T. Novokhatska, S. M. Tishkin, V. E. Dosenko, I. V. Ivanova,
N. V. Dobrelia, A. I. Soloviev**

**Protein kinase C delta isoform gene silencing reduces vascular disorders
in spontaneously hypertensive rats**

The goal of this study was to clarify the δ PKC role in arterial hypertension development and to make an attempt to reduce vascular abnormalities related to ionic channelopathy and vascular hypercontractivity in SHR using small interfering RNA (siRNA). The δ PKC siRNAs target-specific were injected to conscious SHRs intravenously. δ PKC siRNAs administration led to an increment in amplitude of ACh-relaxation from $32,20 \pm 3,87\%$ to $42,80 \pm 3,47\%$. To investigate the effect of post-transcriptional δ PKC gene silencing on outward K-currents, patch-clamp technique in «whole-cell perforated patch» modification was used. It was shown that outward ionic currents at +70 mV was 52 ± 5 pA/pF in healthy rats, and 25 ± 2 pA/pF in SHRs, while δ -PKC siRNAs treated SHRs current density was 35 ± 3 pA/pF. It was found that δ PKC siRNAs administration led to a significant decrease in arterial blood pressure from $156,0 \pm 1,8$ mmHg to $136,0 \pm 3,2$ mmHg on the first post-injection day, and persisted for 7 days after. It may be likely that siRNAs is a good approach to inactivate PKC gene encoding function and to normalize vascular tone damaged in arterial hypertension.

Key words: protein kinase C delta isoform, RNA-interference, smooth muscles, BK_{Ca} channels, arterial hypertension

Надійшла: 30. 11. 2011 р.

Контактна особа: Новохацька Тетяна Василівна, аспірант, відділ експериментальної терапії,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680.
Тел.: (44) 456-02-88.

Р. В. Ошитко, А. Р. Грицик

Вивчення жирнокислотного складу насіння глоду одноматочкового (*Crataegus monogyna*) та глоду згладженого (*Crataegus laevigata*) і перспективи застосування жирної олії глодів у медицині

Івано-Франківський національний медичний університет

Ключові слова: *Crataegus monogyna*, *Crataegus laevigata*, насіння, мононенасичені, жирні кислоти, фармакологічна активність, хромато-мас-спектрометрія

Флора України налічує понад 30 видів роду *Crataegus* L. родини розові (Rosaceae), з них найпоширеніші такі дикорослі види, як глід п'ятистовпчиковий *Crataegus pentagyna* W.K., глід кривочашечковий *C. curvisepala* Lindm., глід несправжньо-кривостовпчиковий *C. pseudo-hyrtostyla* Klok., глід озброєний *C. fallacina* Klok., глід замшевий *C. alutacea* Klok. До ендеміків відносяться: глід східний *C. orientalis* Pall., глід український *C. ucrainica*, глід Оленки *C. Helenolae* Grynj et Klok., глід заокруглений *C. subrotunda* Klok., глід оманливий *C. fallacina* Klok., глід гладенькоодноматочковий *C. leiomonogyna* Klok, глід згладжений *C. laevigata* (Poir.) DC. З 19 століття в Україні культивують декілька десятків північноамериканських видів [1, 6]. Препарати, що одержують з плодів, квіток та листя глодів, застосовуються як кардіотонічні та гіпотензивні засоби [9].

В Івано-Франківській області поширені *Crataegus monogyna* Jacq. – глід одноматочковий та *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. – глід згладжений. Запаси сировини цих двох видів значні в Івано-Франківській, Закарпатській областях, тому вони придатні для промислової заготівлі.

Саме ці два види рекомендують до застосування European Pharmacopoeia, British Herbal Pharmacopoeia та ДФУ [3, 4, 8].

Crataegus monogyna Jacq. – кущ або невелике деревце 3–7 м заввишки з

колючими червонувато-коричневими гілками. Колючки короткі (до 2 см завдовжки), гострі, міцні. Листки чергові, 3–7-глибокороздільні, обернено-яйцевидні, зверху темно-зелені, блискучі, зісподу світліші, з восковим нальотом, лопаті надрізано-пилчасті. Суцвіття щиткоподібні, з трьох-п'яти гілочок, несуть по 10–18 квіток. Оцвітина подвійна, роздільнопелюсткова, п'ятичленна, чашолистки трикутно-або широкоовальні, відігнуті донизу. Віночок білий до 15 мм у діаметрі, тичинок багато, маточка одна, стовпчик один, прямий, зав'язь напівнижня. Плід – видовжено-яйцеподібний, рідше кулястий (8–10 мм завдовжки), червоний, коричнево-червоний або жовтуватий, з однією кісточкою та солодкуватим м'якушем. *C. monogyna* – поліморфний вид, який поділяється на декілька рас, які, у свою чергу, систематика описують як самостійні види [12]. Росте в підліску мішаних і листяних лісів, частіше на узліссях, лісових галявинах, на схилах річкових берегів і балок, у байрачних лісах. Світлолюбна, морозостійка, солевитривала рослина; цвіте в травні, плоди досягають у вересні – жовтні. Вид та його різновиди розповсюджені переважно в Криму, Карпатах, Західній Європі, Кавказі, Передній Азії.

Crataegus laevigata (Poir.) DC. неофіційно називають застарілою неправильною назвою *Crataegus oxyacantha* L. – кущ або невелике дерево родини розових, 5–6 м заввишки, з колючими сірувато-коричневими гілками та сірими гілочками. Колючки короткі до 2 см завдовжки, гострі, міцні. Листки чергові, глибоко роздільні, обернено яйцевидні або широко-

ко ромбічні, трьох-, п'ятилопатові, з голими черешками, зверху темно-зелені, блискучі, зісподу світліші, з восковим нальотом, лопаті їхні надрізано-пилчасті. Суцвіття щиткоподібні, з 3–5 гілочок, які несуть по 10–18 квіток. Квітки двостатеві, п'ятипелюсткові. Оцвітина подвійна, роздільнопелюсткова, п'ятичленна. Чашолистки трикутно- або широкоовальні, відігнуті донизу. Віночок білий або рожевий до 15 мм у діаметрі; тичинок багато; маточка одна; стовпчик один, прямий. Плоди яйцевидні до 1,2 см у діаметрі, темно-буро-червоні або криваво-червоні, інколи жовті, із двома, або рідше трьома кісточками, з жовтим мучнистим м'якушем. Цвіте в кінці травня, плоди досягають у вересні – жовтні. Росте в лісах і перелісках, на пагорбах, високих берегах річок. Ареали поширення виду – Прибалтика, Карпати, Закарпаття, захід Північного Кавказу, Західна Європа, Молдавія.

Фітохімічні дослідження видів роду *Crataegus L.* представлені в роботах В. С. Батюка, І. О. Самиліної, Т. Л. Кисельової, А. М. Ковальнової, Н. В. Сидори та ряду зарубіжних авторів [6, 7, 10, 11].

Глоди містять різноманітні групи біологічно активних речовин (БАР): первинні метаболіти (полісахариди, амінокислоти, пептиди, білки, ліпіди, органічні кислоти); вторинні метаболіти (фенольні сполуки: прості феноли, фенолкарбонові кислоти, гідроксикоричні кислоти та кумарини, проціанідини, флавоноїди, дубильні речовини конденсованої групи; ізопреноїди: стероїдні сполуки, тритерпеноїди, каротиноїди тощо). Однак БАР глодів – представників карпатського регіону систематично не досліджувалися. На основі нещодавно проведених досліджень жирних кислот плодів глодів різного ступеня зрілості, було виявлено, що домінуючими є лінолева, ліноленова та α -ліноленова кислоти [12]. Проте жирнокислотний склад насіння плодів глоду на сьогодні не встановлено, що може бути доцільним для визначення перспектив комплексної переробки плодів глоду та встановлення можливості використан-

ня жирної олії кісточок глодів у медицині. *Мета дослідження* – визначити якісний склад та кількісний вміст жирних кислот насіння глоду одноматочкового й глоду згладженого.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень було насіння глоду одноматочкового та насіння глоду згладженого, очищене від здерев'янілої оболонки, заготовлене в Івано-Франківській області на початку жовтня.

Підготовка проб для дослідження. До 0,50 мг висушеної подрібненої сировини у віалі на 2 мл додавали внутрішній стандарт (50 мкг тридекану в гексані) і 1,0 мл метилуючого агента – 14 % BCl_3 у метанолі, Supelco № 3-3033. Суміш витримували в герметично закритій віалі 8 год при 65 °С. За цей час з рослинної сировини повністю екстрагується жирна олія та проходить переетерифікація жирних кислот. Реакційну суміш зливали з осаду, і розбавляли 1 мл дистильованої води.

Для отримання метилових естерів жирних кислот додавали 0,2 мл хлористого метилену, струшували протягом 1 год та піддавали хроматографуванню. Введення проби 2 мкл до хроматографічної колонки проводили зі швидкістю 1 мл/хв протягом 0,2 хв у режимі splitless (без розподілу потоку), що дозволяє ввести пробу без втрат на розділення та суттєво, до 20 разів, збільшити чутливість методу хроматографування. Аналіз метилових естерів жирних кислот проводили з використанням хромато-мас-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Детектор – мас-спектрометра – квадруполь, спосіб іонізації – електронний удар (EI), енергія іонізації 70 eV, для аналізу використовували режим реєстрації повного іонного струму. Для розподілу використовували капілярну колонку HP-INNOWAX, (30 м×250 мкм). Нерухома фаза – INNOWAX. Рухома фаза: гелій, швидкість потоку газу 1 мл/хв. Температура нагрівача введення проби – 250 °С. Температура термостата програмується від 50 до 250 °С. Ідентифікацію метилових естерів жирних кислот проводили на основі розрахунку еквівалентної довжини аліфатичного ланцюга (ECL); з використанням даних бібліоте-

ки мас-спектрів NIST 05 i Willey 2007 з загальною кількістю спектрів більше 470 000 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS i NIST; також порівнювали час утримання з часом утримання стандартних сполук (Sigma). Для розрахунку кількісного вмісту компонентів застосовували формулу:

$$C = K1 \cdot K2 \cdot 1000 \text{ (мг/кг)}, \text{ де:}$$

$K1 = P1/P2$ ($P1$ – площа піка досліджуваної речовини, $P2$ – площа піка стандарту); $K2 = 50/M$ (50 – маса внутрішнього стандарту, уведеного в досліджуваний зразок, мг; M – наважка досліджуваного зразка, мг); C – вміст жирних кислот у сировині, мг/кг.

Відносний вміст жирних кислот розраховували також у відсотках від їхнього загального вмісту. Для оцінки ступеня ненасиченості жирних кислот розраховували індекс подвійного зв'язку, як суму добутків відсотків кожної ненасиченої кислоти на число подвійних зв'язків у її молекулі, поділену на 100. Отримані результати піддавали статистичній обробці.

Результати та їх обговорення. У досліджуваних об'єктах визначено 19 жирних кислот, з них ідентифіковано 18 (таблиця). Сума ненасичених жирних кислот складає 88,23 % для насіння глоду одноматочкового та 87,58 % для насіння глоду згладженого.

Домінуючими кислотами (більше 1 % в олії) насіння обох видів є наси-

Таблиця

Жирні кислоти насіння глоду одноматочкового та глоду згладженого

№	Час утримання, хв	Код кислоти	Назва жирної кислоти	<i>Crataegus monogyna</i>		<i>Crataegus laevigata</i>	
				Вміст жирних кислот		Вміст жирних кислот	
				мг/100г	%	мг/100г	%
1	21.92	C14:1	Міристинова	11,4	0,08	8,5	0,07
2	22.68		Не ідентифіковано	5,1	0,03	-	-
3	23.86	C15:0	Пентадеканова	4,0	0,03	5,2	0,04
4	25.87	C16:0	Пальмітинова	1270,2	8,42	1136,8	9,07
5	26.09	C18:1n1c	7-Октадецендова	9,0	0,06	9,4	0,07
6	26.2	C16:1	Пальмітолеїнова	31,3	0,21	13,8	0,11
7	27.55	C17:0	Гептадеканова	12,5	0,08	11,1	0,09
8	29.55	C18:0	Стеаринова	48,4	0,32	44,3	0,35
9	29.89	C18:1n8c	10-Октадецендова (Ізоолеїнова)	-	-	5,2	0,04
10	30.04	C18:1n9c	Олеїнова	7374,8	48,91	4498,5	35,89
11	31.49	C18:3n3	Ліноленова	47,6	0,32	50,6	0,40
12	30.74	C18:2n6c	Транс-Лінолева	-	-	59,6	0,48
13	30.77	C18:2n6c	Лінолева	5634,3	37,37	6189,2	49,38
14	30.81	C18:2n6c	Октадекадієнова (ізомер лінолевої кислоти)	26,2	0,17	20,9	0,17
15	32.66	C20:0	Арахідова (Ейкозанова)	312,8	2,07	267,2	2,13
16	32.93	C20:1n9c	цис-11-Ейкозенова (Гондоїнова)	178,7	1,19	130,2	1,04
17	35.67	C22:0	Бегенова (Докозанова)	71,9	0,48	61,5	0,49
18	37.12	C23:0	Трикозанова	11,7	0,08	12,0	0,10
19	38.53	C24:0	Лігноцерінова (Тетракозанова)	28,3	0,19	16,4	0,13
Разом				15078,3	100,00	12535,0	100,00

чені: пальмітинова, арахінова (ейкозенова) та ненасичені: олеїнова, лінолева та 11-ейкозенова кислоти. Олія глodu згладженого має більш специфічний склад – на відміну від глodu одноматочкового містить у мінорних кількостях 10-октадеценову та транс-лінолеву кислоти. Хроматографічний профіль жирних кислот насіння глodu одноматочкового та насіння глodu згладженого представлено на рисунках 1 і 2.

Олеїнова кислота, яка становить у насінні глodu одноматочкового 48,91 % та в насінні глodu згладженого 35,89 % від суми жирних кислот, відноситься до мононенасичених жирних кислот, що активізують ліпідний обмін, уповільнюють перекисне окиснення ліпідів, відновлюють бар'єрні функції епідерми.

Особливе значення мають поліненасичені незамінні жирні кислоти (ПНЖК), до яких, зокрема, відноситься лінолева кислота. В організмах вищих тварин і людини ПНЖК не синтезуються, тому вони належать до незамінних та повинні надходити з їжею.

Лінолева кислота, яка становить у насінні глodu одноматочкового 37,37 % та в насінні глodu згладженого 49,38 % від суми жирних кислот, належить до жирних кислот родини n-6 (омега-6). Вищі рослини синтезують її з олеїнової кислоти.

Омега-6 жирні кислоти є структурними елементами кліткових мембран, регулюють обмін холестерину, утворюють тканинні гормони – простагландини. Лінолева кислота під дією мікроелементів, ферментів та вітамінів перетворюється в організмі на гамаліноленову, що є однією з найактивніших омега-6 кислот. У свою чергу гамаліноленова кислота перетворюється на простагландин E1, який підвищує імунітет, знижує ризик серцево-судинних захворю-

вань, зменшує запальні процеси, регулює роботу мозку і нервової системи, нормалізує рівень інсуліну, прискорює обмін речовин. Лінолева кислота є біохімічним попередником лінолевої й арахідонової кислот [5].

Ліноленова кислота, яка становить у насінні глodu одноматочкового 0,32 % та в насінні глodu згладженого 0,40 % від суми жирних кислот, належить до жирних кислот родини n-3 (омега-3), що проявляють антиаритмічну, гіпотензивну, гіпокоагуляційну, антиагрегантну, протизапальну та імунomodulatory дію. Інгібуючи активність циклооксигеназ, ліпоксигеназ, протеїназ і фосфоліпаз, омега-3 жирні кислоти виявляють достатньо виражений протипухлинний ефект [2].

Отже, результати хімічного дослідження свідчать про перспективність поглибленого вивчення фармакологічної дії жирної олії насіння глodu, яку можна отримувати з насіння плодів глodu, що йдуть у відвал при виробництві густого екстракту з м'якоті плодів.

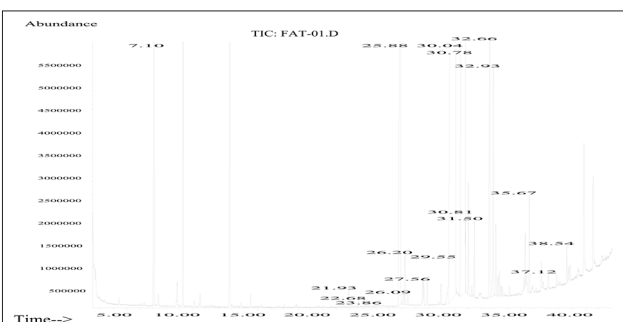


Рис. 1. Хроматографічний профіль жирних кислот складу насіння глodu одноматочкового.

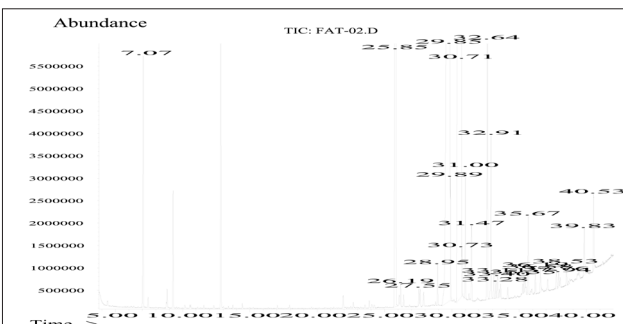


Рис. 2. Хроматографічний профіль жирних кислот складу насіння глodu згладженого.

Висновки

Уперше методом хромато-мас-спектрометрії визначено жирнокислотний склад насіння глоду одноматочкового – *Crataegus monogyna* та глоду згладженого – *Crataegus laevigata*, що ростуть в Івано-Франківській області, та встановлено відмінності в їхньому складі.

Домінуючими для обох видів глоду жирними кислотами є насичені: пальмітинова, арахінова (ейкозанова) та ненасичені: олеїнова, 11-ейкозенова та

лінолева. Жирна олія насіння глоду згладженого, на відміну від глоду одноматочкового, містить 10-октадеценову та транс-лінолеву кислоти.

Отримані результати вказують на перспективність використання насіння глоду одноматочкового та глоду згладженого як цінних джерел жирної олії з високим умістом ненасичених жирних кислот: 88,23 та 87,58 % відповідно, серед них мононенасичені, омега-6 та омега-3 жирні кислоти, що проявляють різну фармакологічну активність.

1. Вафин Р. В. Боярышники: Интродукция и биологические особенности / Вафин Р. В., Путенихин В. П. – М.: Наука, 2003. – 240 с.
2. Гаврисюк В. К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине / В. К. Гаврисюк // Укр. пульмон. журн. – 2001. – № 3. – С. 5 – 10.
3. Глоду листя та квітки / Державна Фармакопея України // Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-е вид.]. – Доповнення 3. – Харків: РІРЕГ. – 2009. – С. 165. – 280 с.
4. Глоду плоди / Державна Фармакопея України // Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-е вид.]. – Доповнення 2. – Харків: Харків: РІРЕГ. – 2008. – С. 414. – 620 с.
5. Николаевич Л. Н. Молекулярные механизмы регуляции генов полиненасыщенными жирными кислотами / Николаевич Л. Н., Морозова Е. В. // Наука и инновации. – Изд-во: Издательский дом «Белорусская наука» – № 4 (98). – 2011. – С. 65–69.
6. Стандартизація плодів нефармакопейних видів глоду / А. М. Ковальова, Н. В. Сидора, М. Ф. Гончаров, А. Л. Вількер // Фітотерапія. Часопис. – № 2. – 2007. – С. 54–56.
7. Хромато-мас-спектрометрическое исследование компонентов эфирного масла цветков *Crataegus jackii*, *Crataegus robesoniana* и *Crataegus flabellata* / А. М. Ковалева, Н. Ф. Гончаров, А. Н. Комисаренко [и др.] // Химия природных соединений. – № 4. – 2009. – С. 490 – 491.
8. British Herbal Pharmacopoeia (BHP), British Herbal Medicine Association. Exeter, U.K. – 1996. – P. 98–101.
9. Folium cum Flore Crataegi / WHO Monograph: Germany. – 1999. – V. 2. – P. 66–82.
10. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis / U. Svedstrom, H. Vuorela, R. Kostianen [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2006. – V. 1112. – P. 103–111.
11. Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit: some physical and chemical properties / M. Ozcan, H. Haciseferogullari, T. Marakoglu, D. Arslan // J. Food. Eng. – 2005. – № 69. – P. 409–413.
12. Morphological and chemical diversity among hawthorn (*Crataegus* spp.) genotypes from Turkey / M. Yanar, S. Ercisli, K. U. Yilmaz [et al.] // Scientific Research and Essays. – 2011. – V. 6(1). – P. 35–38.

Р. В. Ошитко, А. Р. Грицик

Изучения жирнокислотного состава семян боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna*) и боярышника сглаженного (*Crataegus laevigata*) и перспективы применения жирного масла боярышников в медицине

Хромато-мас-спектрометрическим методом впервые определен жирнокислотный состав жирного масла семян боярышника однопестичного и боярышника сглаженного, произрастающих в Ивано-Франковской области. Доминирующими жирными кислотами для обоих видов являются насыщенные: пальмитиновая, арахидиновая и ненасыщенные: олеиновая, 11-эйкозеновая и линолевая. Жирное масло семян боярышника сглаженного, в отличие от боярышника однопестичного, содержит 10-октадеценовую и транс-линолевою кислоты. Полученные результаты указывают на перспективность использования косточек боярышника однопестичного и боярышника сглаженного как ценных источников жирного масла, содержащего преимущественно ненасыщенные жирные кислоты: 88,23 и 87,58 % соответственно, среди которых – мононенасыщенные, омега-6 и омега-3 жирные кислоты, обладающие различной фармакологической активностью.

Результаты исследования жирнокислотного состава жирного масла семян боярышника однопестичного и боярышника сглаженного свидетельствуют о перспективности углубленного изучения их фармакологического действия.

Ключевые слова: *Crataegus monogyna*, *Crataegus laevigata*, семена, мононенасыщенные жирные кислоты, жирные кислоты, фармакологическая активность, хромато-мас-спектрометрия

R. Oshytko, A. Grytskyk

Estimation of fatty acids compositions of fatty oils from single-seeded hawthorn (*Crataegus monogyna*) and midland hawthorn (*Crataegus laevigata*) and prospects of its medical use

Fatty acids compositions of fatty oils from single-seeded hawthorn and midland hawthorn seeds growing in Ivano-Frankivsk region was identified for the first time with the help of chromatography-mass spectrometry method. Dominating fatty acids of both species include saturated palmitic, arachic acids and unsaturated oleic, 11-eicosanoic and linoleic acids.

Fatty oil of midland hawthorn seeds in contrast to single-seeded hawthorn include 10-octadecenical acid and trans- linoleic acids.

Received results indicate the prospects of single-seeded hawthorn and midland hawthorn seeds usage as important sources of fatty oil mainly consisting of unsaturated fatty acids (88,23 and 87,58 % respectively) among which there are monounsaturated omega-6 and omega-3 fatty acids with different pharmacological activity.

The findings of fatty-acid compositions of fatty oils from single-seeded hawthorn and midland hawthorn seeds proved the prospects of advanced study of their pharmacological action.

Key words: Crataegus monogyna, Crataegus laevigata, seeds, monounsaturated fatty acids, pharmacological activity, chromatography-mass spectrometry

Надійшла: 02.02.2012

Контактна особа: Ошитко Ростислав Володимирович, магістрант фармації, Івано-Франківський медичний університет, вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ. Тел.: (97) 560-34-47.

О. О. Цуркан, Т. В. Ковальчук, О. В. Гергель

Хромато-мас-спектрометричне дослідження летких компонентів надземної частини шовковиці

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

Ключові слова: шовковиця, біологічно активні речовини, хромато-мас-спектрометрія

Останніми роками значно активізувалися хромато-мас-спектрометричні дослідження біологічно активних речовин рослинного походження – летких сполук [3, 5, 13, 14, 16].

Хромато-мас-спектрометричний метод аналізу є сучасним та високоефективним способом розділення та встановлення кількісного вмісту біологічно активних сполук, а також є найінформативнішим при встановленні їхньої якості. Даний метод аналізу є відносно дешевим та універсальним фізико-хімічним методом дослідження. Переваги перед іншими традиційними аналітичними методами акцентуються на специфічності, чутливості та швидкості. Оскільки базовою характеристикою будь-якої природної сполуки є молекулярна маса, то хромато-мас-спектрометрію можна вважати одним з універсальних методів ідентифікації природних сполук. Крім молекулярної маси сучасна хромато-мас-спектрометрія надає також інформацію про хімічну структуру досліджуваної молекули при мінімальних затратах речовини і часу.

Завдяки високій інформативності даного методу щодо якісного складу та кількісного вмісту біологічно активних речовин у рослинах, створюються передумови для встановлення можливих фармакологічних активностей лікарських рослин. Крім того, даний метод, може бути успішно використаний для вирішення проблеми співвідношення фармакологічної активності та будови біологічно активних сполук, а також пошуку на цій основі нових високоактивних лікарських речовин, що має принципове значення для сучасної фармакології.

У зв'язку з відсутністю даних щодо складу летких компонентів надземної частини шовковиці білої (*Morus alba* L.) та чорної (*Morus nigra* L.), що ростуть на території України, нами використаний метод хромато-мас-спектрометрії.

Мета дослідження – вивчення компонентного складу летких сполук надземної частини шовковиці з використанням методу хромато-мас-спектрометрії. У подальшому на основі цього можна буде запропонувати методологію прогнозу фармакологічних властивостей шовковиці та обґрунтувати доцільність дослідження перспективних частин сировини.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були бруньки, листя, плоди та кора шовковиці білої та чорної, зібрані в 2011 році в Київській області. Точну наважку (близько 2,0 г) висушеної та подрібненої сировини поміщали у віалу на 20 мл, додавали внутрішній стандарт. Як внутрішній стандарт використовували тридекан. До проби додавали 10 мл води та відганяли леткі сполуки водяною парою протягом 2-х год з використанням оберненого холодильника з повітряним охолодженням.

Аналіз летких компонентів проводили за методикою [9] на базі Національного інституту виноградарства і вина «Магарач» під керівництвом Виноградова Б. О. на хроматографі Agilent Technologies 6890, обладнаному мас-спектрометричним детектором 5973 з капілярною колонкою DB-5 (внутрішній діаметр 0,25 мм і довжина 30 м). Швидкість газу-носія (гелій) 1,2 мл/хв. Температура нагрівача вводу проби – 250 °С. Термостат програмували від 50 до 320 °С зі швидкістю 4 °С/хв.

Ідентифікацію компонентів виконували за мас-спектром і часом утримування компонента.

Результати та їх обговорення. Результати визначення якісного складу та кіль-

кісного вмісту компонентів надземної частини шовковиці наведено в таблиці.

Таблиця

Компоненти летких речовин надземної частини шовковиці білої

№	Назва компонента	Вміст, мг/кг сухої сировини							
		КШБ	ПШБ	ЛШБ	БШБ	КШЧ	ПШЧ	ЛШЧ	БШЧ
1	2,7,10-триметил-гексадекан	15,3	2,1	5,5	10,5	–	–	–	–
2	α-кадинол	19,5	–	–	–	–	–	–	–
3	α-терпінеол	–	–	–	–	1,7	–	–	0,8
4	α-туйон	–	–	–	–	–	3,3	–	–
5	β-іонон-5,6-епоксид	–	–	8,9	8,2	–	–	–	–
6	β-туйон	–	–	–	–	–	0,7	–	–
7	γ-ноналактон	46,4	–	–	20,2	–	–	–	–
8	Анетол	–	–	–	–	4,1	–	–	–
9	Бісаболон оксид	–	–	–	–	–	–	19,7	–
10	Віридіфлорол 1	–	–	–	–	–	–	36,3	–
11	Віридіфлорол 2	–	–	–	–	–	–	20,0	–
12	Гексадекан	19,8	3,8	7,3	13,5	–	2,1	15,9	–
13	Гексакозан	6,7	–	3,1	6,7	–	–	7,8	–
14	Гексаналь	–	–	–	1,3	–	–	–	6,4
15	Гексанол	–	–	–	–	5,1	–	–	1,2
16	Гептадекан	17,7	2,6	3,8	10,2	2,5	1,6	11,1	–
17	Гептадеканова кислота	10,4	–	–	–	–	–	–	–
18	Гептакозан	9,3	2,1	8,1	19,8	–	–	28,1	2,5
19	Гептаналь	–	–	–	0,8	–	–	–	1,4
20	Гептанова кислота	9,6	–	–	–	–	–	–	–
21	Геранілацетон	–	2,0	5,9	8,0	9,4	2,3	3,4	–
22	Декан	13,1	1,9	6,5	13,0	–	2,7	6,2	–
23	Деканаль	1,9	–	–	1,8	1,5	1,0	0,9	1,2
24	Додекан	14,3	0,7	11,0	30,3	–	–	6,7	–
25	Докозан	17,1	–	–	12,6	–	–	–	–
26	Ейкозан	10,5	–	3,7	7,1	–	–	–	–
27	Етиллінолеат	14,0	19,4	–	56,1	4,6	79,2	–	–
28	Етилліноленат	–	–	–	–	1,5	–	–	6,9
29	Етилпальмітат	64,0	6,5	–	–	3,6	35,8	–	24,2
30	Евгенол	–	–	–	–	–	–	47,1	–
31	Ізооктилова кислота	2,2	–	–	–	–	–	–	–
32	Ізопропіллаурат	–	–	–	–	5,4	–	–	1,6
33	Каприлова кислота	47,9	–	–	–	–	1,8	–	–
34	Капринова кислота	16,5	–	–	–	–	–	–	2,5
35	Капронова кислота	27,3	–	–	–	–	–	–	–
36	Каріофіллен оксид	13,0	–	–	–	6,1	–	–	1,0
37	Лауринова кислота	–	2,1	–	–	–	–	–	2,8
38	Ліналоол	–	–	–	1,0	4,2	–	–	6,3
39	Лінолева кислота	170,2	220,8	32,1	–	5,0	–	–	30,4
40	Ліноленова кислота	10,1	–	–	–	–	413,3	–	4,6
41	Мегастигматрієнон 1	–	–	–	–	–	–	33,2	–
42	Мегастигматрієнон 4	–	–	–	–	–	–	22,3	–
43	Ментол	–	–	–	–	3,3	–	–	2,6
44	Метиллінолеат	–	5,4	–	17,4	–	45,2	–	3,7
45	Метилпальмітат	–	2,1	–	9,6	–	16,8	–	–

№	Назва компонента	Вміст, мг/кг сухої сировини							
		КШБ	ПШБ	ЛШБ	БШБ	КШЧ	ПШЧ	ЛШЧ	БШЧ
46	Метилтридеканова кислота	–	–	–	2,9	–	–	–	–
47	Міристинова кислота	49,7	10,1	–	13,1	–	19,9	–	19,1
48	Нераль	–	–	–	–	1,6	–	–	–
49	Неролідол	64,2	–	–	–	–	–	–	–
50	Нонакозан	13,9	4,8	12,0	59,1	3,5	14,7	60,0	11,4
51	Нонаналь	–	0,6	–	5,6	–	1,6	1,4	–
52	Нонанова кислота	10,0	–	–	–	–	–	–	–
53	Октадекан	11,1	2,3	4,5	9,2	3,6	1,2	–	–
54	Олеїнова кислота	–	–	–	8,0	3,7	–	–	47,0
55	Пальмітинова кислота	1075,0	169,0	–	–	27,0	111,0	–	71,6
56	Пентадекан	15,2	3,2	7,4	13,6	2,7	–	10,9	–
57	Пентадеканова кислота	28,2	1,8	–	8,0	–	–	–	17,2
58	Пентакозан	10,3	2,5	6,8	13,5	1,8	8,6	23,0	2,3
59	Піперитон	–	–	–	–	–	–	–	2,4
60	Сквален	121,0	17,0	34,1	152,8	22,7	14,7	88,7	47,2
61	Спатуленол	12,1	–	–	–	–	–	–	–
62	Стеаринова кислота	–	–	–	–	–	–	–	5,8
63	Тетрадекан	20,7	3,7	10,9	17,9	–	4,0	13,7	–
64	Тетракозан	7,6	–	2,7	6,4	–	–	–	–
65	<i>транс</i> -ліналоол оксид	0,7	–	–	1,7	–	–	–	–
66	Трикозан	–	–	3,5	7,1	–	–	–	–
67	Тритриакоктан	16,2	3,1	4,1	9,4	–	5,7	35,5	–
68	Ундекан	6,6	1,0	3,1	5,8	–	1,5	3,3	–
69	Унтріаконтан	–	3,4	5,3	19,3	–	12,7	58,4	–
70	Хенейкозан	15,4	–	5,5	12,1	–	–	–	–
71	<i>цис</i> -ліналоол оксид	–	–	–	0,8	–	–	–	–
72	Фарнезаль	–	–	–	–	–	–	17,9	–

Примітка. – відсутність компонента, КШБ – кора шовковиці білої, ПШБ – плоди шовковиці білої, ЛШБ – листя шовковиці білої, БШБ – бруньки шовковиці білої, КШЧ – кора шовковиці чорної, ПШЧ – плоди шовковиці чорної, ЛШЧ – листя шовковиці чорної, БШЧ – бруньки шовковиці чорної.

Проведеними дослідженнями встановлено, що леткі сполуки надземної частини шовковиці складаються з 72 компонентів. У сировині шовковиці ідентифіковано 23 компоненти в ЛШБ, 38 у БШБ, та в ПШБ і КШБ – 27 і 42 відповідно, по 24 у ЛШЧ і ПШЧ, та в КШЧ і БШЧ – 22 і 26 відповідно. Леткі компоненти надземної частини шовковиці представлені різними класами хімічних сполук: вуглеводнями, спиртами, альдегідами, кетонами, лактонами, тритерпенами та жирними кислотами. Спільними сполуками для досліджуваних об'єктів є вуглеводень нонакозан та тритерпен сквален.

Результати хромато-мас-спектрометричного аналізу ЛШБ і ЛШЧ показали,

що леткий склад представлений в основному насиченими ациклічними вуглеводнями, а також жирними кислотами, похідними тритерпенового ряду, монотерпеноїдів та епоксидів. До специфічних компонентів ЛШБ можна віднести тритерпен сквален, для ЛШЧ – похідне пірокатехіну евгенол, сесквітерпенові спирти – віридіфлорол 1 і віридіфлорол 2, похідні тритерпенів – мегастигматрієнон 1 і мегастигматрієнон 4 та тритерпен сквален.

БШБ і БШЧ представлені такими класами хімічних сполук як: монотерпенові спирти та їхні похідні, аліфатичні альдегіди, лактони, монотерпеноїди, насичені ациклічні вуглеводні, жирні кислоти та їхні похідні. Монотерпеновий спирт ліналоол і його похідні *транс*-ліналоол

оксид, *цис*-ліналоол оксид та тритерпен сквален є специфічними компонентами БШБ. Похідні терпену – α -терпінеол і піперитон, монотерпеновий спирт ліналоол та тритерпен сквален є специфічними компонентами БШЧ.

Компонентний склад ПШБ та ПШЧ представлений переважно жирними кислотами та їхніми похідними, а також насиченими ациклічними вуглеводнями. Специфічними речовинами є тритерпен сквален для ПШБ та кисневмісні похідні біциклічних монотерпенів – кетони α -туйон і β -туйон для ПШЧ.

З використанням хромато-мас-спектрометрії в КШБ встановлені вуглеводні, жирні кислоти та їхні похідні, аліфатичні альдегіди, лактони та похідні терпеноїдів. Компонентами КШБ з потенційними фармакологічними властивостями є похідні терпеноїдів – каріофіллен оксид, неролідол, сквален, спатуленол, похідне монотерпенового спирту – *транс*-ліналоол оксид та сесквітерпеновий спирт – α -кадинол. Похідні терпеноїдів – каріофіллен оксид, ліналоол, ментол та сквален є специфічними компонентами КШЧ.

Структурні формули специфічних компонентів надземної частини шовковиці білої та чорної представлені на рисунку.

Виявлені нами специфічні компоненти, згідно з даними літератури, мають різні фармакологічні властивості. Зокрема, біологічно активна речовина сквален проявляє гіполіпідемічну, гіпохолестеринемічну, імуностимулюючу та антиоксидантну активність [2, 6]. Дослідниками встановлена імуномодулююча активність спатуленолу [11]. Неролідол та ліналоол мають ранозагоювальну та протизапальну активність [1].

Досліджені антибактеріальні властивості ліналоолу та спатуленолу. Встановлено, що вони проявляють виражені бактерицидні властивості на різні штами мікроорганізмів: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* [12]. Встановлені також антибактеріальні властивості каріофіллен оксиду, який діє

бактерицидно проти таких мікроорганізмів: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* [13]. Для α -кадинолу встановлена протигрибкова [15] та протизапальна активність [32]. Ідентифіковані ізомери ліналоолу – *транс*-ліналоол оксид і *цис*-ліналоол оксид у складі ефірної олії проявляють антибактеріальні властивості проти *E. coli*, *S. lutea*, *S. typhimurium* [19].

Експериментально встановлена виражена судинорозширювальна дія евгенола в дослідях на кролях [22]. Досліджена також кардіопротекторна, гіполіпідемічна і гепатопротекторна активність евгенола [25]. Мегастигматрієнону притаманна протівірусна активність, яка була досліджена китайськими науковцями [20].

Сесквітерпеновий спирт – віридіфлорол інгібує ацетилхолінестеразу [17], а також має протизапальні та протипухлинні властивості [28]. Для піперитону, основного компонента ефірної олії чорнобрівців розлогих, характерна виражена протимікробна активність проти таких збудників: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* і *P. aeruginosa* [26, 30, 31]. Також досліджена протигрибкова активність піперитону. Встановлено, що в концентраціях 2 мг/мл та 1,5 мг/мл піперитон діє проти

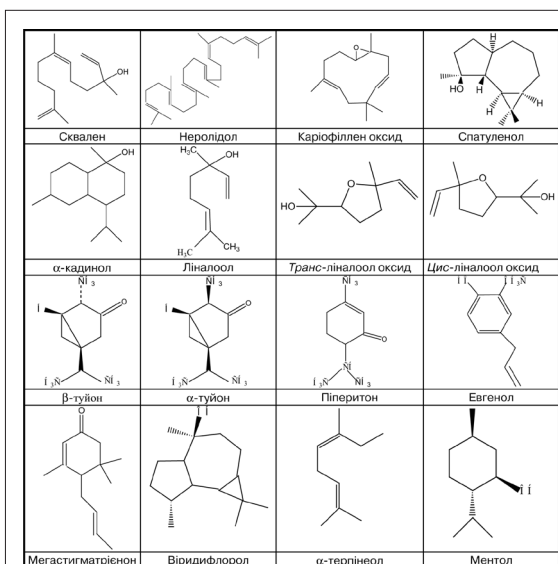


Рисунок. Структурні формули специфічних компонентів надземної частини шовковиці.

Penicillium citrinum та *Mucora rouxii* відповідно [10].

Кисневим похідним біциклічних монотерпенів-кетонів α -туйону і β -туйону притаманні виражені антибактеріальні властивості. Так, при дослідженні антибактеріальної дії густого екстракту з листя шавлії лікарської, до складу якої входили α -туйон і β -туйон, встановлено, що в інтервалі концентрацій від 0,2 до 1,5 % проявляє бактерицидні властивості відносно *S. aureus*, *B. subtilis*, і *P. pyogenosa*. [4]. Терпен – α -терпінеол в експерименті проявляє виражену протигрибкову активність відносно міцеліальних та дріжджоподібних грибів [27], а також антиоксидантні властивості у модельній системі окиснення метил-лінолеату на рівні 80–95 % [8]. Ментол має анестезуючу, антиоксидантну [7], антиплазмідну [29], протівірусну [18], антибактеріальну активність [21, 23, 24].

У зв'язку з встановленням наявності таких біологічно активних речовин як сквален, ліналоол, спатуленол, каріофіллен оксид, піперитон, α -туйон, β -туйон та ментол, вважаємо за доцільне проведення подальших фармакологічних досліджень сировини ЛШБ, ЛШЧ та ПШЧ на предмет вивчення їхніх антибактеріальних властивостей.

Висновки

1. Уперше з використанням методу хромато-мас-спектрометрії встановлений якісний склад і кількісний вміст летких компонентів надземної частини шовковиці.
2. Серед летких компонентів встановлені біологічно активні речовини класу терпеноїдів, що надають перспективу для подальшого фармакологічного дослідження антибактеріальної дії.

1. Атажанова Г. А. Химический состав и фармакологическая активность эфирных масел эндемичных растений флоры Казахстана / Г. А. Атажанова // Химия и технол. растит. веществ: Тезисы докладов IV Всеросс. конф. – Сыктывкар, 2006. – 498 с.
2. Биологически активная добавка «Сквален-Лецитин» на основе семян амаранта / А. В. Лобода, С. Н. Никонович, Т. И. Тимофеев. – Краснодар: Издательский Дом – Юг, 2009. – 122 с.
3. Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих компонентов вегетативной части тополя бальзамического / Исаева Е. В., Ложкина Г. А., Рязанова Т. В. [и др.] // Химия растит. сырья. – 2008. – № 1. – С. 63–66.
4. Исследование изпреноидного состава и антимикробной активности густого экстракта шалфея лекарственного / Кошевой О. Н., Передерий Е. А., Осолодченко Т. П. [и др.] // Клін. фарм. – 2011. – № 1. – С. 74 – 75.
5. Омельченко З. І. Дослідження ліпофільної фракції плодів чумизи / Омельченко З. І., Кисличенко В. С. // Укр. журнал клініч. та лабор. мед. – 2008. – № 2. – С. 50 – 54.
6. Погожева А. В. Диетическая профилактика сосудистых осложнений при сахарном диабете типа 2 / Погожева А. В. // Справ. поликли. врача. – 2010. – № 2. – С. 3 – 10.
7. Сажина Н. Н. Исследование антиоксидантных свойств водного экстракта мяты электрохимическими методами / Сажина Н. Н., Мисин В. М., Короткова Е. И. // Химия раст. сырья. – 2010. – № 4. – С. 77–82.
8. Самусенко А. Л. Исследование антиоксидантной активности эфирных масел лимона, розового грейпфрута, кориандра, гвоздики и их смесей методом капиллярной газовой хроматографии / А. Л. Самусенко // Химия раст. сырья. – 2011. – № 3. – С. 107–112.
9. Черногород Л. Б. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea* L., содержащие фразанол / Черногород Л. Б., Виноградов Б. А. // Растит. ресурсы. – Санкт-Петербург, 2006. – Т. 42. – Вып. 2. – С. 61–68.
10. Abou El-Hamd H. Mohamed., Magdi. A. El-Sayed., Mohamed E. Hegazy. Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba* // Rec. Nat. Prod. – 2010. – V. 4. – P. 1–25.
11. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects / Akram Ziaei., Mohammad Ramezani., Louwance Wright [et al.] // Phytoth. Research. – 2011. – V. 25. – P. 557–562.
12. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum* Species from Tanzania / Bougatsos C., Ngassapa O., Deborah K. [et al.] // Verlag der Zeitsc. fur Naturfor. – 2004. – V. 7. – P. 368–372.
13. Derwich E. Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* AND *Juniperus Phoenicea* / Derwich E., Benziane Z., Chabir R. // Int. J. of Applied Biol. and Pharmaceut. Technol. – 2011. – V. 2. – P. 145–153.
14. Ezhilan B., Neelamegam R. GC-MS Determination of Bioactive Compounds of *Polygonum glabrum* (Wild). // J. Phytol. – 2011. – V. 3. – P. 23–25.
15. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi / Hui-Ting Chang., Ying-Hung Cheng., Chi-Lin Wu. [et al.] // Bioresour. Technolog. – 2008. – V. 99. – P. 6266–6270.

16. Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco / Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J. P. [et al.] // *Int. J. Agric. Biol.*– 2009.– V. 11.– P. 205–208.
17. Inogee B. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of *Mentha* Species / B. Inogee // *J. Agric. Food Chem.*– 1998.– V. 46.– P. 3431–3434.
18. Kerman E. Antiviral substances in plants of the mint family. Peppermint and other mint plants / Kerman E., Kucera L. // *Exper. Biol. Med.*– 1997.– Vol. – P. 874–875.
19. Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic *Salvia* sp. from Turkey / Mehtap Akin., Betul Demirci., Yavuz Bagci., Husnu Can // *African. J. of Biotechn.*– 2010.– V. 9.– P. 2322–2327.
20. Flash gas chromatography for analysis of volatile compounds from *Houttuynia cordata* Thunb / Meiling Q., Xiaoxia G., Minmin L., Ruonong F. // *Analyt. Chim. Acta.*– 2004.– V. 52.– P. 69–72.
21. Moleyar V. Antibacterial activity of essential oil components / Moleyar V., Narasimham P. // *Int. J. of Food Microbiol.*– 1992.– V. 16.– P. 337–342.
22. Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, pungent oil, on rabbit arterial tissues / Nishijima H., Uchida R., Kimiko K. [et al.] // *Jpn. J. Pharmac.*– 1999.– V. 79.– P. 327–334.
23. Pattnaik S. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro / Pattnaik S., Subramanyam V., Kole C. // *Microbios.*– 1996.– V. 86.– P. 237–246.
24. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils / Pattnaik S., Subramanyam V., Bapaji M., Kole C. // *Microbios.*– 1997.– V. 89.– P. 39–46.
25. Prakash P. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions / Prakash P., Gupta N. // *Indian. J. Physiol. Pharmacol.*– 2005.– V. 49.– P. 125–131.
26. Rondon M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela andes / Rondon M., Velasco J., Hernandez J. // *Fitoter.*– 2001.– V. 4.– P. 24–26.
27. Ruberto G. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems / Ruberto G., Baratta M. T. // *Food Chem.*– 2000.– V. 69.– P. 69–75.
28. Rudigera A. L. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae) / Rudigera A. L., Sianib A. C., Veiga V. F. // *Pharmacogn. Rev.*– 2007.– V. 1.– P. 93 – 104.
29. Schelz S. Antimicrobial activity of volatile oils / Schelz S., Molnar J., Hofmann J. // *Int. J. Antimicrob. Agents.*– 2004.– V. 24.– P. 92–98.
30. Shahverdi A. Piperitone from *Mentha longifolia* var. *chorodictya* Rech F. reduces the nitrofurantoin resistance of strains of enterobacteriaceae / Shahverdi A., Rafii F., Tavassoli F. // *Phytother. Res.*– 2004.– V. 18.– P. 911–914.
31. Tereschuk M. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora* / Tereschuk M., Baigor? M., Abdala L. // *Fitoter.*– 2003.– V. 74.– P. 404–406.
32. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves / Yu-Tang Tung., Pei-Ling Yen., Chun-Ya Lin., Shang-Tzen Chang. // *Pharmac. Biol.*– 2010.– V. 48.– P. 1130–1136.

А. А. Цуркан, Т. В. Ковальчук, А. В. Гергель

Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих компонентов надземной части шелковицы

Методом хромато-масс-спектрометрии исследован состав летучих веществ надземной части шелковицы. Установлено, что основными компонентами летучих веществ являются сквален, неролидол, кариофиллен оксид, спатуленол, α -кадинол, линалоол, транс-линалоол оксид та цис-линалоол оксид, виридифлорол 1, виридифлорол 2, мегастигматризон 1, мегастигматризон 4, пиперитон, эвгенол, α -туйон, ментол, β -туйон и α -терпинеол.

Установлена целесообразность последующего фармакологического исследования противомикробного действия сырья шелковицы.

Ключевые слова: шелковица, биологично активные вещества, хромато-масс-спектрометрия

O. Tsurkan, T. Kovalchuk, O. Gergel

GC-MS determination of volatile components from the aerial parts of mulberry

The composition of volatile components from the aerial parts of white and black mulberry was studied using gas chromatography-mass spectrometry. The main compound of volatile components was found to be squalene, nerolidol, caryophyllene oxide, spathulenol, α -cadinol, linalool, trans-linalool oxide and cys-linalool oxide, viridiflorol 1, viridiflorol 2, megastigmatrienon 1, megastigmatrienon 4, piperiton, eugenol, α -thujon, menthol, β -thujon and α -terpineol.

This established the expediency of subsequent pharmacological research of raw material of mulberry on antimicrobial action.

Keywords: mulberry, biologically active compounds, GC-MS

Надійшла: 07.02.2012 р.

Контактна особа: Гергель О. В., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потье, 14, м. Київ, 03680. Тел.: (44) 277-41-18.

О. Є. Ядловський

Роль ванілоїдного компонента в антиноцицептивній дії диклофенаку

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

Ключові слова: диклофенак, капсаїцин, капсазепін, ванілоїдний рецептор TRPV1

На сьогоднішній день вимоги до лікарських засобів стали більш жорсткіші. Це відноситься як до нових, так і до широко відомих лікарських препаратів, що застосовуються в клінічній практиці. Це відноситься й до неопіоїдних аналгетиків та нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ). Одним з аспектів даної проблеми є оптимізація застосування препарату з урахуванням особливостей його фармакодинаміки та фармакокінетики [1]. Тому останніми роками значну увагу приділяють вивченню особливостей механізму дії неопіоїдних аналгетиків. Не виключенням є й диклофенак натрію, особливості фармакодинаміки якого активно досліджуються. Так, останніми роками було відкрито ряд нових механізмів дії даного препарату, що дозволяє дещо по-іншому подивитись на цю широко відому молекулу. Протягом 1990–2000 рр. в експериментах *in vitro* та *in vivo* виявлено блок препаратом потенціал залежних натрієвих каналів, блок кислотнозалежних іонних каналів (ASIC), позитивну модуляцію аллостеричних KCNQ та BK-калієвих каналів (диклофенак відкриває ці канали, що призводить до деполяризації клітинної мембрани) [9, 11]. Увагу фармакологів привернули також специфічні рецептори, що знаходяться на ноцицептивних нейронах. Серед них слід виділити ванілоїдний рецептор TRPV1, який відіграє значну роль у формуванні та проведенні больових стимулів [7, 10].

На сьогоднішній день у ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» проводяться комплексні дослідження з вивчення ванілоїдного

компонента в фармакологічній дії неопіоїдних аналгетиків та НПЗЗ. *Мета дослідження* – вивчення впливу агоністів та антагоністів ванілоїдних рецепторів на антиноцицептивну дію диклофенаку на різних моделях ноцицепції в досліджах *in vivo*. Дані результати є фрагментом комплексу досліджень, що включають також математичні, квантово-хімічні дослідження та дослідження *in vitro* [4].

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження виконано на білих повозрілих нелінійних щурах, масою 160–180 г та білих нелінійних мишах масою 18–22 г розведення віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Тварини знаходилися на стандартному харчовому раціоні відповідно до санітарно гігієнічних норм. Усі дослідження проводились згідно з методиками та вимогами ЕЦ МОЗ України та правилами «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою метою (м. Страсбург, 1986 р.) [5].

У дослідженні використовували агоніст TRPV1 – капсаїцин (Sigma) та його антагоніст капсазепін (Sigma). В експерименті застосовували метод фармакологічного аналізу, для чого аналізатор вводили до чи після введення аналгетика. Досліджувані речовини використовували в дозах: капсаїцин 5 мг/кг п/ш, диклофенак – 26 мг/кг, в/м, капсазепін – 1 мг/кг, в/о. Оцінку анальгезуючої активності сполук проводили на моделі «гарячої пластини», оцтовокислих «корчів», та «Tail-flick» [6, 8, 12].

На моделі «гарячої пластини», експеримент проводили за схемою: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату. Вимірювання латентного періоду реакції проводили через 15, 30, 60 хв після введення аналізатора. 2. Введен-

ня препарату, через 5 хв аналізатора. Вимірювання через 15, 30, 60 хв після введення препарату. Експеримент проводили на приладі Hot plate, відбирали тварин, у яких латентний період реакції «облизування лапки» не перевищував 20 с. Після відбору тварин зважували та маркували. Знеболювальну активність оцінювали за зміною латентного періоду «облизування» лапи.

На моделі «оцтовокислі корчі» експеримент проводили за двома схемами: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату та розчину оцтової кислоти. Вимірювання через 15 хв після введення аналізатора. 2. Введення препарату, через 5 хв аналізатора та розчину оцтової кислоти. Вимірювання через 15 хв після введення препарату. Оцтовокислі «корчі» викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення розчину оцтової кислоти з розрахунку 0,1 мл/10 г маси тіла. Підрахунок кількості «корчів» проводили з 5 по 15 хв (час вимірювали за допомогою секундоміра) після введення розчину оцтової кислоти. Порівнювали число корчів у тварин дослідних та контрольних груп.

На моделі «Tail-flick» експеримент проводили з використанням антагоніста ванілоїдного рецептора капсазепіну і капсаїцину за схемами: 1. Введення аналізатора, через 5 хв препарату. Вимірювання через 15, 30, 60 хв після введення аналізатора. 2. Введення препарату, через 5 хв аналізатора. Вимірювання через 15, 30, 60 хв після введення препарату. Антиноцицептивний ефект оцінювали за зміною латентного періоду відсмикування хвоста від інфрачервоного джерела тепла.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента [2]. Відмінності приймали за достовірні при рівні $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Оцінку спинального рівня антиноцицептивної активності проводили на моделі «Tail-flick». Введення диклофенаку викликало антиноцицептивний ефект у піддослідних тварин на моделі спинальної ноцицептивної активності (табл. 1). На 15 хв після введен-

ня препарату, латентний період реакції в піддослідних тварин зростав до 100,43 %, а через 30 хв на 142,85 %, знижуючись до 83,11 % через 60 хв після введення препарату. Уведення капсаїцину викликало зниження латентного періоду реакції до 19,50 % на 15 хв з наступним зростанням до 48,98 % і 37,60 % на 30 і 60 хв відповідно (табл. 1), що можна пояснити настанням періоду десенситизації при дії капсаїцину на ванілоїдний рецептор. Внутрішньоочеревинне введення капсазепіну викликало достовірний антиноцицептивний ефект лише на 15 хв, що можна пояснити його блокуючою дією. Потім латентний період реакції скорочувався і недостовірно відрізнявся від початкового значення. Попереднє введення капсаїцину практично нівелювало антиноцицептивний ефект диклофенаку в піддослідних тварин – на 15 і 30 хв він практично був відсутній, зростаючи лише на 60 хв, тобто, у той час, коли ноцицептивна дія капсаїцину суттєво знижувалася. Уведення аналізатора після диклофенаку суттєво знижувало величину латентного періоду реакції, проте він достовірно відрізнявся від вихідних значень зростаючи з 48,33 до 112,08 % (табл. 1). Використання антагоніста ванілоїдного рецептора капсазепіну так само впливало на антиноцицептивну активність диклофенаку. Попереднє введення аналізатора знижувало антиноцицептивний ефект анальгетика протягом спостереження. Достовірна, хоча й значно нижча ніж у відповідний період часу при введенні диклофенаку, анальгезія відзначалася лише на 30 хв. Уведення капсазепіну після диклофенаку знижує знеболювальний ефект останнього значно менше. Анальгезія препарату коливалася в межах 43,4–72,5 %.

Важливим завданням було дослідження ролі ванілоїдних рецепторів у реалізації периферичних антиноцицептивних ефектів НПЗЗ на моделі вісцерального болю – «оцтовокислі корчі». Внутрішньоочеревинне введення оцтової кислоти сприяє загальній активації ноцицептивної системи та місцевому вивільненню брадикіні-

Вплив капсаїцину на антиноцицептивну активність диклофенаку при одноразовому внутрішньом'язовому введенні на моделі «Tail-flick», n=6

№	Умови досліджу	Стат. показник	Термін спостереження			
			Вихідне	15 хв	30 хв	60 хв
			Латентний період реакції, с			
1	Диклофенак	M	3,85	7,717	9,35	7,05
		±m	0,367	0,92	1,36	0,301
		% зміни до вихідного контролю	–	+100,43***	+142,85***	+83,11***
2	Капсаїцин	M	4,117	3,317	6,13	5,67
		±m	0,283	0,479	1,52	0,496
		% зміни до вихідного контролю	–	–19,5	+48,98	+37,65*
3	Диклофенак+ капсаїцин	M	4	5,93	7,28	8,48
		±m	0,338	0,77	0,611	0,82
		% зміни до вихідного контролю	–	+48,33*	+82,08**	+112,08*
4	Капсаїцин+ диклофенак	M	4,55	4,73	6,17	8,08
		±m	0,425	0,788	0,82	0,52
		% зміни до вихідного контролю	–	+4,02	+35,53	+77,65**
5	Капсазепін	M	4,28	5,78	5,217	5,017
		±m	0,257	0,32	0,36	0,304
		% зміни до вихідного контролю		+35,01*	+21,78	+17,12
6	Капсазепін+ диклофенак	M	4,68	5,78	5,98	4,6
		±m	0,42	0,53	0,396	0,53
		% зміни до вихідного контролю		+23,05	+27,8*	–1,8
7	Диклофенак+ капсазепін	M	2,88	4,65	4,96	4,13
		±m	0,175	0,477	0,379	1,03
		% зміни до вихідного контролю		+61,45*	+72,5**	+43,4

Примітка. * $P < 0,05$ відносно вихідного; ** $P < 0,01$ відносно вихідного; *** $P < 0,001$ відносно вихідного.

ну, гістаміну, серотоніну, простагландинів та інших альгогенних речовин, що відіграють значну роль у розвитку запальної реакції. Це призводить до розвитку мимовільних скорочень черевних м'язів – «корчі».

Диклофенак виявляв значний антиноцицептивний ефект, пригнічуючи кількість корчів на 81,25 % у порівнянні з контролем (табл. 2). Уведення капсаїцину піддослідним тваринам практично не впливало на кількість «корчів» у порівнянні з контролем. Введення аналізатора після диклофена-

ку не впливало на антиноцицептивний ефект останнього (табл. 2). Однак попереднє введення капсаїцину суттєво знижувало анальгезію, викликану диклофенаком. Кількість «корчів» знижувалася на 46,87 %, не достовірно відрізняючись від контролю.

Результати щодо участі TRPV1 у центральному компоненті антиноцицептивної дії диклофенаку наведено в таблиці 3. Дослідження проводили на моделі «гаряча пластина», що характеризує супраспинальний компонент дії анальгезуючих засобів.

Таблиця 2

**Вплив капсаїцину на антиноцицептивну активність диклофенаку
на моделі «оцетовокислі корчі», n=6**

Умови досліджу	Кількість «корчів», M±m	Зміни до контролю, %
Диклофенак	3,00±2,53	-81,250 %*
Капсаїцин	14,83±5,85	-7,290%
Диклофенак + Капсаїцин	2,00±4,89	-87,50 %*
Капсаїцин + Диклофенак	8,50±3,44	-46,870%
Контроль	16,00±4,51	–

Примітка. *P<0,05 відносно контролю.

Таблиця 3

**Вплив капсаїцину на антиноцицептивний ефект диклофенаку
на моделі «гаряча пластина» n=6**

Умови досліджу	Стат. показник	Термін спостереження		
		Вихідне	15 хв	30 хв
		Латентний період реакції, с		
Диклофенак	M	9,62	36,12	16,88
	±m	1,824	8,54	1,41
	% зміни до вихідного контролю	–	+275,46***	+75,46**
Капсаїцин	M	8,22	34,8	34,66
	±m	2,357	9,458	11,77
	% зміни до вихідного контролю	–	+323,35***	+321,65***
Диклофенак+ Капсаїцин	M	10,58	48,36	54,6
	±m	1,826	6,55	4,929
	% зміни до вихідного контролю	–	+357,08***	+416,06***
Капсаїцин + диклофенак	M	10,22	60	60
	±m	1,598	0	0
	% зміни до вихідного контролю	–	+487,08***	+487,08***

Примітка. ** P<0,01 відносно вихідного; *** P<0,001 відносно вихідного.

У використаних дозах диклофенак виявляв значну антиноцицептивну активність, збільшуючи латентний період реакції до 275,4 % на 15 хв і 15,6 % на 30 хв експерименту. Капсаїцин так само виявляв значний антиноцицептивний ефект (табл. 3). Уведення капсаїцину як до, так і після препарату викликало суттєве збільшення латентного періоду реакції в піддослідних тварин на 357,08–487,08 %, у залежності від терміну спостереження.

Отримані дані показали різноспрямовану модуляцію антиноцицептивного ефекту диклофенаку капсаїцином. Так, на моделях, що характеризують спинальний та периферичний рівень ноцицепції, виявлено суттєве зниження антиноцицептивного ефекту диклофенаку,

тоді як при оцінці центрального компоненту дії, виявлялось потенціювання антиноцицептивного ефекту. Отримані дані можна пояснити, більш низькою кількістю TRPV1 у ЦНС і дещо іншою функціональністю, у порівнянні з іншими ланками ноцицептивної системи [3, 10], а також особливостями фармакодинаміки диклофенаку. Вирішення цих питань потребує подальших досліджень.

Висновок

Виявлено модуляцію капсаїцином антиноцицептивного ефекту диклофенаку як на центральному, так і на периферичному рівні, що дає підстави передбачати ванілоїдний компонент у антиноцицептивній дії диклофенаку.

1. Каннер Р. Секреты лечения боли / Р. Каннер.– М.: «Издательство БИНОМ», 2006.– 400 с.
2. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабиц П. Н.– К.: Морион, 2002.– 640 с.
3. Миронов Н. Ю. Ванилоидные рецепторы: структура, участие в регулировании функций организма, терапевтический потенциал / Миронов Н. Ю., Чурюканов В. В. // Экспер. и клин. фармакология.– 2006.– Т. 69.– № 5.– С. 55 – 69.
4. Мончак І. Л. Порівняльні дослідження впливу піродазолу, парацетамолу та кеторолаку на ванилоїдний рецептор TRPV1 / Мончак І. Л., Ядловський О. Є., Бухтіарова Т. А., Соловйов А. І. // Фармакологія та лікарська токсикологія.– 2011.– № 1.– С. 35–39.
5. Стефанов А. В. Доклинические исследования лекарственных средств: Методические рекомендации / Стефанов А. В.– К.: Авиценна, 2002.– 568 с.
6. D'Amoue F. E. A method for determining lose of pain sensation / D'Amoue F. E., Smalh D. L. // J. Pharmacol. Exp. Ther.– 1941.– V. 72.– P. 74.
7. Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels / Brauchi S, Orta G, Mascayano C. [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.– 2007.– V. 104, № 24.– P. 10246–51.
8. Komlos E., Porsresr J., Knole J. Morfin – prostigmin synergismus // Az. Acta. Phisiologica. Acad. Scient. Hungaricae.– 1950.– № 1.– P. 77–83.
9. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac / M. I. Ortiz, J. E. Torres-Lopez, G. Castaneda-Hernandez // European Journal of Pharmacology.– 2002.– V. 43.– P. 85–91.
10. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists / Cui M., Honore P., Zhong C. [et. all.] // J. Neurosci.– 2006.– V. 26, № 37.– P. 9385–93.
11. Voilley N. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): New Targets for the Analgesic Effects of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) / N.Voilley // Current Drug Targets – Inflammation & Allergy.– 2004.– V. 3, № 1.– P. 71–79.
12. Wood R. L. Animal models in analgesic testing // Analgesics: Neurochemical, Behavioral and Clinical perspectives / M. Kuhar, J. Pasternak Ed.– Raven Press / New-York. –1941.– V.42.– 74 p.

О. Е. Ядловский

Роль ванилоидного рецептора в антиноцицептивном действии диклофенака

Исследована роль ванилоидного рецептора в антиноцицептивном действии диклофенака на модели спинальной ноцицептивной стимуляции «Tail-flick» и супраспинальной анальгезии «Hot plate», а также на модели висцеральных болей «уксусноокислые корчи». Выявлено снижение капсаицином и капсазепином антиноцицептивного эффекта диклофенака на спинальном, а также на периферическом уровне.

Ключевые слова: диклофенак, капсаицин, капсазепин, ванилоидный рецептор TRPV1

О. Е. Iadlovsky

The role of vanilloid receptor TRPV1 in antynociceptive action of diclofenac

It was studied the role of TRPV1 in the antynociceptive action of diclofenac on the model of spinal nociceptive action «Tail-flick» and supraspinal nociceptive action «Hot plate» as well as visceral pain model «cramps»-test. It was shown that capsaicin and capsazepine reduced antinociceptive effect of diclofenac at spinal as well as at peripheral levels.

Key words: capsaicin, capsazepine, diclofenac, TRPV1

Надійшла: 14.11.2011 р.

Контактна особа: Ядловський О. Є., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потье, 14, м. Київ, 03680. Тел.: (44) 456-42-56.

О. В. Кашуба

Побічні реакції, спричинені нестероїдними протизапальними лікарськими засобами диклофенаком і німесулідом в Україні: порівняльне статистичне дослідження та прогноз (Частина 2)

ННЦ «Інститут кардіології імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України», м. Київ

Ключові слова: нестероїдні протизапальні лікарські засоби, диклофенак, німесулід, побічна реакція, системний прояв, статистична достовірність

Аналіз побічних реакцій залежно від віку та статі пацієнтів

На подальших етапах нашого дослідження випадків ПР, спричинених диклофенаком та німесулідом, було проведено аналіз пацієнтів залежно від їх віку та розподілу по окремих вікових категоріях, а також статі та залежності системних проявів ПР від гендерних особливостей.

Результати аналізу пацієнтів за віком, у яких були виявлені ПР при застосуванні диклофенаку та німесуліду і про які

було повідомлено, методами описової статистики наведено в таблиці 19.

Для визначення адекватної міри центральної тенденції, яку потрібно було використати для опису даних про вік пацієнтів, було виконано перевірку нормальності розподілу за допомогою критерію Шапіро-Уїлка (табл. 20). Оскільки дані, що аналізуються, розподілені не нормально, то адекватною мірою центральної тенденції для опису цих даних є медіана. Медіани, межі їх 95 % ДІ, верхня та нижня квартилі наведено в таблиці 21.

Для перевірки достовірності відмінностей між препаратами за віком було застосовано критерій Манна-Уїтні (табл. 22 і табл. 23).

Таблиця 19

Результати порівняльного аналізу пацієнтів за віком, у яких виникали ПР при застосуванні диклофенаку та німесуліду

Препарат	N	Середнє арифметичне	Медіана	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум
Диклофенак	1098	53,99	54	15,45	16	95
Німесулід	416	41,75	45	23,23	1	91

Таблиця 20

Результати перевірки нормальності розподілу даних за допомогою критерію Шапіро-Уїлка

Показник	Препарат	Статистика Шапіро-Уїлка	Кількість випадків	p-значення	Висновок щодо нормальності розподілу*
Вік, роки	Диклофенак	0,992	1098	0,000	Не нормальний
	Німесулід	0,962	416	0,000	Не нормальний

Примітка.* При рівні значущості 0,01.

Таблиця 21

Медіани віку пацієнтів з ПР, 95 % ДІ, верхня та нижня квартилі

Препарат	N	Медіана	Квартилі		Межі 95 % ДІ	
			Нижня	Верхня	Нижня	Верхня
Диклофенак	1098	54	44	65	53	55
Німесулід	416	45	23	61	41	47

**Результати порівняння пацієнтів, у яких було виявлено ПР
у зв'язку з застосуванням диклофенаку та німесулід у віком
з використанням критерію Манна-Уїтні**

Показник	Критерій Манна-Уїтні	Критерій Вілкоксона	Z	p-зна- чення	Висновок щодо достовірності відмінностей*
Вік, роки	159345	245250	-8,894	0,000	Достовірні

Примітка.* Висновок зроблено при рівні значущості 0,05.

**Додаткові рангові статистичні значення, одержані при порівнянні пацієнтів,
у яких було виявлено ПР у зв'язку з застосуванням диклофенаку та
німесулід, за віком з використанням критерію Манна-Уїтні**

Показник	Група	N	Рангові значення	Сума рангів
Вік, роки	Диклофенак	1098	815,85	892536
	Німесулід	416	592,39	245250

Таким чином, вік пацієнтів, у яких були виявлені ПР при медичному застосуванні диклофенаку, становив від 16 до 95 років, Ме = 54 роки (95 % ДІ: 53–55 років), а для пацієнтів з ПР, що були пов'язані з застосуванням німесулід, вік становив від 1 до 91 років, Ме = 45 років (95 % ДІ: 41–47 років). Пацієнти, у яких були виявлені ПР у зв'язку з застосуванням німесулід, є статистично достовірно молодшими ($P < 0,001$), ніж ті, у яких було виявлено ПР у зв'язку з застосуванням диклофенаку.

Результати аналізу кількості ПР, що були виявлені при застосуванні диклофенаку залежно від вікової категорії, наведено в таблиці 24, а німесулід – у таблиці 25. Результати порівняльного аналізу наведено в таблиці 26. Графічно розподіл пацієнтів за віковими категоріями наведено на рисунку 13 при медичному застосуванні диклофенаку та на рисунку 14 – німесулід.

Для перевірки достовірності відмінностей між ПР диклофенаку та німесу-

лід за віковими категоріями було застосовано критерій χ^2 Пірсона. Згідно з результатами, відмінності за віковими категоріями для цих препаратів є достовірними ($P < 0,001$).

З метою виявлення відмінностей між категоріями було виконано порівняння груп по кожній віковій категорії. Враховуючи повторне використання даних при порівнянні, з метою елімінації ефекту множинних порівнянь було застосовано зменшення рівня значущості, використовуючи метод Бонферроні. Тому для кожного окремого порівняння рівень значущості становив $0,05/8 = 0,00625$.

Таким чином, виконаний аналіз щодо розподілу пацієнтів з ПР при медичному застосуванні диклофенаку та німесулід за віком, виявив, що:

- найбільша частка пацієнтів, у яких виявлені ПР при застосуванні диклофенаку та німесулід, була у віковій категорії 46–60 років: 38,3 % (95 % ДІ: 35,46–41,22 %) –

Розподіл ПР диклофенаку залежно від вікової категорії

Вікова категорія, роки	Частка, %	Межі 95 % ДІ	
		Нижня, %	Верхня, %
0–11	0,00	–	–
12–18	0,82	0,43	1,56
19–30	6,31	5,01	7,91
31–45	21,21	18,89	23,73
46–60	38,30	35,46	41,22
61–72	19,74	17,49	22,21
73–80	9,96	8,33	11,88
Старше 80	3,66	2,70	4,94
Разом	100	–	–

Розподіл ПР німесулід у залежності від вікової категорії

Вікова категорія, роки	Частка, %	Межі 95 % ДІ	
		Нижня, %	Верхня, %
0–11	15,46	12,30	19,26
12–18	5,56	3,73	8,20
19–30	10,87	8,22	14,24
31–45	20,29	16,70	24,43
46–60	22,46	18,71	26,73
61–72	17,39	14,04	21,34
73–80	5,56	3,73	8,20
Старше 80	2,42	1,32	4,39
Разом	100	–	–

Таблиця 26

Аналіз та оцінка статистичної достовірності відмінностей між ПР диклофенаку та німесулід за віковими категоріями пацієнтів

Вікова категорія, роки	Диклофенак, % (n=1098)	Німесулід, % (n=416)	p-значення
0–11	0,00	15,46	0,0000*
12–18	0,82	5,56	0,0000*
19–30	6,31	10,87	0,0040*
31–45	21,21	20,29	0,7494
46–60	38,30	22,46	0,0000*
61–72	19,74	17,39	0,3351
73–80	9,96	5,56	0,0093
Старше 80	3,66	2,42	0,2984
Разом	100	100	–

Примітка.* Відмінності за цією віковою категорією є достовірними при рівні значущості 0,00625.

диклофенаку і 22,46 % (95 % ДІ: 18,71–26,73 %) – німесулід;

- б) частка пацієнтів, у яких виявлені ПР, пов'язані з застосуванням німесулід є достовірно вищою для категорій 0–11 років, 12–18 років та 19–30 років і достовірно нижчою для категорії 46–60 років у порівнянні з частками пацієнтів відповідних категорій, у яких було виявлено ПР, пов'язані з застосуванням диклофенаку.

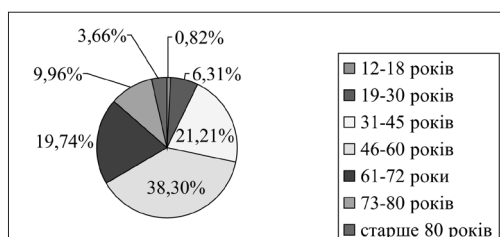


Рис. 13. Розподіл пацієнтів, у яких було виявлено ПР при медичному застосуванні диклофенаку, за віковими категоріями (n = 1098).

Отже, як показали представлені вище результати нашого дослідження, вік пацієнтів, у яких мали місце ПР при медичному застосуванні диклофенаку, складав 16–95 років, а німесулід – 1–91 рік. Останнє пояснюється тим, що диклофенак не застосовувався і не застосовується в дитячому віці, а німесулід до 2007–2008 рр. призначався дітям різного віку.

У даному дослідженні спільним для диклофенаку та німесулід є те, що ПР при прийомі цих НПЗП спостерігалися

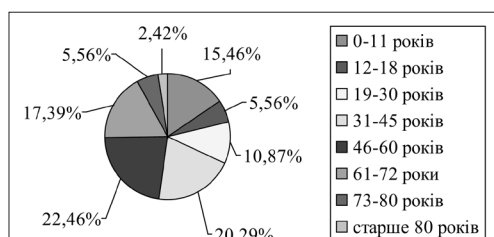


Рис. 14. Розподіл пацієнтів, у яких було виявлені ПР, при медичному застосуванні німесулід, за віковими категоріями (n = 416).

переважно в пацієнтів 46–60 років. Адже саме в такому віці розвиваються такі ревматичні захворювання, як остеоартроз і зростає частота відвідувань лікарів відповідного фаху, а саме терапевта, ревматолога, зокрема.

На наступному етапі було проведено порівняльний аналіз випадків ПР, виявлених при застосуванні диклофенаку та німесулід, залежно від статі.

Результати аналізу кількості ПР, що були виявлені при застосуванні диклофенаку залежно від статі, наведено в таблиці 27, а для німесулід – у таблиці 28.

Графічно розподіл повідомлень про ПР залежно від статі наведено на рисунку 15.

Таку спільну, представлену на рисунку 15, для диклофенаку та німесулід статистичну ознаку як кількісна перевага жінок над чоловіками у випадках, спричинених цими ЛЗ ПР (63,93 % жінок з ПР при прийомі диклофенаку та 63,9 % жінок з ПР при застосуванні німесулід), можна пояснити більшою частотою звернення саме жіночої верстви населення України за наданням медичної допомоги на відміну від чоловіків. Звичайно, не слід наполягати на категоричності такого пояснення без проведення широкомасштабних фармакоепідеміологічних досліджень.

Достовірність відмінностей між частками чоловіків і жінок з виявленими ПР при застосуванні диклофенаку та німесулід було перевірено за допомо-

гою критерію χ^2 Пірсона з поправкою Йетса (табл. 29).

Таким чином, у результаті проведеного статистичного аналізу виявлено:

- частка жінок, у яких виникали ПР при застосуванні нестероїдних протизапальних засобів диклофенаку та німесулід, є більшою в порівнянні з часткою чоловіків і становить 63,93 % (95 % ДІ: 61,04–66,72 %) при медичному застосуванні диклофенаку та 63,90 % (95 % ДІ: 59,14–68,40 %) – німесулід;
- відмінності між диклофенаком та німесулідом за гендерним розподілом випадків, спричинених ними, ПР є статистично не достовірними ($p = 0,959$).

З метою виявлення залежності системних проявів ПР від статі було виконано аналіз найпоширеніших системних уражень (табл. 30).

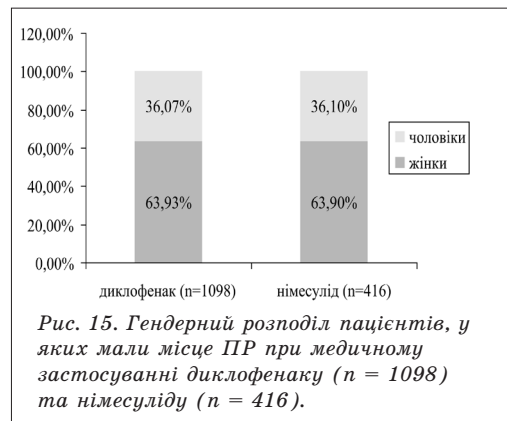


Рис. 15. Гендерний розподіл пацієнтів, у яких мали місце ПР при медичному застосуванні диклофенаку ($n = 1098$) та німесулід ($n = 416$).

Таблиця 27

Розподіл ПР, що були виявлені при застосуванні диклофенаку, залежно від статі

Стать	Частка, %	Межі 95 % ДІ	
		Нижня, %	Верхня, %
Жінки	63,93	61,04	66,72
Чоловіки	36,07	33,28	38,96
Разом	100	–	–

Таблиця 28

Розподіл ПР, що були виявлені при застосуванні німесулід, залежно від статі

Стать	Частка, %	Межі 95 % ДІ	
		Нижня, %	Верхня, %
Жінки	63,90	59,14	68,40
Чоловіки	36,10	31,60	40,86
Разом	100	–	–

Результати перевірки достовірності відмінностей між диклофенаком та німесулідом за гендерним розподілом випадків ПР, спричинених ними

Статистичний показник	Значення
Разраховане значення критерію χ^2	0,003
Число ступенів свободи	1
Заданий рівень значущості (альфа)	0,05
Критичне значення критерію χ^2	3,84
Досягнутий рівень значущості (p)	0,959

Результати аналізу системних проявів залежно від статі наведено в таблиці 31 для диклофенаку та в таблиці 32 для німесуліду.

Перевірку достовірності відмінностей між чоловіками та жінками за системними проявами ПР було виконано за допомогою критерію χ^2 Пірсона (табл. 32 – для диклофенаку та табл. 33

– для німесуліду). Як бачимо з таблиці 31, відмінності між чоловіками та жінками за системними проявами ПР, спричиненими диклофенаком, є не достовірними. У ситуації з німесулідом, як показано в таблиці 32, відмінності між чоловіками та жінками достовірні. У зв'язку з виявленими достовірними відмінностями між чоловіками та

Таблиця 30

Системні прояви ПР, використані для аналізу відмінностей, що залежали від статі

Код	Системний прояв ПР
1	Порушення з боку шлунково-кишкового тракту
2	Зміни з боку шкіри та її похідних
3	Загальні алергічні реакції
4	Набряк Квінке
5	Серцево-судинні розлади, загальні
6	Реакція в місці введення
7	Порушення з боку центральної та периферійної нервової системи
8	Анафілактичний шок
9	Анафілактична реакція
10	Порушення з боку органів дихання
11	Інші

Таблиця 31

Аналіз та оцінка достовірності відмінностей системних проявів ПР диклофенаку залежно від статі

Системний прояв ПР	Чоловіки, % (n=398)	Жінки, % (n=700)	p-значення
Порушення з боку шлунково-кишкового тракту	39,75	36,57	p = 0,794
Зміни з боку шкіри та її похідних	26,33	27,43	
Загальні алергічні реакції	14,43	18,43	
Набряк Квінке	3,29	2,57	
Серцево-судинні розлади, загальні	2,53	2,86	
Реакція в місці введення	3,04	2,29	
Порушення центральної та периферійної нервової системи	3,04	2,29	
Анафілактичний шок	2,28	1,71	
Анафілактична реакція	1,27	1,14	
Порушення з боку органів дихання	0,76	1,43	
Інші	3,29	3,29	
Разом	100	100	–

Таблиця 32

**Аналіз та оцінка достовірності відмінностей системних проявів
ПР німесуліді залежно від статі**

Системний прояв ПР	Чоловіки, % (n=151)	Жінки, % (n=265)	p-значення
Порушення з боку шлунково-кишкового тракту	25,00	29,39	p = 0,015
Зміни з боку шкіри та її похідних	53,38	40,08	
Загальні алергічні реакції	7,43	17,56	
Набряк Квінке	3,38	1,91	
Серцево-судинні розлади, загальні	0,00	3,44	
Порушення центральної та периферійної нервової системи	4,05	3,82	
Анафілактичний шок	0,68	0,38	
Анафілактична реакція	0,68	0,38	
Інші	5,41	3,05	
Разом	100	100	–

Таблиця 33

**Статистичне порівняння системних проявів ПР залежно
від статі при медичному застосуванні німесуліді**

Системний прояв ПР	Статистичний показник	Значення
Порушення з боку шлунково-кишкового тракту	Розраховане значення критерію χ^2	0,702
	Число ступенів свободи	1
	Рівень значущості	0,05
	Критичне значення критерію χ^2	3,84
	Досягнутий рівень значущості (p-значення)	0,4020
Зміни з боку шкіри та її похідних	Розраховане значення критерію χ^2	6,238
	Число ступенів свободи	1
	Рівень значущості	0,05
	Критичне значення критерію χ^2	3,84
	Досягнутий рівень значущості (p-значення)	0,0125*
Загальні алергічні реакції	Розраховане значення критерію χ^2	7,276
	Число ступенів свободи	1
	Рівень значущості	0,05
	Критичне значення критерію χ^2	3,84
	Досягнутий рівень значущості (p-значення)	0,0070*

Примітка.* Відмінності є достовірними при рівні значущості 0,017.

жінками за системними проявами ПР при медичному застосуванні німесуліді (p = 0,015) було зроблено додатковий аналіз з метою порівняння за трьома групами основних системних проявів ПР – порушення ШКТ, зміни з боку шкіри та її похідних, загальні алергічні реакції. Результати наведено в таблиці 33. При висновку щодо достовірності відмінностей рівень значущості було зменшено в 3 рази, оскільки було виконано 3 порівняння (0,05/3 = 0,017).

Відповідно до даних, представлених у таблицях 32 та 33, серед пацієнтів, що приймали німесулід, виявлені ста-

тистичні відмінності між чоловіками та жінками за кількісним розподілом спричинених цим НПЗП системних проявів ПР: у чоловіків достовірно переважає така група алергічних реакцій, як зміни з боку шкіри та її похідних (p = 0,0125), а в жінок переважають саме загальні алергічні реакції (p = 0,007). Таким чином, може виникнути гіпотеза про те, що характерною особливістю ризику розвитку спричинених німесулідом алергічних реакцій для пацієнтів чоловічої статі є шкірні прояви, а для пацієнтів жіночої статі – загальні алергічні реакції. Проведення

моніторингу медичного застосування німесулід у має стати засобом перевірки згаданої гіпотези.

Висновки

Частка жінок, у яких виявлено ПР при застосуванні диклофенаку та німесулід, є більшою в порівнянні з часткою чоловіків і становить відповідно 63,93 % (диклофенак) та 63,90 % (німесулід).

Пацієнти, у яких були виявлені ПР у зв'язку з застосуванням німесулід у

статистично достовірно молодшими, ніж ті, у яких було виявлено ПР при медичному застосуванні диклофенаку.

Результати проведеного дослідження не дають можливість об'єктивно визначити ступінь ризику виникнення спричинених диклофенаком та німесулідом системних проявів ПР у пацієнта. Ефективному та своєчасному виявленню ризику розвитку ПР диклофенаку та німесулід сприятиме проведення моніторингу медичного застосування таких НПЗП.

1. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич.– К.: МОРИОН, 2002.– 640 с.
2. Лапач С. Н. Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич.– К.: МОРИОН, 2002.– 160 с.
3. Принципы применения статистических методов при проведении клинических испытаний лекарственных средств. Метод. рекомендации / Чубенко А. В., Бабич П. Н., Лапач С. Н. [и др.].– К.: Авиценна, 2003.– 60 с.
4. Применение современных статистических методов в практике клинических испытаний. Сообщение первое. Сравнение двух пропорций / Чубенко А. В., Бабич П. Н., Лапач С. Н., Ефимцева Т. К. // Укр. мед. часопис.– 2003.– № 4 (36).– С. 139–143.
5. Чубенко А. В. Медицина, основанная на доказательствах, и современные информационные технологии / А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, С. Н. Лапач // Укр. мед. часопис.– 2004.– № 2 (40).– С. 49–56.
6. Бабич П. Н., Чубенко А. В., Лапач С. Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи-квадрат // Укр. мед. часопис.– 2004.– № 2 (40).– С. 138–144.
7. Бабич П. Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятие, вычисление и интерпретация / П. Н. Бабич, А. В. Чубенко, С. Н. Лапач // Укр. мед. часопис.– 2005.– № 2 (46).– С. 113–119.

А. В. Кашуба

Побочные реакции, обусловленные нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами диклофенаком и нимесулидом в Украине: сравнительное статистическое исследование и прогноз

В статье представлен анализ отечественных данных о побочных реакциях (ПР), обусловленных нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами диклофенаком и нимесулидом. Проанализированы карты-сообщения о 1098 случаях ПР при медицинском применении диклофенака и 416 случаях ПР – нимесулида в 1996–2010 гг., присланные врачами Украины. Анализ данных о ПР, обусловленных диклофенаком и нимесулидом, свидетельствует о высоком уровне возникновения ПР типа В при медицинском применении этих препаратов в Украине. Клинические особенности обусловленных диклофенаком и нимесулидом ПР и статистически достоверные различия между этими препаратами свидетельствуют о необходимости мониторинга медицинского применения диклофенака и нимесулида.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, диклофенак, нимесулид, побочная реакция, системное проявление, статистическая достоверность

О. V. Kashuba

Adverse reactions caused by diclofenac and nimesulide as nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Ukraine: comparative statistical study and prognosis

This article represents the analysis of native data about adverse drug reactions (ADRs) caused by diclofenac and nimesulide as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Ukrainian physicians sent the cards-messages about 1098. ADRs chances due to medical application of diclofenac and 416 ADRs chances due to medical application of nimesulide in 1996–2010 which have been analysed. The analysis of diclofenac and nimesulide ADRs data testifies to a high level of type B ADRs occurrence due to medical application of these drugs in Ukraine. Clinical features of diclofenac and nimesulide ADRs and statistical significant difference between these drugs testify about necessity of diclofenac and nimesulide medical application monitoring.

Key words: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac, nimesulide, adverse reaction, system sign, statistical significance

Надійшла: 03.10.2011 р.

Контактна особа: Кашуба Олександр Валерійович, молодший науковий співробітник, відділ клінічної фармакології з лабораторією функціональної діагностики, ННЦ «Інститут кардіології імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України», вул. Народного ополчення, 5, Київ, 03151.
Тел.: (50) 616-53-48. E-mail: olaexandrashuba@meta.ua

В. П. Попович¹, Б. П. Громовик², П. В. Глуховський³

Ринковий сегмент гепатопротекторів у груповому та індивідуальному вимірах

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

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

³Національний університет Лос-Анджелесу, Каліфорнія, США

Ключові слова: гепатопротектори, торгові назви, топ-10, обсяг продажів, середньозважена ціна однієї упаковки

Хвороби печінки розглядаються ВООЗ як серйозна проблема охорони здоров'я населення, що зумовлено їхнім глобальним розповсюдженням, тривалим перебігом, несприятливими наслідками [1]. Зазначена проблема є актуальною й для нашої держави. З цієї причини важливим є питання оцінки стану ринку гепатопротекторних лікарських засобів (ЛЗ) в Україні.

У попередніх дослідженнях було проаналізовано стан аптечного ринку гепатотропних препаратів за перше півріччя 2003 р. в асортиментному та грошовому вираженні [2]. Вивчено динаміку реєстрації ЛЗ для лікування захворювань гепатобіліарної системи в період з 1991 до 2007 рр. [10]. Отримано ретроспективні дані (01.07.2004–01.10.2007 р.) щодо тенденції реєстрації гепатопротекторів за країнами-виробниками й сировиною походження, а також їхньої реальної присутності на оптовому вітчизняному ринку [5]. Показано необхідність доопрацювання вітчизняного Національного переліку Основних ЛЗ у бік зменшення та конкретизації шляхом введення обмежень за умов максимального наближення до рекомендацій ВООЗ [6]. На підставі аналізу асортименту й обсягів продажів в аптеці з 01.09.2009 р. по 01.03.2010 р. виявлено уподобання лікарів і пацієнтів до гепатопротекторів і визначено найприбутковіші з них [11]. Станом на 15.12.2010 р. встановлено особливості розподілу гепатопротекторів за класифікаційною системою АТС, їхніми виробниками та заявниками, формами виходу на вітчизняний ринок. Запропоновано індекс асортиментної

залежності від імпорту, проаналізовано терміни придатності, особливості та обмеження при застосуванні гепатопротекторів у дітей [8].

Зважаючи на згадані вище дослідження, слід зазначити, що питання фармацевтичної діагностики обсягів реалізації окремих груп і торгових марок гепатопротекторів у грошовому та натуральному виразах належним чином не висвітлювалися.

Мета дослідження – проаналізувати ринковий сегмент гепатопротекторів 5 рівня АТХ класифікаційної системи і топ-10 торгових назв за 2006–2010 рр.

Матеріали та методи. Використано методи: пошуку, аналізу та узагальнення даних інформаційних джерел, маркетингового та статистичного аналізів, моделювання. Матеріали дослідження: дані маркетингових компаній щодо фармацевтичного ринку за 2006–2010 рр., електронні бази Державного реєстру ЛЗ [<http://www.drlz.kiev.ua/>] і Компендіуму [<http://compendium.com.ua/>]. Відповідно до міжнародної класифікаційної системи АТС досліджувалися ЛЗ групи А05В «Гепатопротектори». Крім цього було враховано рекомендації розділу 3.7 «Гепатопротектори» Державного формуляра ЛЗ щодо кислоти урсодеоксихолевої та препаратів екстракту артишоку з підгрупи А05А «Засоби, що застосовуються в разі біліарної патології». Усвідомлюючи, що гепафорте, зареєстрований за кодом А05ВА08 «Гліциризова кислота», містить фосфоліпіди, його віднесено до коду А05ВА50 «Різні препарати», як і в Компендіумі. У процесі маркетингового аналізу обсяг реалізації визначався за окремими торговими назвами без поділу на лікарські форми та дози.

Результати та їх обговорення. Унаслідок матричної обробки даних обсягів реалізації в грошовому і натуральному виразах встановлено, що лідерами рейтингу в

2006 р. були гепатопротектори, що відносяться до групи А05В А50 «Різні препарати» (натуральні та есенціальні фосфоліпіди, фосфоліпіди, їхні комбінації, тіотриазолін тощо) (табл. 1). Їхня частка складала 59,5 % в грн та 49,1 % в упаковках. Друге місце за співвідношенням обсягів продажів обіймали ЛЗ А05В А03 «Силімарин» (15,8 % у грн та 33,4 % в

упаковках), а третє – А05В А53 «Силімарин, комбінації» (13,5 % і 10,6 % відповідно). Інші групи гепатопротекторів (А05А А02 «Кислота урсодеоксихолева», А05В А01 «Аргінін глутамат» і А05А Х10 «Препарати екстракту артишоку») характеризувалися низькою часткою.

Як видно з даних таблиці 2, національний фармацевтичний ринок у 2010 р.

Таблиця 1

Матриця обсягу продажів «тис. грн – тис. уп.» гепатопротекторів за 2006 р.

max ← Обсяг реалізації, тис. грн. → min (%)	min	Обсяг реалізації, тис. уп., %						max
		135,65 (1,4)	141,49 (1,5)	350,9 (3,7)	1011,84 (10,6)	3181,41 (33,4)	4714,05 (49,1)	
	1775,43 (0,8)	A05A X10						
	7935,08 (3,7)			A05B A01				
	14616,82 (6,7)		A05A A02					
	29231,28 (13,5)				A05B A53			
	34146,21 (15,8)					A05B A03		
	128705,59 (59,5)						A05B A50	
	A05AX10 – Препарати екстракту артишоку; A05BA01 – Аргінін глутамат; A05AA02 – Кислота урсодеоксихолева; A05BA03 – Силімарин; A05BA50 – Різні препарати (натуральні та есенціальні фосфоліпіди, фосфоліпіди, їхні комбінації тощо), тіотриазолін; A05BA53 – Силімарин, комбінації.							

Таблиця 2

Матриця обсягу продажів «тис. грн.– тис. уп.» гепатопротекторів за 2010 р.

max ← Обсяг реалізації, тис. грн. → min (%)	min	Обсяг реалізації, тис. уп., %						max
		12,65 (0,1)	234,97 (2,6)	237,78 (2,6)	490,33 (5,4)	982,66 (10,9)	2234,07 (24,8)	4826,01 (53,5)
	4269,49 (0,9)		A05A X10					
	4690,07 (1,0)	A05B A06						
	15073,21 (3,2)				A05B A01			
	44776,16 (9,7)					A05B A53		
	48502,69 (10,5)			A05A A02				
	72115,22 (15,6)						A05B A03	
	274295,78 (59,1)							A05B A50
	A05AX10 – Препарати екстракту артишоку; A05BA01 – Аргінін глутамат; A05AA02 – Кислота урсодеоксихолева; A05BA03 – Силімарин; A05BA06 – Орнітин оксоглурат; A05BA50 – Різні препарати (натуральні та есенціальні фосфоліпіди, фосфоліпіди, їхні комбінації тощо), тіотриазолін; A05BA53 – Силімарин, комбінації.							

характеризувався наявністю вже не 6, а 7 груп гепатопротекторів 5 рівня АТХ класифікаційної системи, позаяк з 2009 р. зареєстровані ЛЗ А05В А06 «Орнітин оксоглурат». Як у 2006 р., так і в 2010 р. лідерами за обсягами продажів були ЛЗ з групи А05В А50 «Різні препарати» (59,1 % у грн та 53,5 % в упаковках). При цьому частка продажів цих ЛЗ у грошовому виразі дещо зменшилась, проте зросла частка в натуральному показнику. Друге місце за співвідношенням обсягів продажів обіймали ЛЗ А05В А03 «Силімарин» (15,6 % у грн та 24,8 % в упаковках), для яких характерне зменшення частки обсягів продаж у натуральних показниках. Третє місце за обсягом продажів в упаковках (10,9 %) і четверте в грошовому виразі (9,7 %) зайняли ЛЗ А05В А53 «Силімарин, комбінації», при тому їхні частки зменшилися порівняно з початком періоду дослідження.

Третіми за рейтингом у грн (10,5 %) і п'ятими в упаковках (2,6 %) були препарати з А05А А02 «Кислота урсодеоксихолева», четвертими в упаковках (5,4 %) і п'ятими в грн (3,2 %) – ЛЗ з А05В А01 «Аргінін глутамат». При цьому питома вага обсягів продажів групи А05А А02 помітно зросла.

Варто відмітити зростання частки ЛЗ А05А Х10 «Препарати екстракту артишоку» (до 2,6 % в упаковках і 0,9 % в грн). Передостаннє в грн (1,0 %) та останнє в упаковках (0,1 %) рейтингові місця були характерні для гепатопротекторів А05В А06 «Орнітин оксоглурат».

Вивчення динаміки вартісних показників топ-10 торгових назв гепатопротекторів показало, що для досліджуваних ЛЗ, окрім галстени, спостерігається зростання обсягу продажів з 2006 до 2008 рр. (рис. 1). П'ять ЛЗ (ессенціале, тіотриазолін, гепабене, галстена та ліволін) у 2009 р. характеризувалися зниженням обсягу реалізації, що характерно було для національного ринку ЛЗ, який показав того року в грошово-

му виразі негативний приріст (–9 %) [3]. Опісля в усіх гепатопротекторів, окрім гепабене і ліволіну, відмічалось збільшення збуту. Варто зазначити, що карсил, цитрагін і антраль характеризувалися щорічним зростом вартісного обсягу реалізації.

Серед топ-10 торгових назв гепатопротекторів за обсягом збуту у вартісному вимірі було 4 вітчизняних ЛЗ – тіотриазолін (АТ «Галичфарм», ВАТ «Київмедпрепарат», ЗАТ «Лекхім-Харків», ДЗ «ДНЦЛЗ»), глутаргін (ФК «Здоров'я»), антраль (ВАТ «Фармак»), урсохол (ФФ «Дарниця»), а також один препарат (ессенціале), який, окрім іноземної компанії, виробляє також АТ «Галичфарм» за заявкою ТОВ «Санофі-Авентіс Україна», що є частиною транснаціональної групи Санофі.

Дослідження динаміки натуральних показників топ-10 торгових назв гепатопротекторів виявило, що для більшості ЛЗ характерне зниження продажів у 2009 р. з наступним зростанням реалізації в 2010 р. При цьому дарсил характеризувався щорічним збільшенням обсягу реалізації, а галстена мала подібною тенденцією, глутаргін і Лів-52 – щорічним зниженням обсягу збуту до 2009 р., а силібор – до 2010 р. Варто зазначити, що в 2009 р. національний ринок ЛЗ у натуральному виразі зменшився на 5 % [3].

Серед топ-10 торгових назв гепатопротекторів за обсягом збуту в натуральному вимірнику було 5 вітчизняних ЛЗ – тіотриазолін, глутаргін, дар-

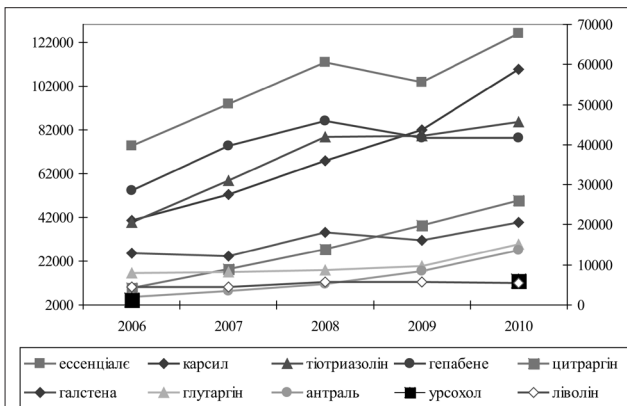


Рис. 1. Динаміка обсягу продажів (у грн) топ-10 торгових назв гепатопротекторів за 2006–2010 рр.

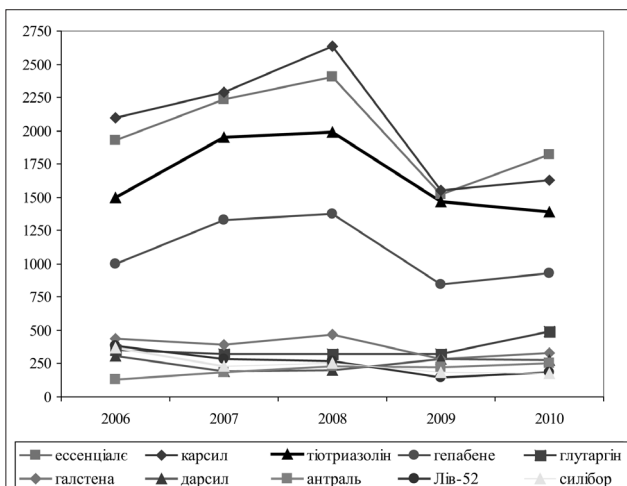


Рис. 2. Динаміка обсягу продажів (в уп.) топ-10 торгових назв гепатопротекторів за 2006–2010 рр.

сил (ФФ «Дарниця), антраль, силібор (ФК «Здоров'я»), а також один препарат (ессенціале), який, окрім іноземної компанії, виробляє також вітчизняне підприємство за заявкою транснаціональної групи.

За даними рисунку 2 варто зауважити, що обсяг продажів гепатопротекто-

рів в упаковках у 2010 р. не повернувся на рівень 2008 р., тобто позитивна динаміка збуту гепатопротекторів у вартісному виразі (за виключенням 2009 р.) (рис. 1) здебільшого зумовлена зростанням середньозваженої ціни однієї упаковки досліджуваних ЛЗ. Для підтвердження цього висновку на заключному етапі роботи проведено вивчення змін середньозваженої ціни однієї упаковки топ-10 торгових назв гепатопротекторів, перелік яких визначали як середнє сум рангів кожного ЛЗ за обсягами продажів у вартісному і натуральному показниках.

Як видно з даних таблиці 3, ланцюгові (Тп(л)) і базисні (Т(б)) темпи приросту середньозваженої ціни упаковки більшості гепатопротекторів випереджають темпи приросту офіційного курсу гривні щодо євро та долара США. Лише темпи приросту ціни гепабене та ессенціале були близькими до значення

Таблиця 3

Динаміка середньозваженої ціни упаковки топ-10 торгових назв гепатопротекторів за середнім рангом

Ранг	Назва ЛЗ	Щорічна середньозважена ціна і ланцюговий темп приросту									Тп (б)
		2006	2007	Тп (л)	2008	Тп (л)	2009	Тп (л)	2010	Тп (л)	
1	Ессенціале	38,73	41,82	8,0	46,92	12,2	68,10	45,1	69,13	1,5	78,5
2	Карсил	10,06	12,03	19,6	13,64	13,4	28,13	106,2	36,06	28,2	258,4
3	Тіотриазолін	13,7	15,89	16,0	21,12	32,9	28,73	36,0	32,84	14,3	139,7
4	Гепабене	28,71	29,78	3,7	33,33	11,9	49,16	47,5	44,67	-9,1	55,6
6	Галстена	29,41	30,52	3,8	38,14	25,0	55,78	46,3	62,42	11,9	112,2
6	Глутаргін	22,61	24,97	10,4	27,29	9,3	30,05	10,0	45,94	52,9	103,2
8	Антраль	16,40	18,67	13,8	23,09	23,7	38,40	66,3	53,49	39,3	126,2
8,5	Цитраргін	91,61	95,10	3,8	109,65	15,3	187,11	70,6	199,22	6,5	117,5
9,5	Дарсил	5,81	6,15	5,9	7,83	27,3	10,17	29,9	16,48	62,0	183,6
10	Лів-52	7,17	9,11	27,1	13,06	43,4	31,53	141,4	28,65	-9,1	199,6
У середньому		–	–	11,2	–	21,4	–	59,9	–	19,8	–
Середньорічний офіційний курс гривні щодо [9]											
100 євро		633,69	691,79	9,2	770,80	11,4	1086,79	41,0	1053,29	-3,1	66,2
100 доларів США		505,00	505,00	0	526,72	4,3	779,12	47,9	793,56	1,9	57,1
Темп приросту середньозваженої ціни одного ЛЗ за даними фармацевтичного ринку [4,7]											
		–	–	25,9	–	32,7	–	44,3	–	7,8	–

Примітка. Тп – темп приросту.

темпу приросту офіційного курсу гривні насамперед щодо першої іноземної валюти. При цьому, варто зазначити, що середні значення відносних показників динаміки топ-10 торгових назв гепатопротекторів корелюють з аналогічними показниками середньозваженої ціни одного ЛЗ за даними фармацевтичного ринку. Ці явища можна пояснити:

- по-перше, інфляційною психологією, за якої в каналах розподілу ЛЗ завчасно закладають у ціну ЛЗ інфляційне очікуване збільшення витрат, зокрема, внаслідок зростання курсу іноземних валют;
- по-друге, надмірними заходами із запобігання втрат від фінансового ризику в каналах розподілу ЛЗ, зокрема, від його інфляційної, валютної та кредитної складових.

Висновки

1. Унаслідок матричної обробки даних обсягів реалізації гепатопротекторів у грошовому і натуральному виразах встановлено, що лідерами рейтингу в 2006 р. і 2010 р. були ЛЗ, що відносяться до групи А05В А50 «Різні препарати».

2. Вивчення динаміки вартісних показників топ-10 торгових назв гепатопротекторів показало, що для п'яти ЛЗ у 2009 р. спостерігалось зниження, а в 2010 р. – зростання обсягу реалізації, для трьох – тенденція щорічного зростання, а для двох – зниження. Дослідження динаміки натуральних показників топ-10 торгових назв гепатопротекторів виявило, що для більшості ЛЗ характерне зниження продажів у 2009 р. з наступним ростом реалізації в 2010 р.
3. Показано, що обсяг продажів гепатопротекторів в упаковках у 2010 р. не повернувся до максимального рівня в 2008 р., тобто позитивна щорічна динаміка збуту більшості гепатопротекторів у вартісному виразі (за виключенням 2009 р.) зумовлена зростанням середньозваженої ціни однієї упаковки досліджуваних ЛЗ.
4. Серед топ-10 торгових назв гепатопротекторів за обсягом збуту було 5 вітчизняних ЛЗ – тіотриазолін, глутаргін, дарсил, антраль і силібор, а також один препарат (ессенціал), який, окрім іноземної компанії, виробляє також вітчизняне підприємство за заявкою транснаціональної групи.

1. Вовк А. Д. Вірусні гепатити – актуальна проблема охорони здоров'я / А. Д. Вовк, І. В. Соляник, В. Г. Янченко // Нова медицина. – 2004. – № 6 (17). – С. 12–18.
2. Гепатотропные препараты. Рынок и цены [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.apteka.ua/article/14696>.
3. Живодерников Е. Фармацевтический рынок Украины. Итоги 2009 года / Е. Живодерников, Е. Зелинская // Провизор. – 2010. – № 9 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2010/N09/frukr09_0510.php?part_code=125&art_code=7689.
4. Навстречу новым рекордам! Аптечные продажи лекарственных средств в Украине по итогам I полугодия 2011 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.apteka.ua/article/89953>. 14
5. Немченко А. С. Дослідження вітчизняного ринку гепатопротекторних засобів. Повідомлення 1 / А. С. Немченко, А. Р. Грицик, І. О. Федяк // Ліки України. – 2008. – № 2. – С. 102–107.
6. Немченко А. С. Дослідження вітчизняного ринку гепатопротекторних засобів. Повідомлення 2 / А. С. Немченко, А. Р. Грицик, І. О. Федяк // Ліки України. – 2008. – № 4. – С. 89–94.
7. По воле рока так случилось!.. Аптечные продажи в Украине: декабрь, итоги 2008 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.apteka.ua/article/7884>.
8. Попович В. П. Дослідження асортименту гепатопротекторів на фармацевтичному ринку України / В. П. Попович // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 1 (20). – С. 75–81.
9. Середній курс гривні (до 1996 року українського карбованця) до іноземних валют [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.bank.gov.ua/kurs/last_kurs1.htm.
10. Слободянюк Н. Н. Рынок препаратов для лечения патологий гепатобилиарной системы в Украине [Электронный ресурс] / Н. Н. Слободянюк, Г. Б. Котляров // Провизор. – 2008. – № 3. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2008/N03/patal_308.php.
11. Яковлева Л. В. АВС-аналіз використання в аптеці засобів для лікування захворювань печінки / Л. В. Яковлева, О. В. Геруш, О. Б. Леницька [та ін.] // Фармація України. Погляд у майбутнє: матер. VII Нац. з'їзду фармацевтів України, у 2 т. – Х. : НФУ, 2010. – Т. 2. – С. 402.

В. П. Попович, Б. П. Громовик, П. В. Глуховский
**Рыночный сегмент гепатопротекторов в групповом
и индивидуальном измерениях**

Матричный анализ данных объемов реализации в денежном и натуральном выражениях выявил, что лидерами рейтинга в 2006–2010 гг. были гепатопротекторы из группы А05В А50 «Различные препараты».

Изучение динамики объемов реализации топ-10 торговых наименований гепатопротекторов показало, что объем сбыта гепатопротекторов в упаковках в 2010 г. не вернулся к максимальному уровню 2008 г., т. е., положительная ежегодная динамика продаж большинства гепатопротекторов в стоимостном выражении (за исключением 2009 г.) обусловлена ростом средневзвешенной цены одной упаковки исследуемых ЛС. Выявлено, что причинами опережающего роста средневзвешенной цены одной упаковки большинства гепатопротекторов относительно курса иностранных валют является инфляционная психология и чрезмерные меры по предотвращению потерь от финансового риска в каналах распределения ЛС.

Отмечено, что среди топ-10 торговых наименований гепатопротекторов по объему сбыта было 5 отечественных ЛС – тиотриазолин, глутаргин, дарсил, антраль и силибор, а также один препарат (эссенциале), который, кроме иностранной компании, производит также отечественное предприятие по заявке транснациональной группы.

Ключевые слова: гепатопротекторы, торговые названия, топ-10, объем продаж, средневзвешенная цена одной упаковки

V. P. Popovych, B. P. Hromovyk, P. V. Glukhovskiy
Market segment of hepatoprotectors in group and individual dimensions

Revealed that the leaders in terms of sales in cash and in kind in 2006–2010 were hepatoprotectors from the group A05V A50 «Various drugs.»

Shown that the growth of volume of sales of most hepatoprotectors was due to increased average price of a package that is outpacing the growth rate of foreign currencies. The reasons for this is inflationary psychology and excessive measures to prevent the loss of financial risk in the drug distribution channels.

It is noted that among the top 10 trade names were 5 domestic hepatoprotectors – Thiotriazolin, Glutargin, Darsyl, Antral and Silibor, as well as a drug (Essentiale), which, except for a foreign company, also produces a domestic company at the request of transnational group.

Key words: hepatoprotectors, trade names, top 10, sales, average price per pack

Надійшла: 09.12.2011 р.

Контактна особа: Попович В. П., канд. фарм. наук, доцент, кафедра аптечної та промислової технології ліків, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, вул. Пушкінська, 22, м. Київ, 01601. Тел.: (44) 235-90-66. E-mail: aptl@bigmir.net, valeriy.p@meta.ua

Ф. П. Трінус

До історії винаходу хірургічного наркозу

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

*Ключові слова: наркоз, закис азоту,
діетиловий ефір*

Методи знеболювання почали розроблятися давно, майже одночасно з хірургією за багато років до нашої ери в Ассирії, Єгипті, Греції, Китаї, Індії та інших країнах. Не дивлячись на те, що біль є «сторожовою собакою» здоров'я, уже в ті далекі роки лікарів та пацієнтів застосовувати знеболювання спонукало страждання від болю. Це були травми, викликані війнами та полюванням, а також захворювання. Великий реформатор античної медицини Гіппократ не тільки дуже цінив надбання попередників щодо знеболення, але й відносив знеболювання до виду мистецтва та геніально передбачив його подальший розвиток, пов'язаний з дослідженнями в галузі хімії.

У XIII сторіччі іспанський богослов, філософ, місіонер та алхімік Раймунд Луллій відкрив діетиловий ефір [5]. У 1540 році Парацельс описав його знеболюючі властивості [4]. У 1776 році хіміком Пристлі було вперше отримано закис азоту — «селітряне повітря». Він винайшов, що окис азоту при зіткненні з повітрям буріє внаслідок утворення двоокису азоту [1]. Незабаром, у 1799 році, сер Хемфрі Деві винайшов знеболювальні властивості закису азоту [2]. Нажаль, закис азоту не знайшов місця в операційній на той час. Пізніше Горацій Уеллс дізнався про знеболюючі властивості оксиду азоту. Він почав проводити експерименти щодо можливості використання закису азоту для анестезії. Уеллс зміг ефективно використати його в лікарській практиці в Хартфорді, Коннектикут. Нажаль, прилюдна демонстрація застосування анестезії, яку Уеллс зробив у Бостоні, закінчилася невда-

ло, і він закінчив життя самогубством [3]. Але лаври відкриття наркозу відійшли співробітнику Уеллса Уільяму Томасу Гріну Мортону. У період з 1842 по 1843 рік Мортон працював у партнерстві з Уеллсом та хірургом Чарльзом Джексоном. Однак їхнє партнерство виявилось неприбутковим і наприкінці 1843 року закінчилось. У 1846 році американський лікар та хімік Чарльз Джексон став використовувати ефір з метою наркозу. Саме за порадою Джексона Мортон випробував застосування парів ефіру при операціях з видалення зубів. 16 жовтня 1846 року в клініці Бостона Мортон провів перший у світі наркоз. Як анестетик був використаний діетиловий ефір. Першою операцією, проведеною під наркозом, було виділення підчелюсної пухлини. Після вдалої операції хірург Уорен, що проводив операцію, радісно сказав: «Джентльмени це не омана!» Ображений Джексон вирішив повернути свою першість. Судова тяганина тривала близько 20 років та закінчилася після смерті Джексона [7].

Незабаром Джеймс Янг Симпсон, шотландський акушер, гінеколог, хірург, що працював у Единбурзі, використав наркоз за допомогою ефіру (у січні 1847 р.), а потім за допомогою хлороформу (листопад 1847 р.) при різних операціях [6].

З того часу почалося широке застосування наркозу в світі: Федір Іноземцев – Росія (1847 р.), Оффенбах – Німеччина (1847 р.), Ластон – Англія (1847 р.). Таким чином, було підтверджено геніальне передбачення Гіппократа про роль хімії в знеболюванні. Чарльз Джексон, Мортон і Уорен відкрили для людства хірургічний наркоз.

-
1. Биография Джозефа Пристли (1733 – 1804).– Электронный ресурс. Режим доступа: [<http://www.critical.ru/calendar/Priestley.htm>]
 2. Гемфри Дэви. – Электронный ресурс. Режим доступа: [<http://www.critical.ru/calendar/1712Davy.htm>]
 3. Гораций Хорас Уэллс. – Электронный ресурс. Режим доступа: [<http://www.hipersona.ru/scientists/sci-medic/2151-horace-wells>]
 4. Диэтиловый эфир. – Электронный ресурс. Режим доступа: [http://www.multilingualarchive.com/ma/enwiki/ru/Diethyl_ether]
 5. Общий наркоз. – Электронный ресурс. Режим доступа: <http://mapyourinfo.com/wiki/ru.wikipedia.org>
 6. Симпсон, Джеймс Янг. Википедия. – Электронный ресурс. Режим доступа : <http://ru.wikipedia.org>
 7. Уильям Томас Грин Мортон. – Электронный ресурс. Режим доступа : [<http://www.hipersona.ru/scientists/sci-medic/2152-william-morton>]

Ф. П. Тринус

К истории открытия хирургического наркоза

В статье рассказано об основных вехах открытия наркоза.

Ключевые слова: наркоз, закись азота, диэтиловый эфир

F. P. Trinus

To the history of the invention of surgical anaesthesia

In the article is told about the basic landmarks of invention of anaesthesia.

Key words: anaesthesia, nitrous oxide, diethylated ether

Надійшла: 15.02.2012 р.

Контактна особа: Тринус Федір Петрович, чл.-кор. НАН та НАМН України, професор, гол. наук. співроб., відділ фармакології протизапальних та анагезуючих засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потье, 14, м. Київ, 03680. Тел.: (44) 456-78-64.

CONTENT

REVIEWS

<i>Chekman I. S., Polova Z. N., Grebelnik A. I.</i> Nanoparticles in dosage forms: pharmacological aspect and pharmaceutical technology	3
---	---

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

<i>Zhylyayev S. O., Shtrygol S. Y.</i> The influence of quercetin contained preparations on the narcotic sleep induced by alcohol	11
<i>Pavlov S.</i> Thiol antioxidants influence on the stress-protein HSP70 in hippocampus of the <i>meriones unguiculatus</i> with acute cerebral ischemia	15
<i>Stepanyuk G. I., Marynich L. I., Khodakivskiy O. A., Kovalenko S. I., Berest G. G.</i> The impact of derivative of 6-substituted 3R-2H [1,2,4] triazin (2,3-c) chinazolin 2-ons (compound MT-279) on the state of acid-alkaline balance and level Ca^{2+} in blood of herbels with model of acute ischemic brain.....	19
<i>Chekman I. S., Yakovleva I. Yu., Belenichev I. F., Buchtijarova N. V., Gorchakova N. A.</i> Taurine and piracetam influences on the biochemical parameters in brain of rats with circulatory hypoxia	24
<i>Iarosh O. A.</i> Pharmacokinetic features of a new antiepileptic compound AGB-31 in rat brain hemispheres	29

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

<i>Gorbenko N. I., Zvyagina T. S., Shalamay A. S.</i> The impact of taurine-containing drug «Кратал» on diabetic nephropathy development in rats.....	34
<i>Novokhatska T., Tishkin S. M., Dosenko V. E., Ivanova I. V., Dobrelia N. V., Soloviev A. I.</i> Protein kinase C delta isoform gene silencing reduces vascular disorders in spontaneously hypertensive rats	40
<i>Oshytko R., Grytsyk A.</i> Estimation of fatty acids compositions of fatty oils from single-seeded hawthorn (<i>Crataegus monogyna</i>) and midland hawthorn (<i>Crataegus laevigata</i>) and prospects of its medical use	48
<i>Tsurkan O., Kovalchuk T., Gergel O.</i> GC-MS determination of volatile components from the aerial parts of mulberry	54
<i>Iadlovskiy O. E.</i> The role of vaniloid receptor TRPV1 in antynociceptive action of diclofenac.....	60

FROM EXPERIENCE OF MEDICAL PRACTICE

<i>Kashuba O. V.</i> Adverse reactions caused by diclofenac and nimesulide as nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Ukraine: comparative statistical study and prognosis.....	65
---	----

PHARMACEUTICAL MARKET OF UKRAINE

<i>Popovych V. P., Hromovyk B. P., Glukhovskiy P. V.</i> Market segment of hepatoprotectors in group and individual dimensions.....	72
---	----

HISTORY

<i>Trinus F. P.</i> To the history of the invention of surgical anaesthesia	78
---	----