
СПІВЗАСНОВНИКИ

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

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 1(47)/2016

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Лук'янчук В. Д., Сейфулліна І. Й., Літвиненко Д. Ф., Марцинко О. Е.
Фармакологічні властивості органічних і координаційних сполук германію –
сучасні уявлення 3
- Чекман І. С. Науково-методичні основи викладання нанофармакології..... 14

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

- Горбачева С. В., Беленичев І. Ф., Кучеренко Л. І. Механізми ендогенної
нейропротекції при використанні модуляторів тиол-дисульфідної системи
в умовах експериментального порушення мозкового кровообігу..... 24
- Носач С. Г., Беленичев І. Ф., Александрова Е. В., Левич С. В., Рыженко В. П.
Антиоксидантний механізм нейропротективного дії проведеного
3-метилксантину (сполучення С-3) в умовах внутримозгового кровоизливу..... 31
- Холодник С. В., Бухтіярова Н. В., Шабельник К. П., Берест Г. Г.,
Беленичев І. Ф., Коваленко С. І. Спрямований пошук протисудомних агентів
серед спіропідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим
фрагментом 39

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

- Білай І. М., Михайлюк Є. О., Цис О. В., Шабельник К. П., Коваленко С. І.,
Остапенко А. О. Анальгетична активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі
первинного фармакологічного скринінгу 48
- Головенко М. Я., Валіводзь І. П., Ларіонов В. Б. Участь фенобарбітал-індукованих
ізоформ CYP450 у О-дезалкоксилюванні ¹⁴С-етоксазепаму..... 53
- Dronova M. L. The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl)
phenoxy]-3-(n-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride under *in vivo* models 60
- Добряля Н. В., Карацуба Т. А., Гула Н. С., Дуняк Ю. О., Бойцова Л. В.,
Данова І. В., Тишкін С. М., Хромов О. С. Корекція порушень гемостазу 66
-

Иванов Л. В., Ляпунов А. Н., Картель Н. Т., Нардид О. А., Черкашина Я. О., Деримедведь Л. В. Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов	72
Калько К. О., Дроговоз С. М., Захарко Н. В., Юдкевич Т. К. Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу.....	81
Мєшкова Н. О., Міщенко О. В., Олійник В. Л., Олійник Г. М., Шарикіна Н. І. Дослідження цитостатичної дії похідних хіназоліну	87
Мохорт М. А., Кутовий Ю. М. Дослідження захисних ефектів фармакологічного прекондиціювання похідними імідазо[1,2-а]азепінію на функціонування серця щурів <i>in vivo</i> за умов регіональної ішемії	91
Попов О. С., Шебеко С. К., Зупанець І. А., Шаламай А. С. Дослідження впливу препарату «Диклокор» на спонтанну больову реакцію в експерименті	97

ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ

Делян Є. П. Амінокислотний склад надземних органів рослин роду <i>Sonchus</i>	102
--	-----

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

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

В. Д. Лук'янчук¹, І. Й. Сейфулліна²,
Д. Ф. Літвиненко¹, О. Е. Марцинко²

Фармакологічні властивості органічних і координаційних сполук германію – сучасні уявлення

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії
медичних наук України», м. Київ

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Ключові слова: германійорганічні сполуки,
координаційні сполуки германію,
фармакодинаміка, фармакокінетика,
застосування

Останніми роками дослідження германійорганічних (ГОС) та координаційних сполук германію (КСГ), що мають широкий спектр біологічної активності, є одним з перспективних напрямів у сучасній фармакології [1, 2].

Бурхливий розвиток германійорганічної хімії в другій половині минулого сторіччя сприяв значному розширенню теоретичних уявлень щодо застосування органічних сполук германію для створення нових лікарських засобів [3]. У 1950-ті роки доктор К. Асаї (Японія) уперше встановив, що органічні сполуки германію, які містять зв'язок германій-карбон, забезпечують перенесення кисню в тканинах організму, підвищують імунітет, виявляють протиухлинну активність та безліч інших біологічних ефектів [3, 4].

За теорією К. Асаї в крові людини ГОС чинять дію, аналогічну дії гемоглобіну, попереджаючи розвиток гіпоксії [5].

Механізм біологічної дії сполук германію пов'язаний з особливостями електронної будови його атомів, що містять 32 електрона, з яких 4 знаходяться на зовнішньому електронному рівні. Коли до такого атома наближається позитивно заряджений іон (або полярна молекула), один з зовнішніх електронів легко відривається, у результаті чого утворюється позитивно заряджений іон. У такому випадку

будь-який вільний електрон, що поблизу, буде прагнути заповнити цю втрату, а германій – відновити свою звичайну електронну будову. Припускають, що подібне відбувається й у живому організмі, де атом германію може взаємодіяти з зарядженими іонами, знижуючи їхній електричний потенціал. Враховуючи, що потенціал мембран злоякісних клітин вище, ніж здорових, не виключено, що германій позбавляє ракові клітини «зайвих» електронів і, таким чином, знижує їхній електричний заряд, що врешті позбавляє пухлинні клітини здатності до проліферації. Ймовірно, і знеболювальна дія органічних сполук германію також пов'язана з його здатністю «перехоплювати» вільні електрони. Оскільки больові імпульси передаються з периферії в мозок нервовими клітинами за участю нейромедіаторів та своєрідного електронного ланцюга, є підстави думати, що сполуки германію гальмують або зовсім припиняють рух електронів подібно іншим відомим анестезуючим засобам. Механізм радіозахисної дії германію (наприклад, при гамма-радіаційному опроміненні злоякісних новоутворень) також пояснюють його унікальною здатністю виконувати роль своєрідної пастки електронів та інших негативно заряджених частинок [6, 7].

Першу германійорганічну сполуку було синтезовано ще у 1887 році. Однак найінтенсивніше вивчення германію почалося лише в середині XX століття, коли К. Асаї у 1968 році встановив, що 2-карбоксіетилгермсесквіоксан (відомий, як Ge-132) має широкий спектр біологічної активності, у тому числі

протираковинної [8–10]. Ge-132 широко застосовується в медичній практиці, особливо в хіміотерапії раку [11]. Ge-132 має також анальгетичну [12], протизапальну, антиоксидантну [13], імуномодулюючу [14] і противірусну дію [15], має гіпотензивні [16] і нейротропні властивості, є гепатопротектором і радіопротектором і при цьому відрізняється низькою токсичністю [2, 17]. Крім того, цю сполуку запропоновано для лікування низки серцево-судинних захворювань [18], гепатиту [19]. А також Ge-132 має гіполіпідемічну дію [20]. В експерименті показані остеопротекторні властивості Ge-132 [21] та ефективність у лікуванні катаракти [22].

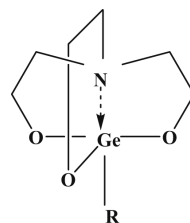
Синтезовано й вивчено велику кількість похідних біс(2-гідроксietил германій) сесквіоксиду. Так, зокрема, синтезовано низку його складних ефірів хінолінового ряду й показано [23], що введення хінолінових замісників підвищує їхню протираковинну активність. При цьому найбільшу ефективність має β -(8-хіноліновий ефір) 2-карбоксietилгерманій сесквіоксид (інгібування росту клітин аденоми простати РС-3М до 78 %).

З інших сесквіоксидів високу протираковинну активність показав γ -тіокарбамідоприлгерманій сесквіоксид [24], для якого в тестах (у концентрації 50 мкг/л) на клітинах КВ (клітини епідермоїдного раку людини), НСТ (клітини раку товстої кишки людини) і Bel (клітини гепатоцелюлярної карциноми) інгібування склало 92,9, 84,9 і 70,9 % відповідно.

Авторами [25] виявлені радіозахисні ефекти герматіазолідинів, а при вивченні радіопротекторних ефектів комплексу GeO_2 з D-фруктозою показано, що водний розчин цієї сполуки має радіозахисну дію при введенні мишам, опроміненим рентгенівськими променями. З метою створення на основі ГОС лікарських засобів з радіопротекторними властивостями спеціально синтезовано низку герматіацеталів похідних заміщених нафтилетилімідазолідинів ($\text{R} = \text{H}, \text{Me}; \text{R}_1 = \text{R}_2 = n\text{-C}_6\text{H}_{13}, \text{ізо-C}_5\text{H}_{11}$) [26]. Радіопротекторним ефектом характеризуються похідні 2,2'-оксидіетантіолів ($\text{X} = \text{O}$), 2,2'-тіодіетантіолів ($\text{X} = \text{S}$). У 2,2'-оксидіетантіолів також

виявлено протираковинну активність на 7 видах ракових клітин і показано, що хоча ці сполуки мають виражену цитостатичну активність, але, разом з тим, вона помітно нижча, ніж у відомих *цис*-платину й етопозиду [27].

Велику групу біологічно активних сполук представляють трициклічні германійорганічні похідні тріетаноламіну 1-герма-2,8,9-тріоксо-5-азатрицикло[3.3.3.0^{1,5}]ундекану (герматрани) [28]. Суттєвою відмінністю даних сполук від розглянутих вище є наявність координаційного зв'язку $\text{Ge} \leftarrow \text{N}$, що дозволяє віднести їх також до внутрішньоконфлексних ГОС:



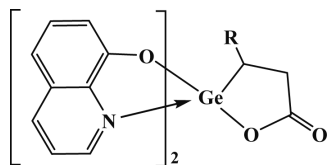
Серед нових герматранів отримані бензил- і бромбензилзаміщені ($\text{R} = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$) герматрани, які показали низьку токсичність ($\text{LD}_{50} > 1000$ мг/кг) і широкий спектр нейропротекторної активності, зокрема, бромбензилзаміщені герматрани покращують процеси пам'яті [29].

Синтезовано також похідні герматрану з коричною кислотою [30] ($\text{R} = \text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$) і кавовою кислотою [31] ($\text{R} = \text{CH}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2)\text{CH}_2\text{COOH}$), з низькою токсичністю та вираженою протираковинною активністю, причому похідні кавової кислоти виявилися більш активними. Синтезований амід триметилгермілпропіонової кислоти – аміно-аналог аскорбінової кислоти з антиоксидантними властивостями – запропонований для лікування atopічного дерматиту [32].

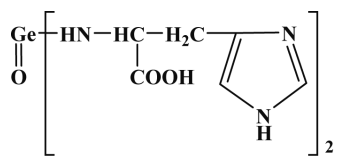
Інша ГОС з триметилгермільною групою – 6-O-[3-(триметилгерміл)- β -D-глюпіранозид – завдяки своїй високій розчинності у воді є менш токсичною сполукою, але більш активно стимулює вироблення ендогенного інтерферону порівняно з Ge-132 [33]. Синтезовано також тріалкілгермілзаміщені трифторацетилфурани ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}$) і вивчено

їхні анестезуючі властивості та цитотоксичність [34].

Серед інших класів ГОС синтезовано герма- γ -лактони (R = Me, Ar):



і досліджено їхній вплив на життєдіяльність 7 видів патогенних бактерій та здатність інгібувати активність уреаз. Особливо ефективними ці сполуки виявилися проти *Proteus mirabilis* та *Saccharomyces cerevisiae* [35]. Як потенційні імуномодулятори досліджені германати амінокислот з інтерфероніндукуючою дією, наприклад, біс-гістидин германат:



Крім гістидину було використано також метіонін і глутатіон [36].

Експериментально доведено наявність виразної антиоксидантної дії в пропагерманію [37, 38]. Саме ця його властивість нашоухнула фармакологів на ідею створення нового антиоксидантного засобу на основі пропагерманію. На відміну від інших відомих антиоксидантів, які широко використовуються в косметичці, зокрема, вітамін Е, полімер пропагерманій не проникає крізь шкіру, а залишається на її поверхні, формуючи «антиоксидантну» плівку і забезпечуючи, таким чином, захист від «зовнішніх» вільно-радикальних агентів (наприклад, активних форм кисню). Крім того, порівняно з іншими «косметичними» антиоксидантами (вітамін Е, коензим Q10), пропагерманій відрізняється високою стабільністю *in vitro* [39].

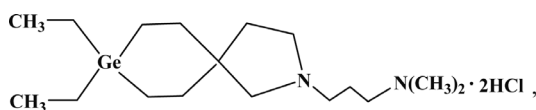
Важливо наголосити, що пропагерманій має також гепатопротекторні та імуномодуючі властивості [40, 41], і його застосовують у лікуванні хронічного вірусного гепатиту В [42]. У ряді

досліджень показано антиатеросклеротичну [43, 44] та протизапальну [45] активності пропагерманію. Описано ефективність лікування пропагерманієм мієломної хвороби [46].

Дослідження протипухлинної активності шести герматранів (трициклічних германійорганічних похідних тріетаноламіну) загальної формули $R\text{-Ge}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$, що проведені на п'яти тест-системах, показали їхню високу хіміотерапевтичну ефективність. Так, 1-гідроксигерматран збільшував тривалість життя щурів з асцитною пухлиною Ерліха на 78 % порівняно з контролем. Приблизно таку саму за інтенсивністю протираксову активність (75 %) на експериментальній моделі саркоми 37 виявляв 1-триметилсилоксигерматран, дещо меншу – 1-триметилгермоксид і 1-гідроксигерматран. Подальші дослідження показали перспективність цих сполук як потенційних протипухлинних препаратів [47, 48].

Фармакологічні дослідження протипухлинної активності ГОС дозволили дійти висновку, що одним з механізмів їхньої антибластомної дії є здатність індукувати в організмі утворення ендogenous інтерферону, а також безпосередньо або опосередковано стимулювати продукцію фактора некрозу пухлин [49]. Препарати германію, які практично позбавлені токсичності, при пероральному введенні мишам є потужними індукторами ендogenous синтезу інтерферону, що стимулює активність природних кілерних клітин [50]. Германійвмісні сполуки є стимуляторами продукції ІЛ-4, що підвищує природну кілерну активність і є чинником диференціювання прекурсорів Th2, які продукують широкий спектр цитокінів (ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-9, ІЛ-13), у свою чергу, стимулюючи природну кілерну активність [51]. Наразі відомо, що дія γ -інтерферону та ІЛ-4 на пухлинну лінію фібробластів сприяє інгібуванню індукованої фактором некрозу пухлини α продукції металопротеїнази-3 (стромелізину) і колагеназ, що порушують цілісність екстрацелюлярного матриксу, а інтерферони α , β , γ беруть участь в упорядкуванні архітекtonіки екстрацелюлярного матриксу [52].

Таким чином, ГОС не тільки сприяють підвищенню активності природних кілерних клітин, але й гальмують метастазування пухлинних клітин. Одна з такого роду сполук – спірогерманій:



Він використовується для лікування раку легенів і сечового міхура та як хіміотерапевтичний засіб при розвитку резистентності пухлин до препаратів *цис*-платину, вінкристину, метотрекса-ту або адріаміцину [3].

Натепер досить детально досліджено вплив ГОС на морфогенез тканин. Так, отримано цікаві дані щодо позитивного впливу карбоксіетилгермсесквіоксану $(O_{1,5}GeCH_2CH_2COOH)_n$ на мінералізацію кісток та високу терапевтичну ефективність даної сполуки на експериментальній моделі остеопорозу в щурів [5].

При вивченні впливу 1-ізопроксигерматрану на проліферативно-репаративну функцію сполучної тканини встановлено стимулюючий ефект цієї сполуки, що проявляється в значному збільшенні вмісту в клітинах нуклеїнових кислот, колагену (оксипроліну), глікопротеїдів (зокрема, глікозаміногліканів) на тлі високої біосинтетичної активності [53]. В окремих роботах [54] показана здатність карбоксіетилгермсесквіоксану уповільнювати розвиток амілоїдозу в мишей, а також чинити антиоксидантну дію, яка реалізується шляхом підвищення активності глутатіонпероксидази, СОД і каталази [38], що, ймовірно, зумовлено антиокиснювальними властивостями германію. При вивченні протизапальної активності ГОС виявлено синергізм дії карбоксіетилгермсесквіоксану з глюкокортикоїдами [39].

Встановлено також противірусні властивості ГОС відносно вірусів грипу [55] та простого герпесу HSV-1 [51].

Опубліковано цікаві дані про вплив 1-адамантилгерматрану на перебіг гіпоксії. Ця сполука в дозі 50 мг/кг збільшує тривалість життя тварин в умовах гострого дефіциту кисню (на

73,8 %), а в дозах 100–200 мг/кг антигіпоксичні властивості реалізуються і на моделі гіпобаричної гіпоксії – збільшується тривалість життя дослідних тварин порівняно з контролем у 4–9 разів [56].

Гепатопротекторні властивості ГОС реалізуються завдяки здатності пригнічувати пероксидацію ліпідів з одночасною активацією системи антирадикального захисту організму, нормалізувати співвідношення холестерин/фосфоліпиди на експериментальній моделі гепатиту [57]. У літературі [58–60] описані протиаритмічні, протисудомні, седативні, міорелаксуючі, ноотропні, адаптогенні й антигіпоксичні властивості ГОС.

На думку багатьох учених, германій є життєво необхідним (есенціальним) мікроелементом. Норма його споживання в органічній формі – не менше ніж 0,5 мг на 1 добу, між тим, з харчовими продуктами людина отримує в сотні разів менше. Дефіцит германію в організмі призводить до стану гіпоксії, внаслідок чого порушується робота всіх органів і систем. Основні прояви дефіциту германію – це синдром хронічної втоми, зниження фізичної та розумової працездатності, гіповітаміноз, хронічна й часта захворюваність, підвищений ризик розвитку ішемічної хвороби серця, інсультів, остеопорозу, вірусних захворювань і проліферативних процесів [3].

Відомо, що введення в організм біометалів у вигляді координаційних сполук (екзогенних комплексів), тобто у формі, найнаближенішій до тієї, у якій метали знаходяться в біологічних системах, може призводити до реалізації цими сполуками функцій, властивих біокоординаційним комплексам природного походження (ендогенним комплексам). Тому такі екзогенні комплекси металів, до складу яких входять біоліганди різної структури, завжди менш токсичні, ніж їхні неорганічні й органічні аналоги без біосубстратів.

Встановлено, що застосування координаційних сполук біометалів дозволяє досить ефективно регулювати їхню концентрацію в органах у необхідній організму формі, транспортувати лікарський засіб до місця локалізації патологічного процесу, усувати токсичну

дію катіонів металів та інших речовин. У зв'язку з цим виникла ідея використовувати при створенні лікарських препаратів, що містять германій, замість органічних його координаційні сполуки з біологічно активними органічними лігандами – метаболітами організму різної природи [61].

Сьогодні спільними зусиллями фармакологів України досліджено фармакодинаміку та фармакокінетику низки координаційних сполук германію з різними біолігандами, які були синтезовані на кафедрі загальної хімії та полімерів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова під керівництвом професора І. Й. Сейфулліної, на різних моделях кисеньдефіцитних станів, зокрема таких, як гіпоксія замкнутого простору, гіпоксія на тлі перегріву, синдром тривалого розчавлювання, гостра церебральна ішемія, гостра інтоксикація, закрита черепно-мозкова травма та ін. [62–65].

Останніми роками увага дослідників зосереджена на вивченні фармакологічних характеристик гомо- та гетерометалічних комплексів германію: 1 – $[\text{GeCl}_2(\text{Nic})_4]\text{Cl}_2$ (Nic – нікотинова кислота), 2 – $[\text{GeCl}_2(\text{Nad})_4]\text{Cl}_2$ (Nad – нікотинамід), 3 – $(\text{PamH})_6[\text{Ge}(\mu\text{-OH})(\mu\text{-Oedph})]_6$, 4 – $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]_2[\text{Ge}(\mu\text{-OH})(\mu\text{-Oedph})]_6$ (H_4Oedph -оксіетилідендифосфонова кислота, Pam – пірацетам), 5 – $\text{Na}_2[\text{Ge}(\text{OH})(\text{Dtpa})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 – $\text{K}_2[\text{Ge}(\text{OH})(\text{Dtpa})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (H_5Dtpa – діетилентріамінпентаоцтова кислота) [2, 66] (рисунк). Фармакотерапевтичну ефективність такого типу КСГ з біолігандами різної будови доведено на різних моделях невідкладних станів, основою патогенезу яких є гіпоксичний синдром [62, 67].

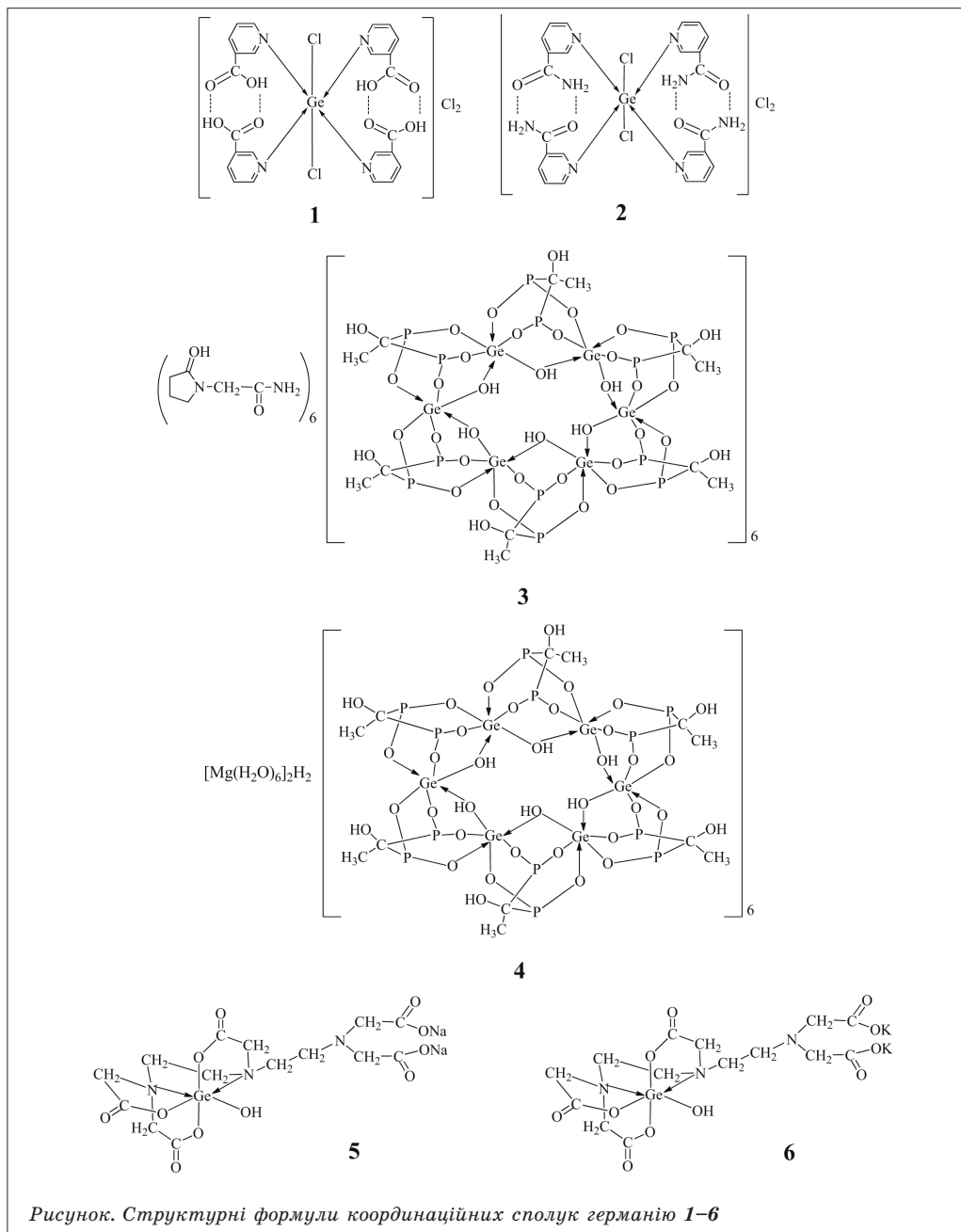
Вважаємо за доцільне особливо підкреслити, що згідно з результатами токсикометричних досліджень, проведених на доклінічному етапі, практично всі розглянуті гомо- та гетерометалічні КСГ при внутрішньоочеревинному введенні за параметрами токсичності (LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} , LD_{99}) і небезпеки ($\text{tg}\alpha$, $1/\text{LD}_{50}$, $\text{LD}_{84}/\text{LD}_{16}$, $1/\text{LD}_{50} \text{ tg}\alpha$, $[(\text{LD}_{84}/\text{LD}_{50}) + (\text{LD}_{50}/\text{LD}_{16})] / 2$, $1 / (\text{LD}_{50}\cdot\text{S})$) є малотоксичними і практично безпечними сполуками для теплокровних.

Отримані дані в експерименті та їхня екстраполяція на людину дозволяють характеризувати всі досліджені в токсикологічному експерименті КСГ як безпечні в плані виникнення й розвитку гострих смертельних отруєнь за умов парентерального надходження в організм людини [67–69].

Центральною ланкою фармакодинаміки КСГ є їхня здатність ефективно коригувати такі параметри енергетичного метаболізму, як енергетичний заряд, енергетичний потенціал, індекс фосфорилування, термодинамічний контроль дихання за рахунок усунення дисбалансу в системі АДФ-АТФ-АМФ у клітинах, а також чинити протекторну дію відносно активності ферменту, що завершує внутрішній окисно-відновний цикл гліколізу – лактатдегідрогенази за умов гострих кисеньдефіцитних станів будь-якого генезу [65, 70, 71]. У той самий час майже всі координаційні сполуки германію мають здатність коригувати порушення вуглеводного обміну при кисневій недостатності (ішемії) шляхом попередження зниження концентрації глюкози, глікогену та пірувату на тлі зменшення рівня лактату й рівня окисно-відновного потенціалу [67].

Загальновідомим фактом є те, що при дослідженні будь-якого нового лікарського засобу фармакотерапії головним є визначення його механізму дії. У цьому сенсі слід вважати вивчення механізму протигіпоксичної (протиішемічної) дії КСГ з біолігандами вкрай актуальним. Відомо й те, що вичерпні дані щодо механізму дії нового лікарського засобу мають бути отримані на субклітинному, а краще, на молекулярному рівні.

Враховуючи це, великий інтерес викликають результати ЕПР-досліджень. Так, за допомогою ЕПР-спектрометрії досліджено механізм протигіпоксичної (протиішемічної) дії КСГ за умов кисеньдефіцитної патології. Дані ЕПР-спектрометрії гепатоцитів щурів з формою екстремального стану, досліджуваного на тлі застосування потенційних протигіпоксичних засобів, дозволили встановити особливості фармакодинаміки КСГ: попередження зменшення рівня функціонально значущих



компонентів мітохондріального і мікросомального електрон-транспортних ланцюгів, що в кінцевому підсумку реалізується поліпшенням функції тканинного дихання і посиленням природних шляхів детоксикації [62, 63].

Отже, в основі механізму протигіпоксичної (протиішемічної) дії координаційних сполук германію з біолігандами за різних моделей, які адекватно відтворюють екстремальні кисеньдефіцитні стани, лежить здатність цих

потенційних протиішемічних, протигіпоксичних і детоксикаційних засобів ефективно коригувати структурно-функціональний стан мітохондріального і мікросомального електрон-транспортних ланцюгів [62, 63, 70]. Ці дані свідчать про те, що саме в цьому стратегічному напрямі слід здійснювати пошук нових антигіпоксантив – цілеспрямований синтез оригінальних координаційних сполук на основі германію та інших біометалів.

Особливу увагу варто приділити представленим у літературі [72–76] даним з фармакокінетики координаційних сполук германію в порівняльному аспекті в нормі та при досліджуваному екстремальному стані. Вивчення фармакокінетичного профілю КСГ, що мають високу фармакологічну активність, надалі дозволить встановити перспективні шляхи реалізації їхньої фармакотерапевтичної ефективності, зокрема, обрати раціональну схему дозування й прогнозувати спектр їхніх побічних реакцій і ускладнень. Отже, без наявності відомостей про різноманіття спектра поведінки лікарського засобу в організмі, його кінетики неможливе успішне проведення фармакотерапії багатьох патологічних станів будь-якого генезу.

Особливості проходження ГОС в організмі на різних етапах: всмоктування, біотранспорту, розподілу, біотрансформації та екскреції дозволили встановити певні закономірності кінетичних змін субституенту під впливом досліджуваного екстремального стану [72, 75]. Важливо відзначити, що всі ці зміни призводять до реалізації фарма-

котерапевтичних ефектів КСГ з різними біолігандами за умов певної досліджуваної кисеньдефіцитної патології.

Виходячи з усього вищевикладеного, можна дійти висновку, що сполуки германію різного типу характеризуються досить широким спектром фармакологічної активності та низькою токсичністю. Слід також відзначити результати дослідження фармакокінетичного профілю КСГ на різних моделях патологічних станів, які важливі для реалізації їхніх основних фармакодинамічних ефектів. Усе це є безперечною перевагою КСГ з різними біолігандами перед більшістю сучасних синтетичних лікарських препаратів.

Приведений аналіз результатів експериментальних досліджень та клінічних випробувань демонструє ефективність і перспективність подальшого клініко-фармакологічного вивчення сполук германію при різних патологічних станах та захворюваннях.

Автори висловлюють щире подяку кандидату фарм. наук О. В. Криловій за надання допомоги зі збору та систематизування літературних джерел.

1. Менчиков Л. Г. Биологическая активность органических соединений германия (обзор) / Л. Г. Менчиков, М. А. Игнатенко // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 11. – С. 3–6.
2. Кресюн В. Й. Перспективи створення нових лікарських препаратів на основі комплексних сполук германію / В. Й. Кресюн, І. Й. Сейфулліна, В. В. Годован // Одеський медичний журнал. – 2011. – № 1. – С. 31–35.
3. Биологическая активность соединений германия / [Э. Я. Лукевич, Т. К. Гар, Л. М. Игнатович, В. Ф. Миронов]. – Рига: Зинатне, 1990. – 191 с.
4. Хромова Н. Ю. Герматраны и их аналоги / Н. Ю. Хромова, Т. К. Гар, В. Ф. Миронов. – Москва : НИИТЭХИМ, 1985. – 33 с.
5. Goodman S. Organic Germanium – Powerful Healer // J. Comp. Med. – 1987. – № 4. – Р. 34–52.
6. Акбаров А. Б. Бионеорганические аспекты особенностей взаимосвязи типа состав-строение-специфическая активность биоконплексов / А. Б. Акбаров, Ю. Я. Харитонов, М. Н. Исламов // Журнал неорганической химии. – 1993. – Т. 38, № 2. – С. 312–327.
7. Улахович Н. А. Комплексы металлов в живых организмах / Н. А. Улахович // Химия, биохимия. – 1997. – № 8. – С. 26–31.
8. Effects of 2-carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as an immunological modifier of post-surgical immunosuppression in dogs / Y. Nakada, T. Kosaka, M. Kuwabara [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 1993. – V. 55, № 5. – P. 795–799.
9. Effect of germanium-132 on galactose cataracts and glycation in rats / N. Unakar, M. Johnson, J. Tsui [et al.] // Exp. Eye Res. – 1995. – V. 6, № 2. – P. 155–164.
10. Dose dependency of germanium-dioxide-induced nephrotoxicity in rats / T. Sanai, K. Onoyama, S. Osato [et al.] // Nephron. – 1991. – V. 57, № 3. – P. 349–354.
11. Lahans T. Integrating Conventional and Chinese Medicine in Cancer Care: A Clinical Guide / T. Lahans // Churchill Livingstone. Elsevier, Edinburgh. – 2007. – P. 376.
12. Hachisu M. Analgesic effect of novel organogermanium compound, GE-132 / M. Hachisu, H. Takahashi, T. Koeda, Y. Sekizawa // J. Pharmacobiodyn. – 1983. – V. 6, № 11. – P. 814–820.
13. Yang M. K. Protective role of germanium-132 against paraquat-induced oxidative stress in the livers of senescence-accelerated mice / M. K. Yang, Y. G. Kim // J. Toxicol Environ Health A. – 1999. – V. 58, № 5. – P. 289–297.

14. Nakamura T. The Oral Intake of Organic Germanium, Ge-132, Elevates α -Tocopherol Levels in the Plasma and Modulates Hepatic Gene Expression Profiles to Promote Immune Activation in Mice / T. Nakamura, T. Takeda, Y. Tokuji // *Int J. Vitam Nutr Res.* – 2014. – V. 84, № 3–4. – P. 183–195.
15. Aso H. Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) in mice infected with influenza virus / H. Aso, F. Suzuki, T. Ebina, N. Ishida // *J. Biol Response Mod.* – 1989. – V. 8, № 2. – P. 180–199.
16. Ho C. C. Effects of organogermanium compound 2-carboxyethyl germanium sesquioxide on cardiovascular function and motor activity in rats / C. C. Ho, Y. F. Chern, M. T. Lin // *Pharmacology.* – 1990. – V. 41, № 5. – P. 286–291.
17. DNA binding specificity and cytotoxicity of novel antitumor agent Ge 132 derivatives / G. Shangguan, F. Xing, X. Qu [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2005. – V. 15, № 12. – P. 2962–2965.
18. Aronson J. K. In: Side Effects of Drugs Annual / J. K. Aronson (ed.) // Elsevier. – 2008. – V. 30. – P. 209–222.
19. Propagermanium: a nonspecific immune modulator for chronic hepatitis / B. C. Hirayama, H. Suzuki, M. Ito [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2000. – V. 30, № 6. – P. 525–532.
20. Wakabayashi Y. Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits / Y. Wakabayashi // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2001. – V. 65, № 8. – P. 1893–1896.
21. Prevention of trabecular bone loss in the mandible of ovariectomized rats / G. Jiang, H. Matsumoto, J. Yamane [et al.] // *J. Oral Sci.* – 2004. – V. 46, № 2. – P. 75–85.
22. Unakar N. J. Effect of pretreatment of germanium-132 on Na(+)-K(+)-ATPase and galactose cataracts / J. Tsui, M. Johnson // *Curr Eye Res.* – 1997. – V. 16, № 8. – P. 832–837.
23. Germane facts about germanium sesquioxide: I. Chemistry and anticancer properties / B. J. Kaplan, W. W. Parish, G. M. Andrus [et al.] // *J. Altern. Complement. Med.* – 2004. – V. 10, № 2. – P. 337–344.
24. Synthesis and evaluation of novel organogermanium sesquioxides as antitumor agents / C. L. Zhang, T. H. Li, S. H. Niu [et al.] // *Bioinorganic Chem. Applicat.* – 2009. Article ID 908625. – P. 1–8.
25. Zhou Z. Structural diversities of cobalt(II) coordination polymers with citric acid / Z. Zhou, Y. Deng, H. Wan // *American Chem. Soc.* – 2005. – V. 5, № 3. – P. 1109–1117.
26. Radioprotective Activity and Synthesis of S-ladithioacetals and Germadithioacetals Derived from N-substituted Naphthylethylimidazoline / B. Célariès, G. Rima, L. Court [et al.] // *Met Based Drugs.* – 2001. – V. 8, № 4. – P. 199–210.
27. Menchikov L. G. Biological Activity of Organogermanium Compounds (A Review) / L. G. Menchikov, M. A. Ignatenko // Translated from *Khimiko – Farmatsevticheskii Zhurnal.* – 2012. – V. 46, № 11. – P. 3–6.
28. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine / E. Lukevics, L. Ignatovich. M. Gielen [et al.] // J. Wiley, Chichester, England. – 2005. – V. 15. – P. 279–295.
29. Synthesis, molecular structure and biological activity of Bromobenzylgermatranes / E. Lukevics, L. Ignatovich, T. Shul'ga [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry.* – 2002. – V. 659. – P. 165–171.
30. Ye L. Synthesis and biological activity of 3-(2, 8, 9-trioxa-aza-1-germatricyclo[3.3.3.0]undecane-1-yl)-hydroxycinnamic acids / L. Ye, W. Zhang // *Medicinal Chemistry.* – 2007. – V. 3, № 5. – P. 466–468.
31. Synthesis and biological activity of 3-(2, 8, 9-trioxa-aza-1-germatricyclo[3.3.3.0]undecane-1-yl)-caffeic acid / L. Ye, Y. Luo, X. Peng [et al.] // *Med Chem.* – 2009. – V. 5, № 4. – P. 382–384.
32. A novel organogermanium protected atopic dermatitis induced by oxazolone / M. Li, J. A. Seo, K. M. Lim, S. W. Ham // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2010. – V. 20, № 14. – P. 4032–4034.
33. Synthesis and biological evaluation of water-soluble organogermanium / S. Choi, C. Oh, J. Han [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2010. – V. 45, № 4. – P. 1654–1656.
34. Synthesis and biological activity of silyl- and germylsubstituted trifluoroacetyl furans / L. Ignatovich, D. Zarina, I. Shestakova [et al.] // *Met Based Drugs.* – 2001. – V. 8, № 4. – P. 211–214.
35. Germa-gamma-lactones as novel inhibitors of bacterial urease activity / Z. Amtul, C. Follmer, S. Mahboob [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – V. 356, № 2. – P. 457–463.
36. Badawi A. M. Synthesis and Immunomodulatory Activity of Some Novel Amino Acid Germinates / A. M. Badawi, A. A. Hafiz // *J. Iran. Chem. Soc.* – 2007. – V. 4, № 1. – P. 107–113.
37. Тимчишин О. Л. Фармакологічна активність нової біологічно активної речовини – купрум-оксидилідендифосфатогерманату: Дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук; спеціальність 14.03.05 «Фармакологія» / Тимчишин О. Л., Одеський національний медичний університет МОЗ України. – Одеса, 2015.
38. Xie W. Effects of selenium and germanium on lipid peroxidation in rats fed with low-selenium grain / W. Xie, X. Chen, K. Yang // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* – 1996. – V. 30, № 2. – P. 88–90.
39. Pronai L. Decreased plasma superoxide scavenging activity in immunological disorders--carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as a promoter of prednisolone / L. Pronai, S. Arimori // *Biotherapy.* – 1992. – V. 4, № 1. – P. 1–8.
40. Hepatoprotective effect of propagermanium on *Corynebacterium parvum* and lipopolysaccharide-induced liver injury in mice / S. Yokochi, Y. Ishiwata, H. Hashimoto [et al.] // *Scand J Immunol.* – 1998. – V. 48, № 2. – P. 183–191.
41. Ishiwata Y. Protection against concanavalin A-induced murine liver injury by the organic germanium compound, propagermanium / Y. Ishiwata, S. Yokochi, H. Hashimoto // *Scand J Immunol.* – 1998. – V. 48, № 6. – P. 605–614.

42. Propagermanium: a nonspecific immune modulator for chronic hepatitis B / C. Hirayama, H. Suzuki, M. Ito, M. Okumura // *J Gastroenterol.* – 2003. – V. 38, № 6. – P. 525–532.
43. Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via inhibition of macrophage infiltration / T. Yamashita, S. Kawashima, M. Ozaki [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2002. – V. 22, № 6. – P. 969–974.
44. Long-term treatment with propagermanium suppresses atherosclerosis in WHHL rabbits / Y. Eto, H. Shimokawa, E. Tanaka [et al.] // *J. Cardiovasc Pharmacol.* – 2003. – V. 41, № 2. – P. 171–177.
45. An anti-inflammatory drug, propagermanium, may target GPI-anchored proteins associated with an MCP-1 receptor, CCR2 / S. Yokochi, H. Hashimoto, Y. Ishiwata [et al.] // *J Interferon Cytokine Res.* – 2001. – V. 21, № 6. – P. 389–398.
46. Effectiveness of propagermanium treatment in multiple myeloma patients / Y. Tsutsumi, J. Tanaka, H. Kanamori, [et al.] // *Eur J. Haematol.* – 2004. – V. 73, № 6. – P. 397–401.
47. Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium / M. J. Di Martino, J. C. Lee, A. M. Badger [et al.] // *J. Pharmacol Exp Ther.* – 1986. – V. 236, № 1. – P. 103–110.
48. Antitumor effect in mice of an organic germanium compound (Ge-132) when different administration methods are used / H. Aso, E. Shibuya, F. Suzuki [et al.] // *Gan To Kagaku Ryoho.* – 1985. – V. 12, № 12. – P. 2345–2351.
49. Effects of bisphosphonate (pamidronate) on bone resorption resulting from metastasis of a squamous cell carcinoma: report of an autopsy case and evaluation of bone resorbing activity in an experimental animal model / T. Higara, M. Takada, T. Nakajima, H. Ozawa // *J. Oral Maxillofac. Surg.* – 1996. – V. 54, № 11. – P. 1327–1333.
50. Germanium organic γ -interferon and inhibitor of interferonaction inducers / F. J. Yershov, A. N. Narovlyansky, A. M. Amchenkova [et al.] // *Eur. Fed. Immunol. Soc. Abstr.* – 1990. – P. 130.
51. Механізми імунomodуючого ефекта германійорганічних сполучень / О. П. Колесникова, М. Н. Тузова, О. Т. Кудяева [и др.] // *Іммунологія.* – 1995. – № 1. – С. 27–30.
52. Кудрин А. В. Микроэлементы в онкологии. Часть 2. Микроэлементы и противоопухолевый иммунитет / А. В. Кудрин, А. В. Скальный // *Микроэлементы в медицине.* – 2001. – Т. 2, № 2. – С. 31–39.
53. Мансурова Л. А. Влияние изопроксисилартрана и изопроксигерматрана на пролиферативно-репаративную функцию соединительной ткани / Мансурова Л. А. // *Докл. АН СССР.* – 1982. – Т. 262, № 6. – С. 1505–1506.
54. Suppression and acceleration of experimental amyloidosis in mouse model / T. Suzuki, S. Ishikawa, T. Motoyama, S. Oboshi // *Acta Pathol. J.* – 1980. – V. 30, № 4. – P. 557–564.
55. Activation of lymphocytes under the influence of an influenza vaccine combined with a low molecular weight germanium organic compound / V. A. Liashenko, N. K. Akhmatova, I. V. Ambrosov [et al.] // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 2012. – № 6. – P. 64–68.
56. Neuroprotective MK801 is associated with nitric oxide synthase during hypoxia/reoxygenation in rat cortical cell cultures / H. M. Huang, C. C. Shen, H. C. Ou [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2002. – V. 84, № 2. – P. 367–376.
57. Yoshinar O. Hepatoprotective effect of germanium-containing Spirulina in rats with (D)-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced hepatitis / O. Yoshinari, Y. Shiojima, K. Igarashi // *Br J. Nutr.* – 2014. – V. 111, № 1. – P. 135–140.
58. Годован В. В. Вивчення протиаритмічних властивостей біологічно активних речовин – похідних дифосфонатів германію (Повідомлення 2) / В. В. Годован, Н. В. Кресюн // *Одеський медичний журнал.* – 2006. – № 1 (93). – С. 11–15.
59. Годован В. В. Фармакологія гепатозахисної дії нових координаційних сполук германію з біолігандами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / В. В. Годован. – Одесса, 1998. – 17 с.
60. Годован В. В. Вплив магнієвої солі дифосфонату германію на активність АТФ-аз мітохондрій міокарда на експериментальній міокардіодістрофії / В. В. Годован, Н. В. Кресюн // *Досягнення біології та медицини.* – 2006. – № 1 (7). – С. 24–29.
61. Сейфуллина И. Й. Образование и реакционная способность бисцитратогерманиевых кислот / И. Й. Сейфуллина, Е. А. Чабаненко, Е. Э. Марцинко // *Вісник ОНУ.* – 2012. – Т. 17, № 3, – С. 13–22.
62. Лукьянчук В. Д. ЭПР-спектроскопический анализ протекторного действия координационного соединения германия с магнием и оксидилендифосфоновой кислотой в условиях синдрома длительного раздавливания / В. Д. Лукьянчук, Н. В. Рисухина, И. И. Сейфуллина // *Журнал АМН України.* – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 592–560.
63. Лук'яничук В. Д. Вплив координаційної сполуки германію з ніотиновою кислотою на кінетику рівня парамагнітних центрів гепатоцитів у щурів в умовах гіпоксії замкнутого простору / В. Д. Лук'яничук, О. Д. Немятых, Л. В. Савченкова // *Ліки.* – 2002. – № 5 – С. 81–85.
64. Немятых О. Д. Влияние координационного соединения германия с никотиновой кислотой на окислительно-антиоксидантное равновесие в мозге крыс с гипоксией замкнутого пространства / О. Д. Немятых // *Фармаком.* – 2002. – № 3. – С. 180–184.
65. Внукова М. О. Фармакологія корекції гепатотоксичності протитуберкульозних засобів координаційною сполукою германію з нікотинамідом / М. О. Внукова // *Військова медицина України.* – 2007. – Т. 7, № 1–2. – С. 41–46.

66. Сейфуллина И. И. Гомо- и гетерометаллические комплексоны германия (IV) / И. И. Сейфуллина, Е. Э. Марцинко. – Одеса : Фенікс, 2011. – 168 с.
67. Лучишин Т. Р. Пошук засобів фармакотерапії синдрому ендогенної інтоксикації серед координаційних сполук германію: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.05 «фармакологія» / Т. Р. Лучишин. – Одеса, 2013. – 22 с.
68. Крилова О. В. Фармакокінетичний аналіз церебропротекторної дії координаційної сполуки германію з оксидилідендифосфоновою кислотою та пірацетамом : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук : спец. 14.03.05 «фармакологія» / О. В. Крилова. – Харків, 2010. – 20 с.
69. Рисухина Н. В. Токсикометрические параметры МИГУ-6 –потенциального средства для лечения синдрома длительного раздавливания / Н. В. Рисухина, И. И. Сейфуллина, Е. Э. Марцинко // Современные проблемы токсикологии. – 2007. – № 3. – С. 59–61.
70. Чадова Л. В. Влияние нового потенциального нейропротектора – МИГУ-1 на состояние антиоксидантного профиля в условиях острой цереброваскулярной недостаточности / Л. В. Чадова // Український медичний альманах. – 2007. – № 6. – С. 164–168.
71. Фармакологічні ефекти германійорганічних сполук / І. Й. Сейфулліна, О. Д. Немятих, В. Д. Лук'янчук, Є. В. Ткаченко // Одеський медичний журнал. – 2002. – № 6. – С. 110–114.
72. Фармакокінетическая характеристика МИГУ-1 в норме и в условиях церебральной ишемии / В. И. Кресюн, В. Д. Лукьянчук, Д. С. Кравец [и др.] // Журнал АМН України. – 2008. – № 3. – С. 582–592.
73. Фармакокінетичний профіль МИГУ-5 в нормі та на моделі ендотоксемії / В. Д. Лук'янчук, Т. Р. Лучишин, Н. В. Рисухина [та ін.] // Журнал АМН України. – 2012. – № 4. – С. 529–535.
74. Крилова О. В. Порівняльна фармакокінетика нового потенційного церебропротектора ВІТН-1 на етапі абсорбції в нормі і при церебральній ішемії / О. В. Крилова // Фармацевтичний журнал. – № 2. – 2010. – С. 73–77.
75. Спектр розподілення координаційної сполуки германію з пірацетамом в організмі щурів в нормі та за умов ішемії головного мозку / В. І. Кресюн, В. Д. Лук'янчук, О. В. Крилова [та ін.] // Журнал АМН України. – № 1. – 2010. – С. 149–159.
76. Особливості біотрансформації нового потенційного церебропротектора ВІТН-1 у нормі та при церебральному ішемічному інсульті / О. В. Крилова, В. Д. Лук'янчук, В. Г. Ткаченко [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – № 3 (10). – С. 5–20.

В. Д. Лук'янчук, І. Й. Сейфулліна, Д. Ф. Литвиненко, О. Е. Марцинко **Фармакологічні властивості органічних і координаційних сполук германію – сучасні уявлення**

В оглядовій статті наведено сучасні відомості з питань фармакології органічних і координаційних сполук германію. Відображені основні представники германійорганічних похідних, що містять координаційні зв'язки. В огляді детально викладено дані щодо широкого спектра фармакодинамічних ефектів, притаманних германійвмісним сполукам, а також їхнього впливу на морфогенез тканин. Значну увагу приділено фармакотерапевтичній ефективності координаційних сполук германію з біолігандами різної будови на низці моделей невідкладних станів, основу патогенезу яких складає гіпоксичний синдром. Окремі фрагменти огляду присвячені токсикометрії та фармакокінетиці сполук германію, що містять координаційні зв'язки.

Стаття містить інформацію щодо фармакологічних властивостей гомо- та гетерометалічних комплексів германію, а також структурні формули шести, найефективніших з фармакотерапевтичної точки зору, координаційних сполук. В огляді зроблено наголос на можливих механізми реалізації фармакологічної дії сполук германію за умов їхнього застосування при екстремальних кисеньдефіцитних станах, зокрема, наведено відомості щодо їхнього впливу на біоенергетичні процеси. Важливими видаються дані літератури, які висвітлюють результати ЕПР-спектрометричного дослідження впливу координаційних сполук германію з різними біолігандами на структурно-функціональний стан мітохондріального та мікросомального ланцюгів транспорту електронів за умов гіпоксичного синдрому травматичного, ішемічного та іншого генезу.

Представлена інформація вказує на доцільність пошуку нових лікарських засобів серед уперше синтезованих координаційних сполук германію, що містять різні метали та біоліганди.

Ключові слова: германійорганічні сполуки, координаційні сполуки германію, фармакодинаміка, фармакокінетика, застосування

В. Д. Лук'янчук, И. И. Сейфуллина, Д. Ф. Литвиненко, О. Е. Марцинко **Фармакологические свойства органических и координационных соединений германия – современные представления**

В обзорной статье приведены современные сведения по вопросам фармакологии органических и координационных соединений германия. Отражены основные представители германійорганіческих производных, содержащих координационные связи. В обзоре подробно изложены данные по

широкому спектру фармакодинамічних ефектів, присущих германійсодержащим соединениям, а также их влияние на морфогенез тканей. Пристальное внимание уделяется фармакотерапевтической эффективности координационных соединений германия с биолигандами различного строения на ряде моделей неотложных состояний, в основе патогенеза которых лежит гипоксический синдром. Отдельные фрагменты обзора посвящены токсикометрии и фармакокинетике соединений германия, содержащих координационные связи.

Статья содержит информацию о фармакологических свойствах гомо- и гетерометаллических комплексов германия, а также структурные формулы шести, наиболее эффективных с фармакотерапевтической точки зрения, координационных соединений. В обзоре делается акцент на возможные механизмы реализации фармакологического действия соединений германия в условиях их применения при экстремальных кислороддефицитных состояниях, в частности, отражены сведения об их влиянии на биоэнергетические процессы. Важными представляются данные литературы, освещающие результаты ЭПР-спектрометрического исследования влияния координационных соединений германия с различными биолигандами на структурно-функциональное состояние митохондриальной и микросомальной цепи транспорта электронов в условиях гипоксического синдрома травматического, ишемического и другого генеза.

Представленная информация указывает на целесообразность поиска новых лекарственных средств среди впервые синтезированных координационных соединений германия, содержащих различные металлы и биолиганды.

Ключевые слова: германийорганические соединения, координационные соединения германия, фармакодинамика, фармакокинетика, применение

V. D. Lukjanchuk, I. J. Seifullina, D. F. Litvinenko, O. E. Martsynko

The pharmacological properties of organic and coordination compounds of germanium – modern views

This review presents current data on the pharmacology of organic and coordination compounds of germanium. There were reflected main representatives of germanium organic derivatives which contain coordination bonds. In review detail sets out data about broad-spectrum of pharmacodynamic effects of germanium-contain compounds and also their effect on morphogenesis of tissue. Close attention is paid to pharmacotherapeutic effectiveness of coordination compounds of germanium with bioligands of different structure on a number of models of emergency conditions with hypoxic syndrome in their pathogenesis. Some fragments of review are devoted to toximeters and pharmacokinetics of germanium compounds which contain coordination bonds.

This article contains information about pharmacological properties of homo- and hetero metal complexes of germanium and also structural formula of six most effective coordination compounds from pharmacotherapeutic point of view. The review focuses on possible mechanisms for implementing the pharmacological action of the compounds of germanium for use under extreme conditions with deficit of oxygen, especially recorded information about their influence on the bioenergetic processes. It is presented the data of literature that expose the results of the EPR spectrometer study of the effect of coordination compounds of germanium with different bioligands on the structure and function of microsomal and mitochondrial electron transport chains in conditions of hypoxic syndromes of traumatic, ischemic or other origin.

The present information indicates on the search expediency of new drugs among novel coordination compounds of germanium that contain different metals and biolihands.

Key words: germanium-organic compounds, coordination compounds of germanium, pharmacodynamics, pharmacokinetics, application

Надійшла: 24 листопада 2015 р.

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

І. С. Чекман

Науково-методичні основи викладання нанофармакології

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

Ключові слова: нанонаука, нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія, викладання

Друга половина XX та початок XXI століть характеризуються значним зростанням інтересу вчених світу до досліджень з нанонауки, завдяки розвитку якої інтенсивно розробляються нові нанотехнології отримання наноматеріалів та дослідження їхніх властивостей [1–3]. Протягом цих років світ став свідком своєрідного нанотехнологічного вибуху, що сприяв впровадженню в практичну діяльність людини нових приладів, препаратів, методик діагностики та лікування різних захворювань. Стрімко розвиваються дослідження з вивчення фізичних, хімічних, біологічних, фармакологічних, токсикологічних властивостей нанорозмірних структур. Наноструктуровані матеріали є об'єктом досліджень фундаментальних та прикладних наук [4–7], оскільки, зі зменшенням характерних розмірів їхніх структурних одиниць до нанорівня, вони набувають нові властивості, зумовлені квантово-розмірними ефектами та зростаючою роллю поверхневих атомів і взаємодій. Сучасний інтерес до цієї динамічної області нанонауки пов'язаний як з принципово новими фундаментальними науковими проблемами і фізико-хімічними явищами, так і з перспективами створення на їхній основі абсолютно нових квантових пристроїв і систем з широкими функціональними можливостями для опто- та наноелектроніки, вимірювальної техніки, інформаційних технологій нового покоління, засобів зв'язку, а також діагностики й лікування різних захворювань [8–11].

Тому виникає необхідність висвітлення науково-методичних аспектів

розвитку різних напрямів нанонауки, нанотехнологій, наномедицини та нанофармакології.

Мета дослідження – узагальнити досвід викладання нанофармакології студентам на кафедрі фармакології та клінічної фармакології.

Результати та їх обговорення. У робочу програму з фармакології включені питання з цього напрямку світової науки. Науково методичні основи викладання нанофармакології полягають у наступному:

- 1) На лекціях та практичних заняттях висвітлюються досягнення учених світу, України та Національного медичного університету імені О. О. Богомольця з нанонауки, наномедицини й нанофармакології.
- 2) Залучення студентів до проведення досліджень з нанофармакології.
- 3) Проведення науково-методичних конференцій молодих вчених з нано-медицини.

1. На лекціях та практичних заняттях. У вступній лекції з історії лікознавства студентам викладачі розповідають про розвиток (емпіричний і науковий періоди) нанонауки, нанотехнологій, наномедицини та нанофармакології [3, 5, 8, 12–14]. Народи стародавнього світу отримували матеріали за допомогою нанотехнологій. Прикладами емпіричного періоду застосування нанотехнологій, коли людство про це навіть не здогадувалося, є отримання кольорового скла, глиняних та керамічних виробів у стародавній Греції, Китаї, Римі, Єгипті, Київській Русі.

Ідею мініатюризації з позицій науково-практичної реалізації людство мало з давніх часів. Про це свідчать народні билини, фантастичні літературні твори. Так, відомий англійський письменник Джонатан Свіфт (1667–1745) у повісті «Мандрівка Гулівера» описав маленьких

людей – ліліпутів. Відомий російський письменник М. С. Лесков (1831–1895) у повісті «Сказ про тульського косого Лівшу і про стальну блоху» описав майстерність Лівши, що зумів підкувати блоху, яку з Англії привіз російський цар Олександр Павлович. Відомим є талант українського майстра М. Сябрістого з виготовлення мікропортретів видатних українських письменників, поетів. Польський письменник С. Лем (1921–2006) у романі «Непереможений» описує своєрідну цивілізацію, що використовує самоорганізуючі системи, біосенсиори, логічні пристрої.

Австрійський учений, фізик-теоретик, один з засновників квантової механіки, лауреат Нобелівської премії з фізики Е. Шредингер (1887–1961) у лютому 1943 року в столиці Ірландії Дубліні прочитав лекцію на тему «Що таке життя з позицій фізики». У цій лекції вперше у світі висунув ідею аперіодичного кристалу – мікросистеми великої інформаційної ємності, яка пізніше була реалізована в розробці сучасних нанотехнологій.

Отримання та застосування колоїдних розчинів відомо з давніх часів. У цих дисперсних системах складові частини мають нанорозміри. Колоїдні розчини є в живій природі, у тому числі й в організмі людини (кров, спинномозкова рідина та ін.). Останніми роками розроблено нанотехнології синтезу колоїдних розчинів металів, органічних матеріалів. Також цікаво, що ліпосоми вже застосовуються понад 40 років, але тільки останніми роками встановлено, що ці структури мають нанорозміри.

Значний внесок у розвиток теоретичних досліджень з вивчення властивостей наночастинок зробив американський учений, фізик-теоретик російського походження Г. А. Гамов (1904–1968). Як встановлено Г. А. Гамовим, особлива властивість квантових частинок, у тому числі електронів, проявляється в здатності проникати через перешкоду, навіть коли енергія нижче потенційного бар'єра. Якщо для подолання електроном перешкоди необхідна більша енергія, ніж має електрон, то він не відштовхнеться від перешко-

ди, а з втратою енергії (подібно до хвилі води) подолає цю перешкоду. Відкрите Г.А. Гамовим явище отримало назву «тунельний ефект», або «тунелювання», дозволило пояснити багато фізичних явищ, зокрема, процеси при виділенні частинок з ядра, що стало основою для сучасної атомної науки та техніки, а також для створення тунельного мікроскопа, який сприяв дослідженню частинок нанорозмірів менших, ніж 0,5 нм.

У 1932 році на основі цих теоретичних досліджень нідерландський учений Ф. Церніке (1888–1966) відкрив метод фазового контрасту і сконструював перший фазово-контрастний мікроскоп, отримавши за це у 1953 році Нобелівську премію. У 1939 році німецькі фізики Е.А. Руска і М. Кноль сконструювали електронний мікроскоп, що забезпечило можливість дослідження наноматеріалів розміром 10 нм.

1959 рік відзначився історичною подією, яка мала важливе значення для подальшого розвитку нанонауки. Американський фізик-теоретик, професор Каліфорнійського технологічного інституту, лауреат Нобелівської премії з фізики (отримав у 1965 році за дослідження з квантової електродинаміки) Р. Ф. Фейнман (1918–1988) у грудні 1959 року на щорічному засіданні Американського фізичного товариства зробив доповідь-лекцію «Внизу багато місця: запрошення увійти в нову область фізики» (There is plenty of room at the bottom: an invitation to enter a new field of physics). Це було тим поштовхом, який стимулював теоретичні, а пізніше і практичні дослідження з нанонауки. Слухачі лекції сприйняли її як нереальну фантастику. Сам же Р. Ф. Фейнман стверджував, що в майбутньому можна буде маніпулювати окремими атомами, і людство зможе реалізувати фантастичні ідеї: «Жоден фізичний або хімічний закон не перешкоджає нам міняти взаємне розташування атомів...» Фактично з цього часу розпочалися науково обґрунтовані дослідження з нанонауки, нанотехнологій та наномедицини [15].

На лекціях і практичних заняттях акцентується увага студентів на тому,

що значний внесок у розвиток нанонауки внесли вчені України. У 50-х роках ХХ століття академіками Б. Є. Патонем і Б. О. Мовчаном розроблено електронно-променеву технологію (молекулярних пучків), за допомогою якої можливим стало отримання спеціальних сплавів металів з надвисокою міцністю. Такі сплави застосовували для побудови космічних апаратів, у військовій галузі, авіації, металургії. Отримання таких матеріалів базувалося на найпереводіших наукових технологіях. У ті часи такі методи отримання матеріалів не мали назви «нанотехнології», але з сучасних позицій, вони є типовими нанотехнологіями. На основі цих нанотехнологій отримані наночастинки металів: срібла, міді, заліза, кремнію тощо [2, 16].

Інститути НАН України вивчають фізичні, фізико-хімічні, біологічні, біохімічні властивості наноматеріалів [2, 7, 14]. Так в Інституті металофізики імені Г. В. Курдюмова (директор – академік О. М. Івасишин) розроблено методи одержання нанорозмірних дисперсних систем за допомогою електровибуху провідників й електричного пробоя рідких середовищ. Ця методика дає змогу отримувати нанопорошки металів, а також вуглецеві наноматеріали: наноалмази, нанотрубки та фулерени. В інституті фізики НАН України (директор – член-кореспондент НАН України Л. П. Яценко) розроблено метод створення штучних наноструктур за допомогою стимульованих електричним полем поверхневих хімічних реакцій на інтерфейсі рідина-грань (ІІІ) золота (академік А. Г. Наумовець і професор О. А. Марченко), що має важливе значення для виявлення високої активності нанорозмірних частинок цього металу. В Інституті теоретичної фізики імені М. М. Боголюбова (директор – академік А. Г. Загородній) ведуться дослідження з встановлення математичних закономірностей взаємодії наноматеріалів з органічними і неорганічними наноструктурами.

В Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова (директор – академік В. Ф. Мачулін) з'ясована природа переходів у гетероструктурах з

квантовими точками InAs-InP, що формуються за участю важких і легких діркових станів (академік М. П. Лисиця та співавтори).

Українські вчені відомі своїми дослідженнями з вивчення властивостей наноструктур кремнію. Член-кореспондент НАН України М. Я. Валах і співробітники отримали цікаві дані щодо можливості керування характеристиками самоорганізованих Si-Ge наноструктур шляхом зміни традиційного напруженого кремнієвого буферного шару. Це зумовлює зміну розміру, форми, поверхневої щільності та компонентного складу сформованих наночастинок.

У Донецькому фізико-технічному інституті імені О. О. Галкіна НАН України (член-кореспондент НАН України В. М. Варюхін) встановлені якісні зміни властивостей кобальтиту лантану при переході до нанорозмірних частинок. Це дає підстави стверджувати, що магнітний стан кобальтиту лантану визначають розміри його елементарної поверхні. В Інституті магнетизму НАН та МОН України (директор – академік В. Г. Бар'яхтар) встановлено, що зміни амплітуд осциляцій викликає також зміни осциляцій гігантського магнетоопору в металевих магнітних наноструктурах. У науково-технологічному комплексі «Інститут монокристалів» (директор – академік В. П. Семиноженко) розроблено наноматеріали, які можна застосовувати в медичній практиці та фармації.

Результати досліджень українських учених дедалі активніше реалізуються на практиці. Так, Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України (директор – академік М. Т. Картель) спільно з вітчизняними науково-медичними закладами вперше у світі розробив, дослідив і впровадив у медичну практику новий препарат сорбційно-детоксикаційної дії на основі нанокремнезему [27].

В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького (директор – академік В. Ф. Чехун) спільно з Інститутом електрозварювання імені Є. О. Патона розробляють нові варіанти колоїдних

систем з магнітними наночастинками Fe_3O_4 з метою створення протипухлинних препаратів [10].

В Інституті загальної та неорганічної хімії імені В. І. Вернадського НАН України (директор – академік С. В. Волков) розроблено технологію синтезу дрібнодисперсних систем з сажі (згодом її назвали нанотрубками) і методику розчинення металів у полімерному середовищі, яку застосовують у магнітному записі інформації, та хімічних засобів одержання наночастинок [8].

Тривають дослідження з нанотехнологій в інших наукових закладах НАН України: Інституті фізичної хімії імені Л. В. Писаржевського (директор – академік В. Г. Кошечко), Фізико-технічному інституті низьких температур імені В. І. Веркіна (директор – академік С. Л. Гнатченко), Інституті проблем матеріалознавства імені І. М. Францевича (директор – академік В. В. Скороход), Інституті біохімії імені О. В. Палладіна (директор – академік С. В. Комісаренко), Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського (директор – академік С. А. Андронаті).

З 80-х років XX століття розпочалися інтенсивні дослідження з нанотехнологій, що зумовило розвиток нанонауки. Нанонаука (Nanoscience: nanos – з грецької – карлик, гномик, science – наука, система знань) – нова галузь науки та виробництва, що вивчає фізичні, фізико-хімічні, біологічні, фармакологічні, фармацевтичні, токсикологічні властивості наночастинок розміром до 100 нм, можливість їхнього синтезу за допомогою нанотехнологій та застосування в різних галузях народного господарства, медицині, ветеринарії, сільському господарстві [1, 4, 17, 18].

Відомий український учений академік Б. О. Мовчан наводить таке визначення **нанотехнологій**: «Сукупність наукових знань, способів і засобів, направленою регульованого складання (синтезу) із окремих атомів і молекул різних речовин, матеріалів та виробів з лінійним розміром елементів структури до 100 нм ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$; $1 \text{ нм} = 10 \text{ Å}$)» [16].

Наноматеріали займають проміжне положення між окремими атомами

(молекулами) та макроструктурами і мають унікальні фізичні, хімічні, фізико-хімічні, біологічні, фармакологічні властивості завдяки малому розміру, хімічному складу, структурі, великій площі поверхні та формі. Нанонаука і нанотехнології зародилися на перехресті різних дисциплін: фізики, хімії, біології, електроніки, матеріалознавства, медицини та інших наук, тому вчені вважають за доцільне розглядати цей напрям як розвиток наносистеми [5, 8].

Проаналізовано визначення, надані світовою науковою спільнотою поняттям, що стосуються нанонауки та нанотехнологій та інших назв цього напрямку.

Нанобіологія – розділ нанонауки, що характеризується поєднанням знань з фізики, матеріалознавства, органічної хімії синтетичних матеріалів, інженерії та біології; поєднує засоби, підходи та матеріали нанонауки та біології, займається розв’язанням біологічних завдань за допомогою нанотехнологій, розробляє способи створення молекулярних приладів з використанням біомакромолекул, створює наномашини шляхом імітації та запозичення підходів, використовуваних природою [3, 19, 20].

Наномедицина досліджує застосування розробок нанотехнологій у медичній практиці для профілактики, діагностики та лікування різних захворювань з контролем біологічної активності, фармакологічної та токсичної дії отриманих продуктів чи медикаментів [13, 21]. **Наномедицина** має на меті: 1) створення наноструктурованих матеріалів та пристроїв, застосовуваних у діагностиці, адресній доставці лікарських засобів та дизайні нових високо-ефективних препаратів; 2) розробку та впровадження у клінічну практику нанопрепаратів; 3) розробку молекулярних машинних систем, здатних проводити діагностичні та терапевтичні процедури *in vivo* безпосередньо у необхідній ділянці тканини чи в клітинах-мішенях [14, 21–23].

Нанофармакологія вивчає фізичні, фізико-хімічні, біологічні, біохімічні, фармакодинамічні, фармакокінетичні властивості розроблених на основі нанотехнологій нанопрепаратів, показання і протипоказання до їхнього

застосування, можливі побічні ефекти. Нанофармакологія – фундаментальний та прикладний розділ нанотехнологій, що вивчає розробку та/або відкриття нових методів доставки лікарських речовин та наномедикаментів, створених для функціонування на нанорозмірному рівні та володіючих новими унікальними властивостями, бажаними для ефективного проведення діагностичної процедури або досягнення лікувального ефекту [17, 24, 25].

Нанофармація досліджує технології розробки лікарських форм нано-препаратів для ефективного застосування у медичній практиці. Основним завданням нанофармації є створення, розробка та впровадження в медичну практику нанорозмірних фармакологічних субстанцій та векторів-носіїв, застосовуваних для адресної доставки лікарських засобів та впливу на конкретну ділянку патологічного процесу та мінімізації негативних ефектів на здорові тканини. Мета нанофармації – оптимізація фармакокінетичних, фармакодинамічних та токсикологічних властивостей лікарських речовин з метою отримання максимальної терапевтичної ефективності при найменшій вираженості побічних ефектів [12, 26, 27].

Нанотоксикологія – галузь нанонауки, що вивчає теоретичні та практичні аспекти токсичності наноматеріалів, визначає, у якій мірі унікальні властивості наноструктур здатні становити загрозу для навколишнього середовища в цілому та здоров'я людини зокрема. Нанотоксикологія досліджує характер взаємодії наноструктур з біологічними системами, приділяючи особливу увагу взаємодіюванню між фізико-хімічними властивостями наночастинок та викликаними ними токсичними відповідями біологічних структур [28–30].

На кафедрі гігієни праці та професійних захворювань Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (зав. кафедри член-кореспондент НАМН України, професор О. П. Яворовський) проводяться дослідження з токсикології наносрібла при різних шляхах введення, а також вивчення умов праці

при виробництві наночастинок, отриманих за технологією Б. Є. Патона і Б. О. Мовчана [28].

В Інституті медицини праці НАМН України (директор – академік Ю. І. Кундієв, провідні наукові співробітники – Т. К. Кучерук, В. А. Стежка) проведено дослідження з вивчення токсикологічних властивостей нанокремнезему при інгалаційному надходженні. Встановлено, що при інгалації наночастинок кремнезему чинять негативний вплив не тільки на легені, а також на інші органи (печінку, міокард, нирки). Токсикологічна активність залежить від розміру наночастинок. Частинок 6–7 нм зумовлюють більш виражені токсикологічні зміни, ніж наночастинок розміром 54–55 нм. У цьому науковому закладі також проводяться дослідження (академік НАМН України І. М. Трахтенберг) з вивчення впливу на організм важких металів (зокрема, наносвинцю) та наукового обґрунтування засобів безпеки в умовах виробництва нанометалів [31, 32].

В Інституті гігієни та медичної екології імені О. М. Марзєєва (директор – академік НАМН України А. М. Сердюк) створений відділ з вивчення безпеки нанотехнологій та наноматеріалів, де вивчаються протимікробні та токсикологічні властивості наносрібла, синтезованого в Інституті хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України та інших наукових колективах [33].

Інтенсифікація фундаментальних досліджень, розробка та впровадження нанотехнологій у практичну діяльність людини підготували появу часописів та журналів «Nanotechnology», «Journal Nanoscience Nanotechnology», «National Nanotechnology», «Nano Letters», «Nanomedicine», «Small», «Lab Chip», «Langmuir», «IEEE Proceedings Nanobiotechnology», «Journal Biomed. Nanotechnology», «Nano Today», «ACS Nano», «Nano Research», «Nanoscale» та інших видань.

На грудень місяць 2013 року цитуються статті, що містять ключові слова нанонаука, нанотехнології, наночастинок, наноматеріали в наукометричній базі даних PubMed (електронна адреса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Ключові слова мали знаходитися в тексті публікації, а наявність таких слів у

назві журналу або організації, яку представляли автори, не враховували. При пошуку за принципом «слово стосовно нанонауки чи нанотехнологій + додаткове слово, що характеризує науковий або прикладний напрям», отримано наступні результати: nanoscience – 583, nanotechnology – 27624, nanoparticle – 19801, nanomaterials – 5821, biotechnology – 921, medicine – 1258, toxicology – 279, pharmacology – 2682, pharmacy – 21.

На кафедрі фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця дослідження з нанофармакології розпочалися 15 років тому спільно з Інститутом хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України з вивчення властивостей нанодисперсного кремнезему (препарат «Силікс»). Силікс застосовують для терапії захворювань шлунково-кишкового тракту [34]. Даний препарат випускають у флаконах (порошок) і застосовують у вигляді водної суспензії. Недоліком порошку є низька седиментаційна стійкість. Тому виникла необхідність у розробці стабілізованої водної суспензії нанодисперсного кремнезему, яка була б універсальнішою та зручнішою у здійсненні терапевтичних заходів. У лабораторії кафедри розроблено нову лікарську форму – суспензію нанодисперсного кремнезему (О. В. Ніцак). Вона зменшує токсичність і негативний вплив на функцію печінки таких сполук, як натрію фторид і натрію нітрит, а також протитуберкульозних препаратів – ізоніазиду, піразинаміду, етамбутолу, що різняться за механізмом негативного впливу на організм і хімічною структурою. За фармакологічною активністю суспензія нанодисперсного кремнезему перевищує препарат Силікс [17, 34]. Нині цей науковий колектив продовжує дослідження.

У плані продовження досліджень з нанофармакології з 2006 року розпочаті спільні розробки з Інститутом електрозварювання імені Є. О. Патона. У Міжнародному центрі електронно-променевих технологій Інституту електрозварювання імені Є. О. Патона під керівництвом академіка Б. О. Мовчана здійснюється синтез наночастинок органічно-

го та неорганічного походження шляхом електронно-променевого випаровування у вакуумі. При цьому макроскопічний об'єкт-попередник (металевий злиток) атомізується шляхом нагрівання потужним електронним променем. У подальшому створений паровий потік наноматеріалу конденсується на підкладці з утворенням наночастинок металів. Шляхом варіації температури підкладки можна регулювати середній розмір отриманих наночастинок [2, 17]. За ініціативою президента НАН України, директора Інституту електрозварювання імені Є. О. Патона академіка Б. Є. Патона у 2008 році організовано спільну лабораторію «Електронно-променеві нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини» Інституту електрозварювання імені Є. О. Патона і Національного медичного університету імені О. О. Богомольця [2].

Науковці лабораторії «Електронно-променева нанотехнологія неорганічних матеріалів для медицини» спільно з інститутами НАН і НАМН України, а також з вищими навчальними закладами України отримали наукові та практичні факти:

1. Розроблено технологію отримання наночастинок срібла, міді, їхніх композитів, а також нанозаліза, наноцирконію, наноалюмінію та інших металів, нановуглецю (Б. О. Мовчан).
2. Встановлено особливості фармакології наночастинок срібла, міді, заліза (Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, А. М. Дорошенко, А. О. Прискова, Д. С. Савченко, П. В. Сімонов).
3. Наночастинки срібла, міді, та їхні композити проявляють більш виражену протимікробну дію, ніж ці метали звичайних розмірів (Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського, професор В. Ф. Марієвський, Н. М. Рубан).
4. Розроблено технологію отримання лікарських форм: мазь, гель, емульсія наночастинок срібла, міді, їх композитів (Львівський національний медичний університет, доцент С. Б. Білоус).
5. Розроблено технологію отримання супозиторіїв наночастинок срібла (Харківський національний медичний

університет, професор Т. В. Звягінцева, професор Г. О. Сирова).

5. Встановлено, що в цих лікарських формах наночастинки срібла, міді, їхні композити проявляють більш виражену протимікробну дію, ніж ці метали звичайних розмірів (Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського, професор В. Ф. Марієвський).

Цікавими є дослідження з вивчення впливу нанометалів за умов ембріогенезу (ДУ «Дніпропетровська медична академія», професор В. Ф. Шаторна, доктор медичних наук О. О. Савенкова).

Поглиблення таких досліджень з метою розробки нових високоефективних медикаментів на основі нанотехнології молекулярних пучків для лікування різних захворювань матиме важливе теоретичне та практичне значення для розвитку медичної науки і практики.

До вивчення властивостей наночастинок металів, отриманих за технологією Б. Є. Патона і Б. О. Мовчана, були залучені інші наукові колективи НАМН України: Інститут медицини праці (директор – академік Ю. І. Кундієв), Інститут гігієни та медичної екології імені О. М. Марзєєва (директор – академік НАМН України А. М. Сердюк), Інститут очних хвороб (директор – член-кореспондент НАМН України Т. В. Пасічникова), Інститут фармакології та токсикології (директор – член-кореспондент НАМН України Т. А. Бухтіарова).

Одним з перших вітчизняних препаратів ліпосом є Ліпін – спільна розробка Інституту фармакології та токсикології НАМН України та Харківського фармацевтичного підприємства «Біолік». Основний компонент препарату – нанокапсули фосфатидилхоліну, який є природним компонентом біомембран. Препарат виявляє антигіпоксичну дію, пригнічує процеси перекисного окиснення ліпідів, підвищує неспецифічний імунітет, модулює функцію адренорецепторів [35].

Для поглиблення та розширення досліджень з нанофармакології та нанотоксикології кафедрою були залучені вищі медичні заклади МОЗ України: Буковинський медичний університет,

Вінницький національний медичний університет, Дніпропетровська медична академія, Запорізький державний медичний університет, Кримський медичний університет, Луганський медичний університет, Одеський національний медичний університет, Полтавська медична академія, Тернопільський медичний університет.

Значний цикл досліджень з нанохімії та нанобіології здійснений в Інституті біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України (директор – доктор хімічних наук, професор З. Р. Ульберг). Дослідженнями З. Р. Ульберг і співробітників (Т. Г. Грузіна, С. Н. Дибкова, Л. С. Резніченко) з'ясовані молекулярні структури комплексів нанометал-біомолекули та механізми, відповідальні за цей процес [20]. У плані продовження досліджень кафедри фармакології та клінічної фармакології з нанофармакології спільно з Інститутом біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України розроблена оригінальна технологія синтезу наночастинок срібла, міді, заліза, а також їхніх композитів з органічними сполуками (кислота аскорбінова, антибіотики). Композит нанозаліза з аскорбіновою кислотою проявляє більш виражену протианемічну активність, ніж нанозалізо. Важливим аспектом розробок є встановлення того факту, що генотоксичність нанорозмірних металів значною мірою залежить від розміру таких структур, а також їхньої форми. До проведення цих досліджень залучено лабораторію мікробіології, вірусології та мікології (завідувач – професор А. В. Руденко) Інституту урології НАМН України, у якій встановлено, що наночастинки металів також проявляють виражену протимікробну дію, у тому числі проти патогенних грибів.

Особливу увагу вченим світу слід звернути на вивчення токсикологічних властивостей нанопрепаратів, впливу їх не тільки на організм людини, але й на довкілля, а також на біоетичні аспекти дослідження властивостей наночастинок [28–30, 33, 36].

2. *Залучення студентів до проведення досліджень з нанофармакології.* Викладачі кафедри активно залучають студен-

тів до проведення досліджень з нанонауки, наномедицини та нанофармакології. Щорічно студенти виступають з науковими доповідями як на університетських конференціях, так і в інших вищих навчальних закладах не тільки в Україні, але і зарубіжних країнах (Російській Федерації, Болгарії, Німеччині, Чехії). Згідно з реалізацією запровадженої ректором університету академіком НАМН України В. Ф. Москаленком програми «Старший лаборант» на кафедрі зараховано 8 випускників університету, а саме: О. В. Ніцак, Т. Ю. Небесна, А. М. Дорошенко, Д. С. Савченко, А. О. Прискока, П. В. Сімонов, Г. І. Гребельник, О. А. Покотило, двоє з яких вже мають науковий ступінь кандидата наук, один подав документи до офіційного захисту, а інші – виконують кандидатські дисертації.

3. *Щорічне проведення науково-методичних конференцій молодих вчених з наномедицини та нанофармакології.* За ініціативою співробітників кафедри спільно з науковим студентським товариством та Радою молодих вчених університету проведено 4 конференції «YouthNanoBiotech. Молодіжний форум з нанобіотехнологій», на яких виступали з доповідями молоді вчені як Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, так і інших наукових колективів.

Результати проведених досліджень з нанонауки, наномедицини та нанофармакології узагальнені в 4 монографіях та «Англо-українському словнику-довіднику з нанонауки», у наукових статтях.

У Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця дослідження з нанонауки проводяться на кафедрах аптечної і промислової технології лікарських засобів, гігієни та екології, гістології та ембріології, гігієни праці та професійних хвороб, ендокринології, медичної і біологічної фізики, медичної та загальної хімії, мікробіології, вірусології та імунології, нейрохірургії, педіатрії № 3, травматології та ортопедії, хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії.

Заклучення

Як свідчить аналіз отриманих ученими світу, України та Національного медичного університету імені О. О. Богомольця даних з нанонауки, нанотехнологій, наномедицини, нанофармакології та нанотоксикології, триває вивчення різних властивостей наноматеріалів, можливостей їхнього застосування в діагностиці, профілактиці та лікуванні різних захворювань. Викладачі кафедри на лекціях і практичних заняттях висвітлюють питання нанонауки, наномедицини та нанофармакології.

1. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А. И. Гусев. – [2-е изд., испр.]. – Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 416 с.
2. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний і соціальний аспекти / Патон Б. Є., Москаленко В. Ф., Чекман І. С., Мовчан Б. О. // Вісник Національної академії наук України. – 2009. – № 6. – С. 76–80.
3. Boisseau P. Nanoscience. Nanobiotechnology and nanobiology / P. Boisseau, P. Houdy, M. Lahmani. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2010. – 1200 p.
4. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / Борисевич В. Б., Каплуненко В. Г., Косінов М. В. [та ін.]. – Київ : ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
5. Елисеев А. А. Функциональные наноматериалы. Под ред. Ю. Д. Третьякова / А. А. Елисеев, А. В. Лукашин. – Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 456 с.
6. Чекман І. С. Природні наноструктури та наномеханізми / І. С. Чекман, П. В. Сімонов. – Київ : Задруга, 2012. – 104 с.
7. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Чуйко А. А., Погорелый В. К., Пентюк А. А. [и др.]. – Киев : Наукова думка, 2003. – 415 с.
8. Нанохімія. Наносистеми. Наноматеріали / [Волков С. В., Ковальчук С. П., Генко В. М., Решетняк О. В.]. – Київ : Наукова думка, 2008. – 422 с.
9. Горчакова Н. О. Наноматеріали і наночастинки: класифікація / Горчакова Н. О., Озейчук О. Ю., Чекман І. С. // Вісник Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця. – 2009. – № 2. – С. 188–201.
10. Наноматериалы и наноконкомпозиты в медицине, биологии, экологии / Под ред. А. П. Шпака, В. Ф. Чехуна; составители П. П. Гробик, В. В. Туров. – Киев : Наукова Думка, 2011. – 444 с.
11. Шука А. А. Наноэлектроника / А. А. Шука. – Москва : Физматкнига, 2007. – 464 с.
12. Мосин О. В. Физиологическое воздействие наночастиц серебра на организм человека / Мосин О. В. // NanoWeek. – 2008. – № 3. – С. 34–37.

13. Уварова І. В. Наноматеріали та їх використання у медичних виробках / І. В. Уварова, В. Б. Максименко, Т. М. Ярмола. – Київ : КІМ, 2013. – 172 с.
14. Чекман І. С. Основи наномедицини / І. С. Чекман, В. О. Маланчук, А. В. Рибачук. – Київ, Видавництво «Поліграф Плюс», 2012. – 247 с.
15. Фейнман Р. Внизу полным полно места: приглашение в новый мир физики / Р. Фейнман // Рос. хим. ж. – 2002. – Т. XLVI, № 5. – С. 406–409.
16. Мовчан Б. А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы для медицины / Мовчан Б. А. // Вісник фармакології і фармації. – 2007. – № 12. – С. 5–13.
17. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – Київ : Задруга, 2011. – 424 с.
18. Shaefer H. E. Nanoscience. The science of the small in physics, engineering, chemistry, biology and medicine / H. E. Shaefer. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. – 772 p.
19. 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.
20. Ульберг З. Р. Коллоидно-химические свойства биологических наносистем. Биомембраны / Ульберг З. Р., Грузина Т. Г., Перцев Н. В. // В книге «Коллоидно-химические основы нанонауки». – Киев : Академперіодика, 2005. – С. 199–237.
21. Мовчан Б. А. Электронно-лучевая гибридная нанотехнология осаждения неорганических материалов в вакууме / Мовчан Б. А. // Актуальные проблемы современного материаловедения. – Киев : Изд. Академперіодика, 2008. – Т. 1. – С. 227–247.
22. Jain K. K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice / Jain K. K. // Med. Princ. Pract. – 2008. – V. 17, № 2. – P. 89–101.
23. Liu Y. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising adventure for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles / Liu Y., Miyoshi H., Nakamura M. // Int. J. Cancer. – 2007. – V. 120, № 21. – P. 2527–2537.
24. Проблеми ісаользования нанотехнологии в фармакологии / Сейфула Р. Д., Тимофеев Ф. Б., Орджоникидзе З. Г. [и др.] // Эксперимент. и клин. фармакология. – 2008. – Т. 71, № 1. – С. 61–69.
25. Nanopharmacology / Ashai Z. A., Pukhta M. A., Abbas Z. [et al.] // JK-Practitioner. – 2012. – V. 17, № 1–3. – P. 83–85.
26. Nanopharmacy: inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds / Rivera G. P., Huhn D., del Mercato L. L. [et al.] // Pharmacol. Res. – 2010. – V. 62, № 2. – P. 115–125.
27. Varshney H. M. «Nanotechnology» current status in pharmaceutical science: a review / Varshney H. M., Shailender M. // Int. J. Ther. Appl. – 2012. – V. 6. – P. 14–24.
28. Москаленко В. Ф. Нанотоксикологія / Москаленко В. Ф., Яворовський О. П. // Вісник Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця. – 2011. – № 3. – С. 3–10.
29. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance / Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A. [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2007. – V. 150. – P. 552–558.
30. Pourmend A., Abdollahi M. Current opinion on nanotoxicology / Pourmend A., Abdollahi M. // Daru. – 2012. – V. 20, 1. – P. 1–3.
31. Кундієв Ю. І. Біоетика – шлях до більш майбутнього / Кундієв Ю. І. // Четвертий Національний конгрес з біоетики з міжнародною участю. – Київ, 2010. – С. 28–30.
32. Трахтенберг І. М. Етичні аспекти впровадження наноматеріалів / Трахтенберг І. М., Апихтіна О. Л., Дмитруха Н. М. // Четвертий Національний конгрес з біоетики з міжнародною участю. – Київ, 2010. – С. 81–82.
33. Сердюк А. М. Біоетичні проблеми в сучасній гігієні та медичній екології / Сердюк А. М. // Четвертий Національний конгрес з біоетики з міжнародною участю. – Київ, 2010. – С. 37.
34. Ніцак О. В. Ефективність суспензії нанодисперсного кремнезему при гепатиті, викликаному ізоіазилом / Ніцак О. В., Казак Л. І., Чекман І. С. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 1–3. – С. 66–69.
35. Хромов О. С. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом у медицині / Хромов О. С., Соловйов А. І. // Фармакологія і лікарська токсикологія. – 2008. – Т. 4, № 5. – С. 88–98.
36. Етична медицина в аспекті застосування високих технологій (огляд літератури та власних досліджень) / Маланчук В. О., Чекман І. С., Степаненко В. І., Рибачук А. В. // Український медичний часопис. – 2010. – № 6 (80). – С. 115–123.

І. С. Чекман

Науково-методичні основи викладання нанофармакології

У статті узагальнено досвід кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця щодо викладання нанофармакології студентам III курсу. Викладачі кафедри на лекціях та практичних заняттях висвітлюють досягнення вчених світу, України, Національного медичного університету в галузі нанонауки, наномедицини та нанофармакології. Студентів залучають до проведення досліджень з нанофармакології.

Ключові слова: нанонаука, нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія, викладання

И. С. Чекман

Научно-медицинские основы преподавания нанофармакологии

В статье обобщен опыт кафедры фармакологии и клинической фармакологии Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца по преподаванию нанофармакологии студентам III курса. Преподаватели кафедры на лекциях и практических занятиях освещают достижения ученых мира, Украины и Национального медицинского университета по нанонауке, наномедицине и нанофармакологии. Студенты приобщаются к проведению исследований по нанофармакологии.

Ключевые слова: нанонаука, нанотехнологии, наномедицина, нанофармакология, преподавание

I. S. Chekman

Scientific and medical basis in teaching nanopharmacology

An experience of Pharmacology and clinical pharmacology department of Bogomolets National Medical University concerning teaching in nanopharmacology to third course students has been summarized in the article. Teachers of the department during lectures and practical classes cover achievements in nanoscience, nanomedicine, and nanopharmacology made by famous scientists in Bogomolets National Medical University, Ukraine and worldwide. Students become familiar with carrying out studies in nanopharmacology.

Key words: nanoscience, nanotechnology, nanomedicine, nanopharmacology, teaching

Надійшла: 9 листопада 1915 р.

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

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко

Механизмы эндогенной нейтропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: эндогенная нейтропротекция, белки теплового шока, модуляторы тиол-дисульфидной системы, нарушение мозгового кровообращения

Значительная роль в системе антиоксидантной защиты и редокс-зависимой регуляции принадлежит восстановленному глутатиону (GSH) и глутатион-зависимым ферментам. За последнее десятилетие выявлены принципиально новые особенности участия глутатион-зависимых ферментов, глутаредоксина и самого глутатиона в процессах пролиферации, апоптоза, фолдинга белка, клеточного сигналинга. GSH является важным внутриклеточным антиоксидантом, играет особую роль в поддержании клеточного редокс-статуса за счет участия в тиол-дисульфидном обмене, что обеспечивает регуляцию целого ряда функций клетки, в том числе регуляцию генной экспрессии, активности отдельных ферментов и ферментных систем. Сохранение оптимального для клетки соотношения GSH/GSSG является существенным для ее жизнеспособности. Снижение уровня GSH ниже показателей нормы может служить индикатором нарушения клеточного редокс-статуса и изменения редокс-зависимой регуляции генов. Нарушение внутриклеточного баланса GSH наблюдается при ряде патологий, включая злокачественные новообразования. Следствием этого нарушения являются существенные изменения в механизме клеточного редокс-зависимого сигналинга, контролируемого как неферментативно, так и ферментативно при участии изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина [1].

Известно, что восстановленный глутатион является нейротрансмиттером и нейромодулятором (в микромолярных концентрациях является агонистом глутаматных рецепторов; в миллимолярных концентрациях модулирует SH-группы NMDA рецепторов). Окисленные формы глутатиона в концентрациях свыше 200 мкмоль/л снижают экспрессию генов раннего реагирования, а в концентрации 5 ммоль/л и более активирует р53-зависимый апоптоз и снижают уровень HSP [2]. Следует отметить, что возрастание внутриклеточного уровня цитотоксических форм NO и АФК, а также активация нейроапоптоза могут быть связаны с депривацией уровня белка теплового шока (HSP₇₀) [3]. Было показано, что в условиях *in vitro* HSP₇₀ способен предотвращать агрегацию окислительно поврежденных ферментов – цитратсинтазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы [4].

Кроме того, в последнее время появились данные о роли белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1 β при церебральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозирующего стресса, глутаматной эксайтотоксичности [5].

Ранее был изучен характер экспрессии белка теплового шока HSP₇₀ и белка HIF-1 в опытах *in vitro* при депривации системы глутатиона путем внесения в нейрональную среду токсических концентраций окисленного глутатиона [6].

Цель исследования – оценить роль белка теплового шока HSP₇₀ и фактора,

индуцированного гипоксией, HIF-1 в реализации механизмов эндогенной нейропротекции при острой церебральной ишемии и на фоне фармакологической модуляции тиол-дисульфидной системы.

Материалы и методы. Исследования проведены в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 ЕУ относительно экспериментов на животных. Опыты выполнены на белых беспородных крысах обоего пола массой 180–200 г, полученных из ЧП «Биомодельсервис». Экспериментальные животные были распределены на 6 групп: I – ложнооперированные животные, II – животные с экспериментальным нарушением мозгового кровообращения (НМК) (контроль), III – НМК + тиотриазолин («Артериум», Украина) в дозе 50 мг/кг, IV – НМК + ангиолин («Фарматрон», Украина) в дозе 50 мг/кг, V – НМК + тиоцетам (АО «Галичфарм», Украина) в дозе 250 мг/кг, VI – НМК + липоевая кислота («Марбиофарм», Россия) в дозе 50 мг/кг. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой двухсторонней окклюзией общих сонных артерий. Процедуру выполняли под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг), путем хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них шелковые лигатуры и перевязывали. Учитывая высокую смертность при данной модельной патологии, использовали такое количество животных, чтобы каждая экспериментальная группа состояла из 10 особей. Препараты вводили внутривентриально в указанных дозах 1 раз в сутки на протяжении 18 суток наблюдения, начиная с момента выхода животных из наркоза. Животным I та II групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутривентриально вводили физиологический раствор. Из эксперимента животных выводили под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) [7].

Для биохимических исследований использованы участки головного мозга, находящиеся в области сенсо-моторной зоны коры, которые гомогенизировали в жидком азоте. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования (15 000 г)

при температуре + 4 °С. Содержание окисленного и восстановленного глутатиона определяли флуориметрически [8]. Активность глутатионпероксидазы оценивали спектрофотометрически [9].

Концентрацию HSP₇₀ и HIF-1 определяли методом иммуноблот-анализа. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану при напряжении 100 V и силе тока 0,35 A в течение 1 ч. После переноса мембрану помещали в блокирующий буфер, содержащий 1 % раствор бычьего сывороточного альбумина (SIGMA, USA) на 20 часов. Отмытую в растворе 0,1 моль/л фосфатного буфера мембрану помещали в раствор первичных антител против HSP₇₀ и HIF-1 α (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После проводили повторное промывание в 0,1 моль/л фосфатном буфере, помещали мембрану в раствор вторичных антител (1:1000) (биотинилированный антимышиный IgG, SIGMA, USA) и инкубировали 2 ч. Для визуализации мембрану обрабатывали раствором 3-амино-9-этилкарбазола (АЭК): 1 таблетка (Sigma, USA), растворенная в 2,5 мл ДМФА, содержащем 47,5 мл 0,05 моль/л ацетатного буфера, pH 5,0, 25 мкл 30 % H₂O₂. Инкубировали мембрану в субстратной смеси 5–10 мин. Красный нерастворимый преципитат характеризует комплекс антиген-антитело. Промывали мембрану в дистиллированной воде несколько раз. Высушивали полоски между листами фильтровальной бумаги в потоке холодного воздуха. Детекцию HSP₇₀ и HIF-1 осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$). Результаты исследования обработаны с использованием статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «Microsoft Excel 2010». Статистическую обработку проводили с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия

Манна-Уитни. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия с уровнем значимости менее 0,05 (95 %) [10].

Результаты и их обсуждение. Моделирование нарушения мозгового кровообращения (НМК) путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий вызывало активацию транскрипции генов, кодирующих белок теплового шока HSP₇₀ и белок HIF-1, на что указывает повышение уровня соответствующих белков в исследуемой ткани мозга. Уже на 1 сут НМК наблюдали параллельное увеличение содержания HSP и HIF-белков в 2,16 и 2,13 раза соответственно относительно показателей ложнооперированных животных (таблица). Это связано, по нашему мнению, с их шаперонной активностью в условиях развивающегося оксидативного стресса, направленной на интенсификацию резервно-адаптационных возможностей в острый период ишемии. Содержание изучаемых белков в более поздние сроки ишемии (18 сут) связано, по-видимому, с развитием оксидативного и нитрозирующего стрессов и срывом компенсаторных возможностей организма. Кроме того, под действием избытка АФК окислительной модификации подвергаются сами HSP₇₀ белки, снижается экспрессионная активность генов, кодирующих синтез последних. Это нарушает функциональную активность HSP-белков, ограничивает их протекторные свойства в условиях ишемии, в частности шаперонную активность в отношении HIF-белков.

Применение животным модуляторов тиол-дисульфидной системы оказывало позитивный эффект на концентрацию HSP и HIF-белков, начиная с 1 суток ишемии. Способность препаратов в условиях ишемии повышать содержание в тканях головного мозга HSP₇₀-белков приводило и к достоверному увеличению концентрации HIF-белков. Наиболее активными в этом отношении были ангиолин и тиотриазолин. Применение ангиолина способствовало активации экспрессии HSP₇₀ на 16,8% через 24 ч после моделирования патологии, а на 4 сут и 18 сут – на 24,4 % и на 52,9 % соответственно (таблица).

Моделирование НМК у крыс приводило и к нарушению тиол-дисульфидного равновесия, что проявлялось уменьшением пула восстановленной формы глутатиона (таблица). Так, в данных условиях отмечается снижение содержания GSH, начиная с 1 сут наблюдения на 19,4 %, а на 4 и 18 сут его уровень снижался в 5,8 и 8,4 раза соответственно по сравнению с показателем ложнооперированных животных. Параллельно регистрировали значительное увеличение содержания окисленной формы – уже через 24 ч после окклюзии сонных артерий содержание дисульфида глутатиона составляло 0,29 мкмоль/г белка, что в 2,2 раза больше показателя группы ложнооперированных животных. Накопление окисленных интермедиатов вызывает формирование окислительного и нитрозативного стресса в тканях мозга. Известен еще один механизм негативного влияния высоких концентраций окисленной формы глутатиона – прямое ингибирование экспрессии белка HSP₇₀ [11]. Анализ полученных результатов подтверждает представление о том, что ишемическое повреждение нейронов сопровождается изменениями функционального состояния компонентов белков теплового шока и связанной с их функцией глутатионовой редокс-системы, необходимой не только для антиоксидантной защиты, но и для фолдинга белковых молекул [12].

Изложенные данные подтверждают визуальными 3D-диаграммами, на которых изображена взаимосвязь между уровнем белка HSP₇₀, активностью ГПО и содержанием восстановленного глутатиона (рис. 1, рис. 2). Из представленных диаграмм видно, что у ложнооперированных животных сформирована тесная однонаправленная взаимосвязь между содержанием восстановленной формы глутатиона, активностью ГПО и уровнем HSP₇₀ (рис. 1). Однако в восстановительном периоде (на 18 сут) значительное снижение GSH и ГПО сопровождалось небольшим повышением HSP₇₀. Последнее дает возможность предположить наличие разнонаправленной взаимосвязи между изучаемыми показателями (рис. 2).

Содержание белков HSP₇₀ и HIF-1 α , уровень глутатиона и активность глутатионпероксидазы в ткани головного мозга крыс в разные сроки нарушения мозгового кровообращения на фоне терапии модуляторами тиол-дисульфидной системы, $M \pm t$

Экспериментальная группа животных	HSP ₇₀ , у. е./г белка	HIF-1 α , у. е./г белка	Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка	Глутатион окисленный, мкмоль/г белка	Активность глутатион-перок- сидазы, мкмоль/ (мг белка · мин)
Ложнооперированные	15,20 $\pm$ 1,35	17,90 $\pm$ 1,29	3,60 $\pm$ 0,17	0,13 $\pm$ 0,06	72,50 $\pm$ 3,16
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки	32,80 $\pm$ 2,64*	38,20 $\pm$ 2,17*	2,90 $\pm$ 0,21*	0,29 $\pm$ 0,09	24,50 $\pm$ 3,14*
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + тиоцетам	35,40 $\pm$ 2,47	33,50 $\pm$ 2,34	3,10 $\pm$ 0,35	0,22 $\pm$ 0,08	45,60 $\pm$ 3,92**
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + ангиолин	38,30 $\pm$ 1,84	34,80 $\pm$ 2,18	3,30 $\pm$ 0,28	0,19 $\pm$ 0,07	48,60 $\pm$ 2,84**
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки+ липоевая кислота	33,20 $\pm$ 2,32	30,30 $\pm$ 2,43**	2,90 $\pm$ 0,37	0,28 $\pm$ 0,09	38,10 $\pm$ 3,36
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + тиотриазолин	34,70 $\pm$ 2,51	31,50 $\pm$ 2,42	3,00 $\pm$ 0,26	0,21 $\pm$ 0,07	41,50 $\pm$ 3,09**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки	27,40 $\pm$ 1,84*	35,40 $\pm$ 2,39*	0,62 $\pm$ 0,08*	1,68 $\pm$ 0,11*	15,30 $\pm$ 2,68*
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + тиоцетам	31,30 $\pm$ 2,11	29,70 $\pm$ 2,04	1,84 $\pm$ 0,22**	0,82 $\pm$ 0,05**	37,50 $\pm$ 2,63**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + ангиолин	34,10 $\pm$ 2,25**	31,20 $\pm$ 2,16	2,08 $\pm$ 0,34**	0,71 $\pm$ 0,07**	40,20 $\pm$ 1,36**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + липоевая кислота	28,60 $\pm$ 2,58	27,70 $\pm$ 2,55	1,69 $\pm$ 0,41	0,88 $\pm$ 0,11**	27,70 $\pm$ 2,02**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + тиотриазолин	30,50 $\pm$ 2,63	28,40 $\pm$ 2,33	1,93 $\pm$ 0,21**	0,76 $\pm$ 0,08**	35,90 $\pm$ 2,87**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки	18,50 $\pm$ 1,22	19,60 $\pm$ 1,43	0,43 $\pm$ 0,11*	2,74 $\pm$ 0,14*	21,50 $\pm$ 1,69**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + тиоцетам	26,90 $\pm$ 1,47**	27,40 $\pm$ 2,08**	1,72 $\pm$ 0,19**	0,83 $\pm$ 0,09**	42,60 $\pm$ 2,24**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + ангиолин	28,3 $\pm$ 1,39**	30,70 $\pm$ 2,16**	2,12 $\pm$ 0,20**	0,62 $\pm$ 0,05**	51,20 $\pm$ 1,93**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + липоевая кислота	24,80 $\pm$ 1,74**	26,90 $\pm$ 2,58	1,55 $\pm$ 0,24**	0,94 $\pm$ 0,07**	31,70 $\pm$ 2,19**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + тиотриазолин	26,40 $\pm$ 1,33**	28,10 $\pm$ 1,94**	1,89 $\pm$ 0,18**	0,77 $\pm$ 0,08**	41,80 $\pm$ 2,08**

Примечания: * $p \leq 0,05$ по отношению к показателю ложнооперированных животных;

** $p \leq 0,05$ по отношению к показателю животных с НМК.

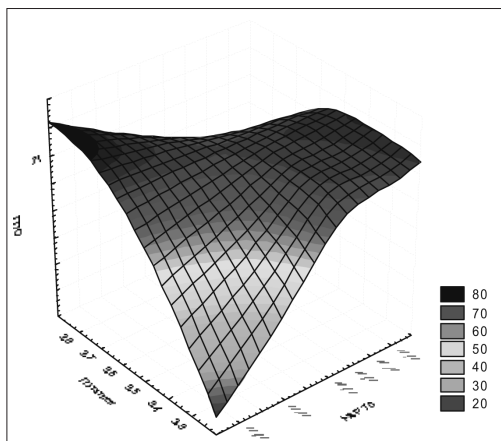


Рис. 1. Сопряженность уровня белка HSP₇₀, активности глутатионпероксидазы с концентрацией восстановленного глутатиона у ложнооперированных животных

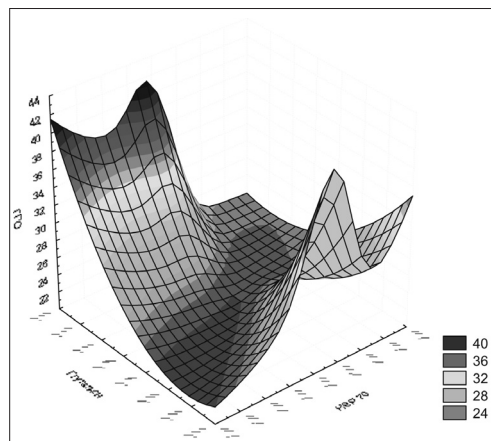


Рис. 2. Сопряженность уровня белка HSP₇₀, активности глутатионпероксидазы с содержанием восстановленного глутатиона у животных с НМК на 18 сутки наблюдения

Проведенные нами раннее исследования показывают способность модуляторов тиол-дисульфидной системы повышать биодоступность оксида азота и ограничивать токсическое действие его активных дериватов на нейроны в условиях ишемии [13]. К настоящему времени доказано, что оксид азота активирует синтез белков-шаперонов. NO-зависимая активация HSP₇₀ может составлять важный эндогенный механизм защиты клеток при ишемии. Возможен и другой механизм – белки теплового шока могут подавлять гиперэкспрессию индуцибельной NOS за счет снижения активации фактора транскрипции iNOS (NFκB), что приводит к ограничению нитрозирующего стресса и нейроапоптоза [14]. Значение этих влияний

состоит в ограничении гиперпродукции оксида азота и его цитотоксического действия.

Выводы

Впервые выявлена взаимосвязь экспрессии белков-шаперонов молекулярной массы 70 кДа с нарушениями функционирования глутатионного звена тиол-дисульфидной системы. Введение животным модуляторов тиол-дисульфидной системы вызывало прямое повышение восстановленной формы глутатиона и опосредованно приводило к активации экспрессии белка HSP₇₀, который в свою очередь пролонгирует действие HIF-1. Выявленный механизм может быть одним из проявлений нейропротективного действия изучаемых препаратов.

1. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. наук. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
2. Przybytkowski E. Correlation between glutathione and stimulation of the pentose phosphate cycle in situ in Chinese hamster ovary cells exposed to hydrogen peroxide / E. Przybytkowski, D. A. Averill-Bates // Arch Biochem Biophys. – 1996. – № 325. – P. 91–98.
3. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорна [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
4. Belenichev I. F. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction / I. F. Belenichev, Yu. M. Kolesnik, N. V. Bukhtiyarova // Neurochem. Journal. – 2011. – V. 5, № 4. – P. 251–256.
5. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by *in vitro* ischemia through deteriorating cellular redox environment / G. Shuhong, M. Minoru, J. L. Ke, S. Honglian // J. Neurochem. – 2009. – V. 108 (5). – P. 1309–1321.
6. Горбачева С. В., Беленичев И. Ф. Антиоксидантная модуляция нейроапоптоза в условиях дисбаланса тиол-дисульфидной системы и накоплении окисленных промежуточных соединений *in vitro* / Горбачева С. В., Беленичев И. Ф. // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – № 3 – С. 124–129.

7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 527 с.
8. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – Киев : ГФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
9. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – Москва : Наука, 1969. – 739 с.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : Медиасфера, 2002. – 312 с.
11. Функциональное состояние компонентов белков теплового шока, глутатионредуктазы и глутатионовой редокс-системы при нагревании и охлаждении / С. О. Тапбергенов, Р. Б. Бекбо-сынова, Б. С. Советов, С. М. Болысбекова // Успехи соврем. естествознания. – 2015. – № 1. – С. 781–784.
12. Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии. / Э. Г. Горожанская, В. Б. Ларионова, Г. Н. Зубрихина // Российский онкологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 29–32.
13. Gorbacheva S. V. The Thiol–Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow / Gorbacheva S. V., Belenichev I. F. // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 24–27.
14. Garcia-Nogales P. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection / P. Garcia-Nogales, A. Almeida, J. P. Bolanos // J. Biol Chem. – 2003. – № 278. – P. 864–874.

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко

Механизмы эндогенной нейропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения

Цель исследования – оценить роль белка теплового шока HSP₇₀ и фактора, индуцированного гипоксией, HIF-1 в реализации механизмов эндогенной нейропротекции при острой церебральной ишемии и фармакологической модуляции тиол-дисульфидной системы.

Нарушение мозгового кровообращения (НМК) моделировали на крысах путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий. В тканях головного мозга на 1, 4 и 18 сут определяли уровень белка теплового шока HSP₇₀ и белка HIF-1 методом иммуноблотинга. Параллельно изучали состояние системы глутатиона. В ранние сроки наблюдения выявлена активация транскрипции генов, кодирующих белки HSP₇₀ и HIF-1, что связано с их шаперонной активностью. Восстановительный период ишемии характеризовался снижением уровня исследуемых белков и нарушением тиол-дисульфидного равновесия, что связано с развитием оксидативного стресса и срывом компенсаторных возможностей организма. В данных условиях отмечали уменьшение уровня восстановленной формы глутатиона, начиная с 1 сут наблюдения – на 19,4 %, а на 4 и 18 сут уровень этого показателя снижался в 5,8 и 8,4 раза соответственно по сравнению с показателем ложнооперированных животных.

Параллельно регистрировали значительное увеличение окисленной формы, уже через 24 ч после окклюзии сонных артерий содержание дисульфида глутатиона было в 2,2 раза больше показателя группы псевдооперированных животных. Введение модуляторов тиол-дисульфидной системы вызывало прямое повышение восстановленной формы глутатиона и косвенно приводило к активации экспрессии белка HSP₇₀, который, в свою очередь, продлевал действие HIF-1. Наиболее активными в этом отношении были Ангиолин и Тиотриазолин. Применение Ангиолина способствовало активации экспрессии HSP₇₀ на 16,8 % через 24 ч после моделирования патологии, а на 4 сут и 18 сут – на 24,4 % и на 52,9 % соответственно по сравнению с показателем при НМК.

В ходе проведенных исследований впервые выявлена взаимосвязь экспрессии белков теплового шока с нарушениями функционирования глутатионного звена тиол-дисульфидной системы. Обнаруженный механизм может быть одним из проявлений нейропротективного действия исследуемых препаратов.

Ключевые слова: эндогенная нейропротекция, белки теплового шока, модуляторы тиол-дисульфидной системы, нарушение мозгового кровообращения

С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, Л. І. Кучеренко

Механізми ендогенної нейропротекції при застосуванні модуляторів тиол-дисульфідної системи за умов експериментального порушення мозкового кровообігу

Мета дослідження – оцінити роль білка теплового шоку HSP₇₀ і фактора, індукованого гіпоксією, HIF-1 у реалізації механізмів ендогенної нейропротекції за гострої церебральної ішемії та на тлі фармакологічної модуляції тиол-дисульфідної системи. Порушення мозкового кровообігу (ПМК) моделювали на щурах шляхом білатеральної оклюзії загальних сонних артерій. У тканинах головного мозку на 1, 4 і 18 добу визначали рівень білка теплового шоку HSP₇₀ і білка HIF-1 методом

імуноблотингу. Паралельно вивчали стан системи глутатіону. У ранній термін спостереження виявлено активацію транскрипції генів, які кодують білки HSP₇₀ і HIF-1, що пов'язано з їхньою шаперонною активністю. Відновлювальний період ішемії характеризувався зниженням рівня досліджуваних білків і порушенням тіол-дисульфідної рівноваги, що пов'язано з розвитком оксидативного стресу і зривом компенсаторних можливостей організму. За даних умов відзначали падіння рівня відновленої форми глутатіону, починаючи з 1 доби спостереження – на 19,4 %, а на 4 і 18 добу рівень цього показника знижувався в 5,8 і 8,4 рази відповідно порівняно з показником несправжньооперованих тварин. Паралельно реєстрували значне збільшення окисненої форми – вже через 24 год після оклюзії сонних артерій уміст дисульфиду глутатіону був у 2,2 рази більшим, ніж показник групи несправжньооперованих тварин. Введення модуляторів тіол-дисульфідної системи викликало пряме підвищення відновленої форми глутатіону й опосередковано призводило до активації експресії білка HSP₇₀, який, у свою чергу, пролонгував дію HIF-1. Найактивнішими в цьому відношенні були Ангіолін і Тіотриазолін. Застосування Ангіоліну сприяло активації експресії HSP₇₀ на 16,8 % через 24 год після моделювання патології, а на 4 добу і 18 добу – на 24,4 % і на 52,9 % відповідно порівняно з показником за умов ПМК.

У ході проведених досліджень уперше виявлено взаємозв'язок експресії білків теплового шоку з порушеннями функціонування глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи. Виявлений механізм може бути одним з проявів нейропротективної дії досліджуваних препаратів.

Ключові слова: ендогенна нейропротекція, білки теплового шоку, модулятори тіол-дисульфідної системи, порушення мозкового кровообігу

S. V. Gorbacheva, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko

Mechanisms of endogenous neuroprotection when using thiol-disulfide system modulators under experimental impairment of cerebral circulation

The aim of this work was to estimate a role of heat shock protein HSP₇₀ and hypoxia-inducible factor (HIF-1) in realization of endogenous neuroprotection mechanisms under acute cerebral ischemia and pharmacological modulation of thiol-disulfide system.

Cerebral circulation impairment was modeled on rats by bilateral occlusion of common carotid arteries. The levels of heat shock protein HSP₇₀ and protein HIF-1 were determined in cerebral tissues on the 1, 4 and 18 days of post occlusion period using an immunoblotting method. At the same time it was studied a state of glutathione system. An activation of transcription of genes which code proteins such as HSP₇₀ and HIF-1 was detected at early stages of observation that was corresponded to their chaperone activity. Recovery period of ischemia was characterized by the reduction of investigated proteins level and disturbance of thiol-disulfide balance that was connected with the development of oxidative stress and derangement of compensatory capabilities of an organism. In the given conditions it was observed a drop of reduced glutathione level on 19,4 % starting from the 1 day of observation. On the 4 and 18 days the level of this factor was reduced in 5,8 and 8,4 times correspondingly. At the same time it was recorded a significant increase of oxidized form. In 24 h glutathione disulfide content were in 2,2 times more than this parameter in the group of false-operated animals. The introduction of thiol-disulfide system modulators caused direct increase of reduced glutathione form and indirectly caused an activation of protein HSP₇₀ expression that prolonged HIF-1 action. Angioline and thiotriazoline were the most active in this case. Angioline usage promoted an activation of HSP₇₀ expression by 16,8 % on 24 h after pathology modeling and on the 4 and 18 days – by 24,4 % and 52,9 % correspondingly.

It was obtained a new data of interconnection between the expression of heat shock proteins and impairments of glutathione link of thiol disulfide system functioning. This mechanism could be involved in neuroprotective action of the investigated drugs.

Key words: endogenous neuroprotection, heat shock proteins, thiol-disulfide system modulators, cerebral circulation impairments

Поступила: 24 ноября 2015 г.

Контактное лицо: Горбачова Светлана Васильевна, кандидат биологических наук, доцент, кафедра биохимии и лабораторной диагностики, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Электронная почта: swg18@yandex.ua

С. Г. Носач, И. Ф. Беленичев, Е. В. Александрова,
С. В. Левич, В. П. Рыженко

Антиоксидантный механизм нейропротективного действия производного 3-метилксантина (соединения С-3) в условиях внутримозгового кровоизлияния

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: геморрагический инсульт, нейропротекция, 3-метилксантин

Последнее десятилетие прошедшего столетия ознаменовалось открытиями в области нейрофизиологии, биохимии, молекулярной биологии и иммунологии, расширивших представление об общепатологической роли активных форм кислорода (АФК). Исследования, проведенные в 60-80-х годах XX столетия, показали, что патогенез наиболее распространенных заболеваний человека (патология сердечно-сосудистой и эндокринной систем, дыхания, злокачественные образования) имеет четко выраженную свободно-радикальную фазу. При этом было установлено, что АФК, выступая в роли инициаторов свободно-радикального окисления, вызывают окислительную модификацию липидов, белков, нуклеиновых кислот и в дальнейшем приводят к гибели клетки. При остром нарушении мозгового кровообращения по типу геморрагического инсульта происходит торможение дыхательной цепи митохондрий, энергетического обмена, ионного гомеостаза клетки с повышенным содержанием ионов кальция, развитие глутаматной «эксайтотоксичности», инициируется нитрозирующий и оксидативный стресс, развивается нейроапоптоз и гибель клеток [1–3].

В настоящее время активно проводится поиск новых нейропротекторов с антиоксидантным механизмом действия среди скавенджеров активных форм кислорода, NO и свободных радикалов жирных кислот, ингибиторов индуцибельной синтазы NO, модулято-

ров тиол-дисульфидной системы, реактиваторов антиоксидантных ферментов, эндогенных антиоксидантов (глутатиона, α -токоферола, мелатонина, карнозина, белков теплового шока 70) [4–11].

В качестве антиоксидантов-нейропротекторов в поэтапной нейропротективной терапии геморрагического инсульта и черепно-мозговой травмы применение нашли мексидол, эмоксипин, ацетилцистеин, мелатонин, селеназа, глутатион [5, 6, 12]. Особого внимания исследователей заслуживают производные 3-метилксантина. В предыдущих исследованиях *in vitro* и *in vivo* нами было отобрано соединение С-3 (гидразид 1,3-диметил-8-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты), проявляющее высокую антиоксидантную активность и нейропротективное действие при моделировании острой церебральной ишемии [13–15]. Однако механизм нейропротективного действия этого соединения до конца не ясен.

Цель исследования – изучение нейропротективной активности соединения С-3 в сравнении с пирацетамом и антиоксидантом-нейропротектором – мексидолом при моделировании внутримозгового кровоизлияния (ВК).

Материалы и методы. Объекты исследования. В качестве объектов испытания были использованы 90 белых беспородных крыс обоего пола, массой 140–160 г. Животных содержали на стандартном рационе питания вивария.

Эксперимент проводили в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU.

Модель исследований. ВК моделировали путем введения 0,1 мл аутокрови,

взятой из хвостовой вены, на 100 г веса животного в область внутренней капсулы и стриопаллидарных ядер головного мозга [16]. Операцию выполняли под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг) с использованием стереотаксической техники. Соединение С-3 вводили перорально в виде суспензии, стабилизированной Твином-80, сразу после выхода животных из наркоза 1 раз в 1 сут на протяжении всего срока наблюдения (4 и 18 сут) в дозе 100 мг/кг. Препараты сравнения животным вводили по аналогичной схеме в следующих дозах: мексидол – 100 мг/кг, пирацетам – 500 мг/кг. Часть животных выводили из эксперимента на 4, а часть на 18 сут под тиопентал-натриевым наркозом.

Исследования неврологического дефицита. Каждый день определяли выраженность неврологического дефицита по шкале McGrow [17]. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов – легкая степень, от 3 до 7 баллов – средняя степень и от 7 баллов и выше – тяжелая степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, маневренные движения, птоз, положение на боку, подвижность, также как проявление неврологического дефицита оценивали длительность удерживания крыс на вращающемся стержне (диаметром 15 см) со скоростью вращения 3 об/мин. Животных тестировали ежедневно, выставя сумму баллов.

Биохимические исследования. На 4 сут эксперимента часть животных выводили из эксперимента под этиминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) путем декапитации. Мозг быстро извлекали, удаляли кровь, отделяли от мозговой оболочки и исследуемые кусочки помещали в жидкий азот. Затем их измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при 2 °С, содержащей (в ммольях): сахаразы – 250, трис-НСl-буфера – 20, ЭДТА – 1 (рН 7,4) [16].

В цитозоле биохимическими методами определяли содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) по уровню альдегидных (АФГ) и

карбоксильных (КФГ) продуктов в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [18]. Состояние антиоксидантной системы определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПР) в ткани мозга [19]. Активность NO-синтазы определяли по скорости убывания количества НАДФН⁺, содержание нитратов определяли по реакции Грисса [20]. Нитротирозин определяли в цитозольной фракции твердофазным иммуносорбентным сэндвич-методом ELISA (ELISA Kit Cat. № НК 501-02 фирмы Hycult Biotech) и выражали в нмоль/г ткани [20].

Статистический анализ. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни) [21].

Результаты и их обсуждение. ВК вызывало неврологические изменения у животных: параличи, парезы, птоз с максимальным проявлением на 4 сут. В этот срок наблюдения в группе контрольных животных средний балл по шкале С.Р. McGrow составлял 16,5 балла, что соответствует тяжелой степени неврологической симптоматики (табл. 1). На 4 сут в контрольной группе выжило 50 % животных. Введение крысам с ВК соединения С-3, мексидола и пирацетама оказывало разный по силе нейропротективный эффект. У животных, получавших пирацетам, проявлялся тяжелый неврологический дефицит на 4 сут наблюдения (16,7 балла). В группе животных, которые получали пирацетам, выжило 60 %. Соединение С-3 и мексидол ослабляли развитие неврологического дефицита, ускоряли восстановление неврологического статуса и снижали гибель животных с ВК, что свидетельствует об их нейропротективном эффекте. На этом фоне значительно выделялось соединение С-3, которое в 4 раза снижало выраженность неврологической симптоматики на 4 сут эксперимента и

Таблица 1

Показатели неврологического дефицита и выживаемость животных в различные сроки после внутримозгового кровоизлияния и применения соединения С-3, пирацетама и мексидола, $M \pm m$

Группа животных	Неврологический дефицит, средний балл по шкале С. Р. McGrow		Количество животных, выживших на 18 сутки, %
	4 сутки	18 сутки	
Интактные (n = 10)	0 ± 0	0 ± 0	100
Внутримозговое кровоизлияние (контроль) (n = 5)	16,50 ± 1,22	3,15 ± 0,25	50
Внутримозговое кровоизлияние + соединение С-3 (n = 10)	4,12 ± 0,51* ⁰ #	1,00 ± 0,10*	100* ⁰
Внутримозговое кровоизлияние + пирацетам (n = 6)	16,70 ± 2,32	2,75 ± 0,11	60
Внутримозговое кровоизлияние + мексидол (n = 9)	5,10 ± 0,71*	1,75 ± 0,10*	90*

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * $p < 0,05$ по отношению к контролю; ⁰ $p < 0,05$ по отношению к пирацетаму; # $p < 0,05$ по отношению к мексидолу.

уменьшало летальность на 50 % по сравнению с группой нелеченных животных. По этим показателям соединение С-3 превосходило пирацетам и мексидол (табл. 1).

На 18 сут экспериментального ВК у животных контрольной группы проявлялись неврологические нарушения легкой степени тяжести. Применение соединения С-3 приводило к снижению неврологической симптоматики в 3,15 раза по шкале С. Р. McGrow, по этим показателям соединение С-3 на 1,75 балла превосходило пирацетам, и было сопоставимо с эффектом мексидола. Таким образом, соединение С-3 было наиболее эффективным в острый период ВК, что выгодно отличает его от пирацетама и мексидола.

ВК также приводит к увеличению активности синтазы монооксида азота, повышению уровня стабильных метаболитов NO• – нитритов. Повышение уровня монооксида азота и его цитотоксических дериватов в мозговой ткани в условиях ишемии приводит к развитию нитрозирующего стресса, а также к потере нейроном функциональной активности и инициации апоптоза или некроза [3]. Так, нами было зафиксировано значительное повышение уровня маркера нитрозирующего стресса – нитротрозина в цитозоле головного

мозга крыс с ВК на 4 сут эксперимента (табл. 2).

Также, нами были получены данные, свидетельствовавшие о том, что в головном мозге животных с ВК на 4 сут после операции увеличивалось содержание продуктов ОМБ – АФГ и КФГ (табл. 3). Вводимые препараты и соединения С-3 оказывали ингибирующее действие в отношении различных звеньев оксидативного стресса. Наиболее эффективным среди них оказалось соединение С-3, которое по силе антиоксидантного действия превосходило мексидол и пирацетам. Введение соединения С-3 приводило к уменьшению продуктов ОМБ в мозге животных – АФГ на 59 % и КФГ на 63 % (табл. 3). Введение пирацетама не оказывало достоверного влияния на изучаемые показатели оксидативного стресса и активности антиоксидантных ферментов в головном мозге крыс с ВК. Значительное антиоксидантное действие в условиях ВК оказывал мексидол. Подобное действие мексидола не противоречит полученным ранее данным [22].

Антиоксидантное действие соединения С-3 также ярко проявлялось в отношении активности ГПР. Так, введение соединения С-3 приводило к увеличению активности ГПР на 4 сут эксперимента по сравнению с группой

Таблица 2

Содержание стабильных метаболитов оксида азота и активность NO-синтазы в мозге крыс на 4 сутки после внутримозгового кровоизлияния и применения соединения С-3, пирацетама и мексидола, $M \pm m$

Группа животных	NO_2^- , мкмоль/г белка	Активность NO-синтазы, нмоль/ г ткани · мин	Нитротирозин, нмоль/г белка
Интактные (n = 10)	$4,70 \pm 0,37$	$2,77 \pm 0,21$	$21,30 \pm 1,34$
Внутримозговое кровоизлияние (контроль) (n = 5)	$12,00 \pm 0,71$	$6,45 \pm 0,37$	$112,30 \pm 7,21$
Внутримозговое кровоизлияние + соединение С-3 (n = 10)	$6,70 \pm 0,41^{* \#0}$	$3,38 \pm 0,14^{* \#0}$	$54,90 \pm 4,20^{* \#0}$
Внутримозговое кровоизлияние + пирацетам (n = 6)	$14,10 \pm 1,00$	$6,40 \pm 0,52$	$100,40 \pm 8,23$
Внутримозговое кровоизлияние + мексидол (n = 9)	$9,00 \pm 0,47^*$	$5,13 \pm 0,45^*$	$78,7 \pm 5,65^*$

контроля на 82,3 %. Введение мексидола повышало активность ГПР на 51 %. Применение пирацетама не оказывало достоверного влияния на активность ГПР (табл. 4). Мексидол проявлял более умеренный антиоксидантный эффект по сравнению с соединением С-3 на модели ВК. По всей видимости, это связано с тем, что мексидол выступает только в одной роли – роли скавенжера первичных и гидроксильных радикалов пептидов [5, 6]. Соединение С-3 кроме этого является мощным реактиватором антиоксидантных ферментов, особенно третьего эшелона защиты

клетки от оксидативного стресса – ГПР. Введение С-3 приводило к увеличению активности каталазы на 100 % и СОД на 95,6 % в головном мозге животных с ВК на 4 сут эксперимента.

По степени влияния на активность ГПР, каталазы и СОД соединение С-3 достоверно превосходит действие как мексидола, так и пирацетама.

В исследовании было установлено, что антиоксидантное действие соединения С-3 реализуется посредством протективного действия в отношении ГПР и обеспечения ее высокой активности в условиях оксидативного и нитрозирующего

Таблица 3

Показатели окислительной модификации белков в мозге крыс на 4 сутки после моделирования внутримозгового кровоизлияния и применения соединения С-3, пирацетама и мексидола, $M \pm m$

Группа животных	Продукты окислительной модификации белков, у. е./г белка	
	альдегидные (270 нм)	карбоксильные (363 нм)
Интактные (n = 10)	$0,77 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,01$
Внутримозговое кровоизлияние (контроль) (n = 5)	$2,12 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,07$
Внутримозговое кровоизлияние + С-3 (n = 10)	$0,87 \pm 0,07^{* \#0}$	$0,31 \pm 0,02^{* \#0}$
Внутримозговое кровоизлияние + пирацетам (n = 6)	$1,87 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,05$
Внутримозговое кровоизлияние + мексидол (n = 9)	$1,07 \pm 0,06^*$	$0,52 \pm 0,03^*$

Активность ферментов антиоксидантной системы в мозге крыс на 4 сутки после моделирования внутримозгового кровоизлияния и применения соединения С-3, пирацетама и мексидола, $M \pm m$

Группа животных	СОД, у. е./ мг белка · мин	Каталаза, мкат/мг белка	ГПР, мкмоль/мг белка · мин
Интактные (n = 10)	292,7 ± 12,6	7,45 ± 0,43	77,50 ± 4,70
Внутримозговое кровоизлияние (контроль) (n = 5)	123,6 ± 7,2	3,57 ± 0,23	44,70 ± 2,74
Внутримозговое кровоизлияние + соединение С-3 (n = 10)	241,8 ± 12,1*#0	6,37 ± 0,41*0	81,50 ± 4,52*#0
Внутримозговое кровоизлияние + пирацетам (n = 6)	137,8 ± 12,1	3,67 ± 0,37	41,80 ± 5,23
Внутримозговое кровоизлияние + мексидол (n = 9)	191,5 ± 9,71*	5,87 ± 0,21*	67,50 ± 1,21*

щего стресса. По всей видимости, этот механизм связан со снижением АФК-повреждающего действия Se-зависимого активного центра фермента. В пользу этой гипотезы свидетельствует установленный факт снижения на 4 сутки эксперимента активности синтазы оксида азота на 47,6 %, уменьшение стабильных метаболитов NO[•] - нитритов на 44,2 % и, самое важное – снижение нитротирозина на 51,1 % в головном мозге животных с ВК, получавших соединение С-3 (табл. 2). Пирацетам не оказывал влияния на показатели нитрозирующего стресса. Мексидол достоверно снижал активность синтазы оксида азота на 20,4 % и концентрацию нитротирозина на 30,0 % в цитозоле головного мозга, что не противоречит результатам предыдущих работ [22]. Известно, что значительные количества NO, наблюдаемые в постишемический период, могут взаимодействовать с гемовым железом и парными тиольными группами, образуя динитрозольный комплекс железа (DNIC). DNIC в отличие от NO, является более сильным нитрозирующим агентом, взаимодействует с тиолами белков, гистидином, аспартатом, глутамином, метионином, цистеином, глутатионом, образуя N- и S-нитрозотиолы [20]. Ранее было установлено [23], что DNIC значительно подавляет активность СОД, а также активность ферментов, регулирующих тиол-дисульфидное

равновесие в клетке – глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы в суспензии нейронов.

По нашему мнению, механизм угнетения соединением С-3 реакций нитрозирующего стресса связан с особенностями его химической структуры, что позволяет сделать предположение о том, что исследуемое соединение при взаимодействии с NO-радикалом играет роль «спиновой ловушки». В качестве доказательства данной гипотезы были проведены расчеты квантово-механических энергетических дескрипторов граничных молекулярных орбиталей: энергия высшей занятой молекулярной орбитали ($E_{ВЗМО}$) и энергия низшей вакантной молекулярной орбитали ($E_{НВМО}$) в программном комплексе WinMopac (ver 7.2, дескрипторы – HOMOEnergy, LUMOEnergy, полуэмпирический метод AM1, с настройками: Calculation = SinglePoint, WaveFunction = ClosedShell (RHF)). Также были рассчитаны такие характеристики, как величина энергетической щели (разница энергий ВЗМО и НВМО); абсолютная жесткость – по формуле: $\eta = -(E_{ВЗМО} - E_{НВМО})/2$ и абсолютная электроотрицательность – по формуле: $\chi_0 = -(E_{ВЗМО} + E_{НВМО})/2$ (табл. 5)

Данные, представленные в таблице 5, коррелируют с проведенными ранее исследованиями [24] и показывают, что параметр $E_{ВЗМО}$ (дескриптор HOMOEnergy)

**Квантово-механические энергетические дескрипторы гидразида
8-бензиламинотеофиллинил-7-уксусной кислоты**

Соединение	E _{ВЗМО} , eВ	E _{НВМО} , eВ	Энергетическая щель, eВ	η, eВ	χ ₀ , eВ
С-3	-8,69238	-0,426908	-8,265547	4,132773	4,559644

в наибольшей степени влияет на величину АОА. Механизм взаимодействия соединения С-3 и NO может быть реализован за счет переноса электрона с высшей занятой молекулярной орбитали «спиновой ловушки» на низшую вакантную молекулярную орбиталь радикала с образование более стабильного радикального комплекса.

Выводы

1. Курсовое применение соединения С-3 в дозе 100 мг/кг внутривенно животным с ВК приводило к достоверному снижению летальности и уменьшению неврологических нарушений по шкале Stroke-index как на 4 сут (острый период патологии), так и на 18 сут (восстановительный период патологии) эксперимента.

2. Введение соединения С-3 животным с ВК приводило на 4 сутки эксперимента к торможению реакций оксидативного и нитрозирующего стрессов в головном мозге – снижению маркерных продуктов – АФГ, КФГ и нитротирозина, к повышению активности ферментов антиоксидантной защиты – СОД, ГПР и каталазы, к нормализации показателей нитроксидергической системы головного мозга – снижению активности NO-синтазы и концентрации стабильных метаболитов NO.

3. Механизм антиоксидантного действия соединения С-3 связан с особенностями его химической структуры, которое может быть «спиновой ловушкой», что подтверждается квантово-механическими расчетами энергетических дескрипторов граничных молекулярных орбиталей.

1. Гомазков О. А. Старение мозга и нейротрофины / О. А. Гомазков. – Москва : Издательство ИКАР, 2011. – 93 с.
2. Медицина неотложных состояний / [Никонов В. В., Беленичев И. Ф., Бухтиярова Н. В., Феськив А. Э.]. – Донецк : Издатель Заславский, 2012. – 512 с.
3. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects/ Mary C. McKenna, Rolf Gruetter, Ursula Sonnewald [et al.]. – Elsevier, Inc., 2008. – 757 p.
4. Метаболитотропные препараты / [Мазур И. А., Чекман И. С., Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А.]. – Москва : Ассоциация Медицинская Литература ЗАО, 2007. – 304 с.
5. Нейропротекция и нейропластичность / Беленичев И. Ф., Черний В. И. Бухтиярова Н. В. [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
6. Рациональная нейропротекция / [Беленичев И. Ф., Черний В. И. Бухтиярова Н. В., Павлов С. В.]. – Донецк : Издательский Дом Заславского, 2008. – 264 с
7. Kelly S. Neuroprotection: heat shock proteins / S. Kelly, M. A. Yenari // Curr. Med. Res. Opin. – 2012. – V.18, № 2. – P. 55–60.
8. Arshad Majid. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future / Arshad Majid // ISRN Neurology. – 2014. – V. 14. – P. 1–18
9. Anzilotti C. Ischemic tolerance modulates TRAIL expression and its receptors and generates a neuroprotected phenotype / C. Anzilotti, A. Vinciguerra, O. Cuomo // Cell Death Dis. – 2014. – V.5, №7. – P. 1331–1339.
10. Belenichev I. F. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction / I. F. Belenichev, S. V. Pavlov, N. V. Buchtiarova // Neurochem. Journal. – 2011. – V. 5, № 4. – P. 251–256.
11. Sauvage Maria-Angeles C. The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an *in vivo* multimodal magnetic resonance imaging study / C. Sauvage Maria-Angeles // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2015. – V. 35. – P. 917–921.
12. Антиоксиданты: клинико-фармакологический аспект / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Н. А. Горчакова, Н. В. Бухтиярова // Український медичний часопис. – 2014. – № 1 (99). – С. 22–28.
13. Research of antioxidant properties of theophyllinyl-7-acetic acid derivatives / K. Aleksandrova, I. Belenichev, A. Shkoda [et al] // Oxid Antioxid Med Sci. – 2014. – № 3 (3). – С. 187–194.
14. Исследование биологических свойств нового производного теофилина – соединения С-3 / Д. Н. Юрченко, Е. В. Александрова, А. С. Шкода [и др.] // Вестник новых мед. технологий. – 2013. – Т. 20, № 1. – С. 115–117.

15. Исследование мембранопротекторных свойств и влияния на энергетический обмен нейронов нового производного ксантина С-3 в условиях развития глобальной ишемии головного мозга / Е. В. Александрова, Д. Н. Юрченко, Н. И. Романенко [и др.] // Укр. биофармац. журн. – 2013. – № 4 (27). – С. 54–58.
16. Carmichael S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism and purpose / S. T. Carmichael // NeuroRX. – 2005. – № 2 (3). – P. 396–409.
17. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – V. 34, № 6. – P. 334–336.
18. Halliwell B. Molecular Biology of Free Radicals in Human / B. Halliwell. – St. Lucia London: OICA Int., 1999. – 352 p.
19. Губский Ю. И. Продукты свободнорадикального перекисного окисления и методы их идентификации / Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левицкий Е. Л. // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.
20. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 4th Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
21. Зайцев В. М. Прикладная медицинская статистика : Учебное пособие / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – [2-е изд.]. – Санкт-Петербург : ООО «Изд-во ФОЛИАНТ», 2006. – 432 с.
22. New xanthine derivative B-YR-2 as antioxidant modulator of post-stroke damage of sensorimotor cortex neurons in rats / I. F. Belenichev, K. V. Aleksandrova, S. G. Nosach [et al.] // Elixir Pharmacy. – 2014. – № 76. – P. 28286–28292
23. Belenichev I. F. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / Belenichev I. F., Gorbacheva S. V., Bukhtiyarova N. V. // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 24–27.
24. Новые производные 3-бензилксантина как возможные модуляторы уровня оксида азота / М. В. Дьячков, А. С. Шкода, Е. В. Александрова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2013 – Т. 20, № 2. – С. 366–368.

С. Г. Носач, И. Ф. Беленичев, Е. В. Александрова, С. В. Левич, В. П. Рыженко
Антиоксидантный механизм нейропротективного действия производного
3-метилксантина (соединения С-3) в условиях внутримозгового
кровоизлияния

Острое нарушение мозгового кровообращения по типу геморрагического инсульта сопровождается нитрозирующим и оксидативным стрессом, приводит к развитию нейроапоптоза и гибели клеток. В связи с этим актуальным является поиск новых нейропротекторов с антиоксидантным механизмом действия среди скавенджеров активных форм кислорода, NO и свободных радикалов.

Цель исследования – изучение нейропротективной активности производного 3-метилксантина (соединения С-3) в сравнении с пирацетамом и антиоксидантом-нейропротектором – мексидолом при моделировании внутримозгового кровоизлияния.

Оценивали выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных, а также следующие биохимические показатели в ткани мозга: содержание продуктов окислительной модификации белков, активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), активность NO-синтазы и содержание нитратов и нитротирозина.

Показано, что курсовое применение соединения С-3 в дозе 100 мг/кг внутримозгово животным с внутримозговым кровоизлиянием приводило к достоверному снижению летальности и уменьшению неврологических нарушений как в острый, так и в восстановительный период внутримозгового кровоизлияния. Введение соединения С-3 приводило к торможению реакций оксидативного и нитрозирующего стресса, повышению активности ферментов антиоксидантной защиты, к нормализации показателей нитроксидергической системы головного мозга.

На основании полученных результатов был предложен механизм антиоксидантного действия соединения С-3, связанный с особенностями его химической структуры.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, нейропротекция, 3-метилксантин

С. Г. Носач, І. Ф. Бєленічев, К. В. Александрова, С. В. Левіч, В. П. Рижєнко
Антиоксидантний механізм нейропротективної дії похідного 3-метилксантину
(сполуки С-3) за умов внутрішньомозгового крововиливу

Гостре порушення мозкового кровообігу за типом геморагічного інсульту супроводжується нітрозуючим і оксидативним стресом, що призводить до розвитку нейроапоптозу й загибелі клітин. У зв'язку з цим актуальним є пошук нових нейропротекторів з антиоксидантним механізмом дії серед скавенджерів активних форм кисню, NO та вільних радикалів.

Мета дослідження – вивчення нейропротективної активності похідного 3-метилксантину (сполуки С-3) порівняно з пірацетамом і антиоксидантом-нейропротектором – мексидолом за моделювання внутрішньомозкового крововиливу.

Оцінювали ступінь неврологічного дефіциту в експериментальних тварин, а також наступні біохімічні показники в тканині мозку: уміст продуктів окиснювальної модифікації білків, активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази), активність NO-синтази та вміст нітратів і нітротирозину.

Показано, що курсове застосування сполуки С-3 у дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково тваринам з внутрішньомозковим крововиливом призводило до достовірного зменшення летальності та неврологічних порушень як у гострий, так і у відновний період внутрішньомозкового крововиливу. Введення сполуки С-3 призводило до гальмування реакцій оксидативного та нітрозуючого стресу, підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту, нормалізації показників нітросидергічної системи головного мозку.

На основі одержаних результатів було запропоновано механізм антиоксидантної дії сполуки С-3, пов'язаний з особливостями його хімічної будови.

Ключові слова: геморагічний інсульт, нейропротекція, 3-метилксантин

S. G. Nosach, I. F. Belenichev, K. V. Aleksandrova, S. V. Levich, V. P. Ryzhenko
Antioxidant mechanism of neuroprotective action of 3-methylxanthine derivative (compound C-3) in conditions of intracerebral hemorrhage

Acute cerebrovascular accident by hemorrhagic stroke type leads to nitrosating and oxidative stress, neuronal apoptosis development and cell death. Thus, the search of novel neuroprotective agents with antioxidant mechanism of action among scavengers of reactive oxygen species, NO and free radicals is actual.

The goal of the research was to study the neuroprotective activity of a 3-methylxanthine derivative (compound C-3) in comparison with Piracetam and neuroprotector-antioxidant – Mexidol in modeling of intracerebral hemorrhage.

There were evaluated the indices of neurological deficits in experimental animals and the following biochemical parameters in the brain tissue: the content of products of oxidative modification of proteins, activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), activity of NO-synthase and also nitrates and nitrotyrosine contents.

Course administration of hydrazide of 8-benzylaminotheophyllinyl-7-acetic acid (compound C-3) at a dose of 100 mg / kg intragastrically to animals with intracerebral hemorrhage led to a significant decreasing of mortality and neurological disorders in the acute and in the recovery period of intracerebral hemorrhage. Administration of compound C-3 led also to the inhibition of reactions of oxidative and nitrosative stresses, to increasing the antioxidant enzymes activities, to the normalization of nitric system of the brain.

Based on these results, mechanism of antioxidant action of compound C-3, associated with the peculiarities of its chemical structure, was proposed.

Key words: hemorrhagic stroke, neuroprotection, 3-methylxanthine

Поступила: 11 ноября 2015 г.

Контактное лицо: Беленичев Игорь Федорович, профессор, доктор биологических наук, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Тел.: + 38 0 612 34 27 41.

С. В. Холодняк, Н. В. Бухтіярова, К. П. Шабельник,
Г. Г. Берест, І. Ф. Бєленічев, С. І. Коваленко

Спрямований пошук протисудомних агентів серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4] тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим фрагментом

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: спіропохідні, 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліни, коразолові судоми, коразоловий кіндлінг, протисудомна активність, нейропротекція

Дослідження останніх років в області біоорганічної, біологічної та медичної хімії сприяли прогресу в розумінні більшості молекулярних механізмів дії протисудомних засобів. Так, сьогодні синтезовані та з успіхом застосовуються в медичній практиці препарати, які активують ГАМК-ергічну передачу (вальпроат натрію, вігабатрин, фенobarбітал та ін.), впливають на синтез та вивільнення збуджувальних амінокислот і чутливість до них рецепторів постсинаптичних мембран (ламотриджин та ін.), відновлюють властивості нейрональних мембран у епілептичному осередку в результаті збереження потенціалу спокою, блокують натрієві канали, пригнічують автоматизм нейронів у синаптичному осередку, знижують енергетичний обмін нейронів (дифеніл, карбамазепін та ін.) [1–3]. Виходячи з цього, для ефективного лікування хворого надзвичайно важливою умовою є відповідність механізму дії протисудомних засобів особливостям патогенезу епілепсії в кожному окремому випадку. Необхідність безперервної фармакокорекції зазначених станів та наявність значних побічних ефектів у існуючих протисудомних препаратів спонукає дослідників постійно розширювати їх арсенал [2, 3].

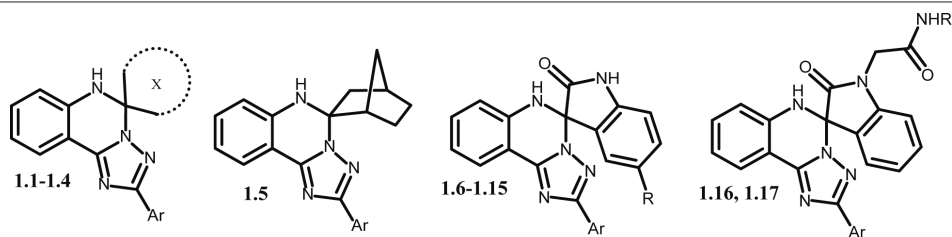
Останнім часом виявлено, що гетероциклічні системи, сполучені С α -С α -зв'язками з іншими циклічними фрагментами (спіропохідні), мають аффіність до аденозинових, ГАМК-, м-холіно- та H₁-гістамінових, глутамінових рецепторів і, як наслідок, проявляють проти-

судомну активність [4–9]. Подібні структурні фрагменти наявні в уперше синтезованих спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом.

Мета дослідження – первинний скринінг протисудомної активності спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом на моделі коразолових судом та подальше дослідження «сполук-лідерів» на експериментальній моделі хронічного судомного синдрому.

Матеріали та методи. Для дослідження протисудомної активності використані нові спіропохідні з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом (1.1–1.16), які синтезовані на кафедрі органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри професор С. І. Коваленко) [10]. Принципову будову зазначених сполук наведено на рисунку 1.

Для первинної оцінки протисудомної дії синтезованих сполук використано 120 білих безпородних щурів вагою 150–160 г, які отримані з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Тривалість карантину тварин складала 14 днів. Протягом даного періоду щодобово спостерігали за поведінкою та загальним станом тварин, двічі на 1 день тварин спостерігали в клітках (захворюваність та смертність). Клітки з тваринами розміщені в окремих кімнатах, світловий режим – 12 год. Температуру повітря підтримували в інтервалі 19–25 °С, відносну вологість – 50–70 %. Температуру та вологість повітря реєстрували щоденно. Режим вентиляції – 15 об'ємів повітря приміщення за 1 год. Тварини знаходились у стандартних клітках (400 × 320 × 160 мм), по 6 у кожній.



- 1.1 Ar=C₆H₅, X=cyclopentyl; 1.2 Ar=C₆H₅, X=cyclohexyl; 1.3 Ar=C₆H₅, X=2',3',5',6'-tetrahydropyran-4-yl;
 1.4 Ar=C₆H₅, X=1-methylpiperidine-4-yl; 1.5 Ar=C₆H₅; 1.6 Ar=C₆H₅, R=H; 1.7 Ar=C₆H₄, R=Cl;
 1.8 Ar=C₆H₄, R=Br; 1.9 Ar=4-FC₆H₅, R=H; 1.10 Ar=4-FC₆H₄, R=Cl; 1.11 Ar=4-FC₆H₄, R=Br;
 1.12 Ar=2-CH₃OC₆H₅, R=H; 1.13 Ar=2-CH₃OC₆H₄, R=Cl; 1.14 Ar=2-CH₃OC₆H₄, R=Br;
 1.15 Ar=4-BrC₆H₄, R=Br; 1.16 Ar=3-FC₆H₄, R=3-CH₃OC₆H₄CH₂-; 1.17 Ar=4-CH₃OC₆H₄, R=4-CH₃OC₆H₄

Рис. 1. Принципова будова спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом (1.1–1.16).

Рацион харчування – фуражне зерно, хліб, коренеплоди (бурак, морква) [13, 14]. Перед початком дослідження тварини, які відповідали критеріям включення в експеримент, були розподілені на групи методом рандомізації [12]. Тварини, що не відповідали критеріям, були виключені з експерименту протягом карантину. Маніпуляції провели згідно з вимогами щодо використання тварин у біомедичних дослідіах [11]. Судомний стан у тварин моделювали шляхом одноразового підшкірного введення коразолу (пентилентетразол, виробник «Ніжфарм», Російська Федерація) у дозі 80 мг/кг на 0,9 % розчині натрію хлориду. Судомну дію оцінювали за характером, тривалістю латентного періоду судом (хв), а також за показником летальності. Інтенсивність судомного нападу оцінювали за допомогою 5-бальної шкали: 0 – відсутність судомної активності; 1 – гіперкінезія; 2 – тремор; 3 – клонічні судоми передніх кінцівок з підйомом на задні кінцівки; 4 – виражені тоніко-клонічні судоми, завалювання тварини на бік, наявність фази тонічної екстензії; 5 – повторні клоніко-тонічні судоми, втрата пози та загибель тварини [15–17].

Досліджувані сполуки вводили тваринам одноразово, внутрішньошлунково за допомогою металічного зонда в дозі 10 мг/кг у вигляді водної суспензії (стабілізатор Твін-80) за 1 год до введення конвульсанта. Як референт-препарат використовували ламотриджин – блокатор NMDA-підтипу глутамінових рецепторів. Ламотриджин вводили аналогічно досліджуваним сполукам. Тварини

контрольної групи одержували аналогічний об'єм води з Твіном-80, внутрішньошлунково. Кожну експериментальну групу формували з 6 тварин.

Оцінку активності «сполук-лідерів» проводили на експериментальній моделі хронічного судомного синдрому (ХСС) – коразоловий кіндлінг [17–19]. ХСС формували 6-разовим внутрішньочеревинним (в/о) введенням коразолу (виробник «Ніжфарм», Російська Федерація) у дозі 40 мг/кг на 0,9 % розчині натрію хлориду з інтервалом 48 год. ХСС – адекватна та найчастіше використовувана модель, яка подібна до клінічного стану хворих на епілепсію. Досліджувані сполуки та препарати порівняння вводили профілактично 1 раз на добу внутрішньошлунково за 60 хв до введення коразолу у дозах: сполуки 1.6 та 1.11 – 10 мг/кг, ламотриджин – 50 мг/кг, карбамазепін – 125 мг/кг. Кожну експериментальну групу формували з 10 тварин.

Наприкінці дослідження тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під тіопенталовим наркозом (доза 40 мг/кг) [16]. Тканини головного мозку гомогенізували на холоді в ізотонічному розчині (0,15 моль/л KCl) за температури +4 °C, з використанням скляного гомогенізатора, співвідношення тканина : ізотонічний розчин 1:20. Мітохондріальну та цитозольну фракції розділяли методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» (Германія) за температури +4 °C у 10-разовому об'ємі середовища, яке вміщує 250 ммоль сахарози, 20 ммоль трис-HCl-буфера,

1,0 ммоль ЕДТА (рН 7,4). Попередньо проводили центрифугування протягом 7 хв при 1000 g, а супернатант додатково центрифугували – 20 хв при 17000g [22].

Біохімічні дослідження проводили в цитозольній фракції гомогенату головного мозку тварин. Уміст тіольних груп (SH-груп) у біологічному матеріалі визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіо-біс-7-нітробензойною кислотою [20, 22]. Активність глутатіонредуктази (ГР) визначали за методикою в тесті з окисненим глутатионом [20]. Відновлений та окиснений глутатіон визначали флюориметрично по реакції з фталевим ангідридом [21]. Показники окисної модифікації білка (ОМБ) визначали за методом В. Halliwell, що базується на взаємодії окиснених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) [22]. Утворені альдегідфенілгідразони (АФГ) та карбоксилфенілгідразони (КФГ) визначали спектрофотометрично при довжинах хвиль 274 нм та 363 нм відповідно. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів у реакції Грісса, активність NOS – флюориметрично, за різницею швидкості окиснення NADPH у двох паралельних зразках, у один з яких додавали інгібітор NOS – N-нітро-L- аргінін [22].

Результати дослідження оброблені за допомогою статистичного пакета програм «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Kolmogorov-Smirnov (D) та Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). У випадку розподілення, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували U. Mann-Whitney для двох не пов'язаних вибірок та для більшого числа вибірок – критерій Kruskal-Wallis H з подальшим порівнянням за Games-Howell. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць зв'язаності. Дані представлені у вигляді арифметичної та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінними проводили, використовуючи процедуру бінарного регресійно-

го аналізу. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при рівні значущості не менше ніж 0,05 [23].

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що введення коразолу призводило до розвитку епілептоподібних судом з вираженою тоніко-клонічною фазою, що завершувалася 100 % летальністю тварин. Так, у контрольній групі латентний період судом склав у середньому 6,22 хв, а тривалість тоніко-клонічних нападів – 7,87 хв. Судомний синдром, що розвивався у тварин цієї групи, мав виражені тоніко-клонічні напади, які періодично повторювались, була присутня чітко виражена фаза тонічної екстензії (опістотонус). Уведення досліджуваних сполук призводило до достовірного збільшення латентного періоду судом, зниження тривалості клоніко-тонічної фази, інтенсивності судом у балах та зменшення летальності. Так, введення тваринам 2-феніл-6H-спіро[циклопентан-5,1'-[1,2,4]тріазоло[1,5-c]хіназоліну] (**1.1**) призводило до збільшення латентного періоду судом на 34,88 хв та зменшення тривалості клоніко-тонічних судом на 3,65 хв (табл. 1). Важливо, що розширення спіроциклу до циклогексанового (сполука **1.2**), його заміна на тетрагідропірановий (**1.3**) або 1-метилпіперидиновий (**1.4**) цикли призводить до суттєвої втрати протисудомної активності, яка виражається в зменшенні латентного періоду, збільшенні тривалості клоніко-тонічної фази та летальності експериментальних тварин порівняно зі сполукою **1.1** (табл. 1). Крім того, при введенні сполук **1.2** та **1.4** у тварин спостерігали деякі прояви судомного стану, а саме: тремтіння, стрибки, тонічні скорочення передніх кінцівок.

Заміна вищезазначених спіросполучених циклічних фрагментів у положенні 5 [1,2,4]тріазоло[1,5-c]хіназоліну на біцикло[2.2.1]гептан (**1.5**) призводила до позитивних змін, а саме: до збільшення латентного періоду в 4,9 разу, зменшення тривалості клоніко-тонічної фази в 2,8 разу та летальності на 70 % порівняно з контролем.

Протисудомна активність досліджуваних сполук, $M \pm t$ ($n = 6$)

Групи тварин (шифр сполуки)	Латентний період судом, хв	Тривалість клоніко-тонічної фази судом, хв	Леталь- ність, %	Активність судомних нападів, бал
Контроль	$6,22 \pm 0,62$	$7,88 \pm 0,77$	100	$7,30 \pm 0,55$
1.1	$41,10 \pm 3,20^*$	$4,23 \pm 0,32^*$	30*	$4,70 \pm 0,46^*$
1.2	$22,70 \pm 5,50^*$	$7,70 \pm 2,50$	50*	$5,71 \pm 0,42$
1.3	$14,10 \pm 1,20^*$	$4,88 \pm 1,70$	70*	$5,00 \pm 0,32$
1.4	$16,30 \pm 3,50^*$	$8,70 \pm 2,50$	50*	$5,71 \pm 0,42$
1.5	$30,50 \pm 5,30^*$	$2,85 \pm 0,51^*$	30*	$4,20 \pm 0,33^*$
1.6	$33,10 \pm 2,10^*$	$2,32 \pm 0,42^*$	10*	$3,40 \pm 0,67^*$
1.7	$18,70 \pm 1,20^*$	$8,33 \pm 1,30$	70*	$5,22 \pm 0,67$
1.8	$17,70 \pm 1,60^*$	$6,70 \pm 1,80$	80*	$6,12 \pm 0,54$
1.9	$21,50 \pm 1,20^*$	$6,30 \pm 1,00$	60*	$5,33 \pm 0,45$
1.10	$19,30 \pm 1,10^*$	$5,70 \pm 1,50$	50*	$5,22 \pm 0,22$
1.11	$48,30 \pm 5,80^*$	$2,70 \pm 0,52^*$	40*	$2,65 \pm 0,23^*$
1.12	$23,20 \pm 1,20^*$	$4,71 \pm 0,33$	60*	$5,77 \pm 0,12$
1.13	$27,30 \pm 6,30^*$	$4,34 \pm 0,33^*$	50*	$5,10 \pm 0,37^*$
1.14	$22,30 \pm 1,30^*$	$5,65 \pm 0,44^*$	50*	$5,22 \pm 0,33$
1.15	$45,80 \pm 1,10^*$	$2,70 \pm 0,50^*$	40*	$4,22 \pm 0,22^*$
1.16	$38,10 \pm 4,70^*$	$4,11 \pm 0,55^*$	50*	$5,40 \pm 0,51$
1.17	$19,70 \pm 1,00^*$	$5,00 \pm 2,10$	80*	$5,88 \pm 0,51$
Ламотриджин	$31,20 \pm 1,70^*$	$2,77 \pm 0,67^*$	20*	$3,50 \pm 0,75^*$

Примітка. *Відмінності достовірні ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою щурів.

Більш перспективними сполуками з протисудомною дією є похідні 2-арил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліну спіро-сполучені з індольним циклом (1.6-1.17). 2'-Феніл-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (1.6) достовірно зменшував летальність тварин до 90 % і, що важливо, скорочував тривалість клоніко-тонічної фази в 3,4 разу порівняно з контролем (табл. 1). Найвдалішою хімічною модифікацією сполуки 1.6, виявилася модифікація, яка передбачала одночасну заміну фенільного замісника 2 положення на 4-флуорофенільний та додаткове введення бром до 5 положення індольного циклу (1.11). Так, застосування сполуки 1.11 збільшувало латентний період у 7,7 разу, зменшувало тривалість клоніко-тонічної фази в 2,9 разу та летальність на 60 % порівняно з контролем (табл. 1). Заміна 4-флуорофенільного (1.11) на 4-бромо-

фенільний (1.15) замісник не призводить до втрати протисудомної активності, але в тварин зберігається незначна судомна активність (тремор, судоми кінцівок).

Вдалою також виявилася модифікація сполуки 1.6 шляхом введення 3-метоксibenзилацетамідного залишку (1.16) за атомом азоту індольного циклу. Сполука 1.16, на тлі позитивної дії на судоми, поступається сполуці 1.6 за впливом на тривалість клоніко-тонічної фази та латентного періоду. Подальша модифікація молекули сполуки 1.6 шляхом введення галогенів (хлору або бром) у положення 5 індольного фрагмента, заміщених арильних замісників до 2 положення тріазоло[1,5-с]хіназолінового циклу не призвела до посилення активності, сполуки 1.7–1.10, 1.12–1.14 та 1.17 помірно пригнічували судоми, поступаючись препаратом-порівняння Ламотриджину.

Отже, серед досліджених спіросполук з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]-тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом найактивніше впливали на картину судом сполуки **1.6** та **1.11**, які за силою дії перевищують ефект ламотриджину. Зазначені сполуки в подальшому були досліджені на моделі коразолового кіндлінгу.

Моделювання коразолового кіндлінгу призводить до значного збільшення активності NO-синтази та продукції стабільних метаболітів NO на тлі дефіциту тиольних сполук – сумарних відновлених тиолів та відновленого глутатіону в головному мозку (табл. 2). Крім того, у головному мозку суттєво знижується активність ГР і, як наслідок, підвищується вміст глутатіону окисненого. Такі зміни в системі NO/відновлені тиоли призводять до зниження біодоступності NO і його перетворення в пероксинітрил (ONOO^-) та інші цитотоксичні деривати (NO^+ , NO^- , N_2O_3). Це сприяє активації оксидативного стресу, про що свідчить підвищення вмісту маркерів окисної модифікації білка (АФГ та КФГ) у цитозольній фракції гомогенату головного мозку.

Профілактичне 11-добове застосування тваринам, паралельно моделюванню ХСС, сполук **1.6** і, особливо, **1.11**, при-

зводить до зниження активності NO-синтази та продукції стабільних метаболітів NO у цитозолі головного мозку (табл. 2). Важливо, що більш виражено на показники системи оксиду азоту впливає сполука **1.11**, яка за ефективністю достовірно перевищує референс-препарати Ламотриджин та Карбамазепін. Зниження активності NO-синтази під дією синтезованих сполук і Ламотриджину призводить до гальмування реакцій оксидативного стресу, що проявляється в зменшенні вмісту продуктів окисної модифікації білка (АФГ і КФГ) у цитозольній фракції головного мозку експериментальних тварин. За ступенем зниження маркерів ОМБ сполуки **1.6**, **1.11** та лікарські засоби можна розташувати в наступній послідовності: **1.6–1.11** – Ламотриджин – Карбамазепін.

Висока активність досліджуваних сполук, особливо **1.11** та Ламотриджину щодо гальмування реакцій оксидативного стресу за умов ХСС пов'язана не тільки з пригніченням активності NO-синтази (табл. 2), але й з підвищенням активності тиол-дисульфідної системи (табл. 3). Так, профілактичне введення зазначених сполук забезпечило збереження відновлених еквівалентів тиол-дисульфідної системи на тлі

Таблиця 2

Маркери оксидативного стресу у головному мозку експериментальних тварин за хронічного судомного синдрому та впливу досліджуваних сполук, $M \pm m$ ($n = 10$)

Група тварин	Уміст продуктів окисної модифікації білка, у. о./г білка		Уміст метаболітів оксиду азоту (NO_2), мкмоль/г	Активність NO-синтази, нмоль/мг білка · хв
	АФГ	КФГ		
Інтактні тварини	$0,37 \pm 0,02$	$0,170 \pm 0,020$	$4,84 \pm 0,83$	$2,41 \pm 0,37$
Хронічний судомний синдром (контроль)	$0,61 \pm 0,05$	$0,350 \pm 0,020$	$17,40 \pm 1,20$	$6,12 \pm 0,51$
Хронічний судомний синдром + 1.6	$0,41 \pm 0,02$	$0,250 \pm 0,030^*$	$11,70 \pm 0,72^*$	$4,43 \pm 0,41^*$
Хронічний судомний синдром + 1.11	$0,38 \pm 0,03^*$	$0,190 \pm 0,020^*$	$8,67 \pm 0,63^*$	$2,43 \pm 0,21^*$
Хронічний судомний синдром + ламотриджин	$0,47 \pm 0,03^*$	$0,250 \pm 0,015^*$	$15,80 \pm 1,50^*$	$4,71 \pm 0,35^*$
Хронічний судомний синдром + карбамазепін	$0,57 \pm 0,07$	$0,310 \pm 0,040$	$16,40 \pm 1,10$	$5,92 \pm 0,73$

Примітка. Тут і в табл. 3: *достовірність відносно тварин контрольної групи ($p < 0,05$).

**Показники тіол-дисульфідної системи головного мозку
експериментальних тварин за хронічного судомного синдрому та впливу
досліджуваних сполук, $M \pm t$**

Група тварин	Уміст SH-груп, мкмоль/г тканини	Активність глутатіон-редуктази, мкмоль/мг білка · хв	Уміст глутатіону відновленого, мкмоль/г тканини	Уміст глутатіону окисненого, мкмоль/г тканини
Інтактні тварини	57,30 ± 2,80	14,50 ± 0,82	4,73 ± 0,23	0,033 ± 0,008
Хронічний судомний синдром (контроль)	38,40 ± 1,62	8,20 ± 0,64	2,12 ± 0,11	0,056 ± 0,002
Хронічний судомний синдром + 1.6	43,20 ± 2,11*	11,70 ± 0,51*	3,11 ± 0,22*	0,032±0,005*
Хронічний судомний синдром + 1.11	52,10 ± 3,17*	16,20 ± 0,73*	3,82 ± 0,31*	0,034±0,001*
Хронічний судомний синдром + ламотриджин	48,60 ± 2,18*	13,50 ± 0,68*	3,14 ± 0,22*	0,035±0,005*
Хронічний судомний синдром + карбамазепін	40,70 ± 4,11	7,30 ± 0,64	2,00± 0,33	0,057±0,002

підвищення активності ГР порівняно з контрольною групою тварин. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи (загальні тіоли, глутатіон) суттєво обмежують цитотоксичність NO і його дериватів, тим самим збільшують шанси нейрону вижити в екстремальних умовах. Карбамазепін не впливає на показники тіол-дисульфідної системи головного мозку щурів з ХСС.

Нейропротективна дія сполук **1.6** та **1.11** при ХСС може бути пояснена антиоксидантним механізмом дії. Так показано, що антиоксидантна дія сполук **1.6** та **1.11** реалізується шляхом підвищення активності глутатіон-залежних ферментів і вмісту відновлених тіолів (табл. 3). Зазначений ефект запобігає пошкодженню нейронів продуктами оксидативного стресу за умов ХСС, а також нормалізує біодоступність NO.

Отже, нами вперше виявлена висока противосудомна активність спіропохідних 2'-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолінів і встановлено, що на моделі коразолового кіндлінгу досліджувані сполуки **1.6** та **1.11** переважа-

ють за дією найчастіше застосовуваний в епілептології лікарський засіб Карбамазепін. Крім того, сполука **1.11** перевищує, а **1.6** має співставиму активність з антиконвульсантом останнього покоління Ламотриджином.

Висновки

1. Уперше виявлено, що спіропохідні з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]-тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом проявляють високу протисудомну активність; сполуки **1.6** та **1.11** у дозі 10 мг/кг на моделі коразолових судом ефективно збільшують латентний період судом у 5,3 та 7,7 разу, зменшують тривалість клоніко-тонічної фази в 2,9 та 3,3 разу та летальність експериментальних тварин на 60 та 90 % відповідно.
2. На моделі коразолового кіндлінгу «сполуки-лідери» **1.6** та **1.11** переважають за дією найзастосовуваніший в епілептології лікарський засіб Карбамазепін, а сполука **1.11** перевищує за дією антиконвульсант останнього покоління Ламотриджин.

1. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
2. Беленичев І. Ф. Рациональне застосування антиконвульсантів для лікування больового синдрому в умовах еквівалентів епілепсії / Беленичев І. Ф., Опришко В. І., Носівець Д. С. // Інформаційний лист №328-2014: Протокол від 29.10.2014 № 5. – Київ, 2015. – 4 с.

3. Löscher W. New horizons in the development of antiepileptic drugs / Löscher W., Schmidt D. // *Epilepsy Res.* – 2002. – V. 50. – № 1–2. – P. 3–16.
4. Pat. WO 2007/047496 A2. Acylated spiropiperidine derivatives as melanocortin-4 receptor modulators / Bakshi R.K., Dellureficio J.P., Dobbelaar P.H. at all.; – Merck&CO, INC. (US); Filed: 18.10.2006; Posted: 26.04.2007.
5. Pat. WO 2013/107743 A1. Spiroindoline derivatives as gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists / Panknin O., Baurle S., Ring S. at all; – Bayer Intellectual property GMBH (DE); Filed: 15.01.2013; Posted: 16.01.2012.
6. Vinod G. Ugale. Quinazolines: new horizons in anticonvulsant therapy / Vinod G. Ugale, Sanjay B. Bari // *European Journal of Medical Chemistry.* – 2014. – V. 80. – P. 447–501. doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.072
7. Vikas Sharma. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review / Vikas Sharma, Pradep Kumar, Devender Pathak // *J. Heterocyclic Chem.* – 2010. – V. 47. – P. 491–502. doi 10.1002/jhet
8. Biological activities of isatin and its derivatives / Surendra Nath Pandeya, Sivakumar Smitha, Mayank Jyoti, Seshaiyan Krishnan Sridhar // *Acta Pharm.* – 2005. – V. 55. – P. 27– 46.
9. Girija S. Singh. Isatins as privileged molecules in desing and synthesis of spiro-fused cyclic frameworks / Girija S. Singh, Zelalem Y. Desta // *Chemical Reviews.* – 2012. – V. 112. – P. 6104-6155. dx.doi.org/10.1021/cr300135y
10. Позитивне рішення на патент (UA), МПК 2015.01, А61К 31/00. Заміщені 2'-алкіл-(циклоалкіл-, аралкіл-, арил-, гетарил-)-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-они, що проявляють протисудомну дію // Холодняк С. В., Шабельник К. П., Коваленко С. І. та ін.; - власник Запорізький державний медичний університет, Коваленко С. І. – № u 2015 05938; Заявл. 16.06.2015; Поз. рішення про видачу №18886/ЗУ/15 від 27.10.2015.
11. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
12. Наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 «Порядок проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів».
13. Науково-методичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ : Авіцена, 2002. – 156 с.
14. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др.]. – Киев, 1983. – 383 с.
15. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – Москва, 2005. – 832 с.
16. Доклинические исследования лекарственных средств; за ред. А. В. Стефанова. – Киев : Авицена, 2002. – 568 с.
17. Головенко М. А. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: Методичні рекомендації / Головенко М. А., Громов Л. О. – Київ : ДФЦ МОЗ України, 2003. – 46 с.
18. Messenheimer J. A. Sprouting fibres gain access to circuitry transsynaptically altered by kindling / J. A. Messenheimer, E. W. Herris, O. Steward // *Exp. Neurol.* – 2009. – V. 64, № 4. – P. 469– 481.
19. Кругликов Р. И. Судорожная активность / Р. И. Кругликов, М. С. Мыслободский, В. Л. Эзрохи. – Москва : Наука, 1970. – 147 с.
20. Лабораторные исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. – Москва : Медицина, 1987. – 365 с.
21. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
22. Доклиническое изучение специфической активности нейропротективных препаратов: методические рекомендации ГЭЦ МЗ Украины (протокол от 31.07.2014 № 7) / Беленичев И. Ф., Чекман И. С., Громов Л. А. [и др.]. – Киев, 2014. – 60 с.
23. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабищ П. Н. – Киев : Морион, 2001. – 408 с.

**С. В. Холодняк, Н. В. Бухтіярова, К. П. Шабельник, Г. Г. Берест,
І. Ф. Бєленічев, С. І. Коваленко**

Спрямований пошук протисудомних агентів серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим фрагментом

Серед різних форм патології нервової системи одне з провідних – третє місце – займають епілептичні розлади, ступінь розповсюдження яких має чітку тенденцію до зростання. До недавнього часу лікування епілепсії було спрямоване загалом на усунення нападів. Сьогодні інтенсивний пошук протисудомних засобів з вираженою нейропротективною дією ведеться серед модуляторів глутамінових та ГАМК рецепторів. Безперечний інтерес у цьому відношенні представляють анельовані похідні хіназоліну. *Мета дослідження* – первинний скринінг протисудомної активності серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліновим фрагментом на

моделі коразолових судом, виявлення «сполуки-лідера» для подальшої оцінки протисудомної та нейропротективної дії за умов коразолового кіндлінгу.

Введення досліджуваних сполук білим безпородним щурам внутрішньошлунково в дозі 10 мг/кг за 1 год до введення коразолу (80 мг/кг) призводило до достовірного збільшення латентного періоду судом, зниження тривалості клоніко-тонічної фази, інтенсивності судом у балах та зменшення летальності. Найактивнішими виявилися 2'-феніл-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.6**) і 5-бромо-2'-(4-фторофеніл)-6'H-спіро[індол-3,5'-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін]-2(1H)-он (**1.11**), які за протисудомною дією перевищують референс-препарат – Ламотриджин. Сполуки **1.6** та **1.11** при профілактичному 11-добовому введенні тваринам, паралельно моделюванню коразолового кіндлінгу, проявляють нейропротективну дію, яка перевищує ефект референс-препаратів – Ламотриджину та Карбамазепіну.

Нейропротективна дія сполук **1.6** та **1.11** при коразоловому кіндлінгу може бути пояснена їхнім антиоксидантним механізмом. Показано, що антиоксидантна дія сполук **1.6** і **1.11** реалізується шляхом підвищення активності глутатіон-залежних ферментів, умісту відновлених тиолів у головному мозку тварин на тлі моделювання коразолового кіндлінгу. Вказаний ефект запобігає ушкодженню нейронів продуктами оксидативного стресу в умовах коразолового кіндлінгу, а також нормалізує біодоступність NO.

Ключові слова: спіропохідні, 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолини, коразолові судоми, коразоловий кіндлінг, протисудомна активність, нейропротекція

С. В. Холодняк, Н. В. Бухтиярова, К. П. Шабельник, Г. Г. Берест, І. Ф. Беленичев, С. І. Коваленко

Направленный поиск противосудорожных агентов среди спиропроизводных с 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолиновым фрагментом

Среди многообразных форм патологии ЦНС одно из ведущих – третье место – занимают эпилептические расстройства, степень распространения которых имеет четкую тенденцию к росту. До недавнего времени лечение эпилепсии было направлено в основном на ликвидацию приступов. В настоящее время ведется интенсивный поиск противосудорожных средств с выраженным нейропротективным действием среди модуляторов глутаминовых и ГАМК-рецепторов. Несомненный интерес в этом плане представляют аннелированные производные хиназолина. *Цель работы* – проведение первичного скрининга противосудорожной активности среди спиропроизводных 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолина на модели коразоловых судорог, выявление «соединения-лидера» для последующей оценки противосудорожного и нейропротективного действия в условиях коразолового киндлинга.

Введение исследуемых соединений белым беспородным крысам внутривенно в дозе 10 мг/кг за 1 час до введения коразола (80 мг/кг) приводило к достоверному увеличению латентного периода судорог, снижению продолжительности клонико-тонической фазы, интенсивности судорог в балах и уменьшению летальности. Наиболее активными оказались 2'-фенил-6'H-спиро[индол-3,5'-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолин]-2(1H)-он (**1.6**) и 5-бромо-2'-(4-фторофеніл)-6'H-спиро[индол-3,5'-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолин]-2(1H)-он (**1.11**), которые по противосудорожному действию превосходят референс-препарат – Ламотриджин. Соединения **1.6** и **1.11** при профилактическом 11-суточном введении животным, параллельно моделированию коразолового киндлинга, оказывают нейропротективное действие, превышающее эффект референс-препаратов – Ламотриджина и Карбамазепина.

Нейропротективное действие соединений **1.6** и **1.11** при коразоловом киндлинге может быть объяснено их антиоксидантным механизмом. Показано, что антиоксидантное действие соединений **1.6** и **1.11** реализуется путем повышения активности глутатион-зависимых ферментов и содержания восстановленных тиолов в головном мозге животных на фоне моделирования коразолового киндлинга. Указанный эффект предотвращает повреждение нейронов продуктами оксидативного стресса в условиях коразолового киндлинга, а также нормализует биодоступность NO.

Ключевые слова: спиропроизводные, 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолины, коразоловые судороги, коразоловый киндлинг, противосудорожная активность, нейропротекция

S. V. Holodniak, N. V. Buchtiyarova, K. P. Shabelnik, G. G. Berest, I. F. Belenichev, S. I. Kovalenko

Targeted search of anticonvulsant agents among spiro-derivatives with 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline fragment

Epileptic disorders take one of the leading place among the diverse forms of CNS pathology and has a clear upward trend. Recently, the treatment of epilepsy has been directed mainly at suppression of the attacks. Currently, an intensive search for anticonvulsant drugs with a significant neuroprotective effect held among modulators of glutamine and GABA receptors. Of great interest in this respect are annelated quinazoline derivatives. *This work was aimed* to conduct preliminary screening of 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline spiro-derivatives anticonvulsant activity on pentylenetetrazol-induced

convulsions model and to detect the «lead-compounds» for subsequent evaluation of anticonvulsant and neuroprotective action on rats kindled by repeated pentylenetetrazol administrations. It was shown, that administration of test compounds intragastrically to outbred white rats at a dose of 10 mg / kg 1 hour before administration of pentylenetetrazol (80 mg/kg) significantly increased the latency period, reduced the duration of the tonic phase, convulsions activity, and lethality level. The most active were 2'-phenyl-6'H-spiro[indol-3,5'-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline]-2(1H)-on (**1.6**) and 5-bromo-2'-(4-fluorophenyl)-6'H-spiro[indol-3,5'-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline]-2(1H)-on (**1.11**), which were more effective in comparison with the reference drug – lamotrigine. Compounds **1.6** and **1.11** in the 11th day of preventive administration to animals, which were kindled by pentylenetetrazol revealed neuroprotective action, that were higher compared to reference drugs – lamotrigine and carbamazepine.

The neuroprotective effect of the compounds **1.6** and **1.11** on rats kindled by pentylenetetrazol can be explained by its antioxidant action. It is clear, that the antioxidant activity of the compounds **1.6** and **1.11** is due to an increasing activity of glutathione-dependent enzymes and content of reducing thiols in the brain of an animals on kindled by repeated pentylenetetrazol administration. This effect prevents neuronal damage by the products of oxidative stress in conditions on rats kindled with repeated pentylenetetrazol administrations, as well as normalize the bioavailability of NO.

Key words: spiro-derivatives, 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]-quinazolines, pentylenetetrazol-induced convulsion, pentylenetetrazol kindling, anticonvulsant activity, neuroprotective activity

Надійшла: 9 листопада 2015 р.

Контактна особа: Бєленічев Ігор Федорович, професор, доктор біологічних наук, кафедра фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 612 34 27 41.

І. М. Білай¹, Є. О. Михайлюк¹, О. В. Цис¹, К. П. Шабельник¹,
С. І. Коваленко¹, А. О. Остапенко²

Аналгетична активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі первинного фармакологічного скринінгу

¹Запорізький державний медичний університет

²Державний заклад «Запорізька медична академія післядипломної освіти
Міністерства охорони здоров'я України»

Ключові слова: аналгетична активність,
похідні 1,2,4-тріазолу

Проблема болю та анальгезії займає одне з центральних місць у сучасній медицині й є предметом широкомасштабних мультидисциплінарних досліджень. Біль це не тільки симптом багатьох гострих і хронічних захворювань, але й складний психофізіологічний феномен, який долучає механізми регуляції та формування емоцій, моторні, гуморальні та гемодинамічні реакції. Лікування больового синдрому – одна з найскладніших проблем, що стосується багатьох областей клінічної медицини. Специфічна фармакологічна корекція болю здійснюється препаратами груп наркотичних і ненаркотичних анальгетиків (ННА) і нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Наркотичні анальгетики (НА) проявляють виражену центральну анальгетичну дію, що дозволяє використовувати їх для лікування болю високої інтенсивності, небезпечного для життя людини. У дії ННА і НПЗП переважає периферична анальгетична дія, за рахунок якої препарати цієї групи ефективні при болях помірної інтенсивності, безпечних для життя.

Підходи до пошуку та вивчення анальгетичних властивостей різних сполук базуються на знаннях про сучасні аспекти патогенезу болю, що дозволяє знайти фармакологічні речовини, інгібуючі медіатори болю: кініни, біогенні аміни, продукти метаболізму арахідонової кислоти – простагландини та лейкотрієни (за участю ферментів циклооксигенази – ЦОГ і ліпоксигенази – ЛОГ), а також пригнічують про-

ведення больових імпульсів різними ланцюгами ЦНС.

Препарати груп ННА і НПЗП (аналгін, парацетамол, ацетилсаліцилова кислота, індометацин, піроксикам та ін.) пригнічують ЦОГ-1 і ЦОГ-2, тому разом зі значною фармакологічною дією вони також проявляють побічні ефекти (характерні ураження печінки, нирок, слизової оболонки шлунка та ін. [1, 2]).

В Україні номенклатура сучасних вітчизняних ННА представлена в основному генеричними препаратами й не задовольняє потреб населення, а сучасні імпортовані препарати залишаються дорогими та малодоступними для широкого кола громадян. Дані положення свідчать про необхідність пошуку нових речовин з анальгетичними властивостями. Нашу увагу привернули похідні 1,2,4-тріазолу, які розглядаються не тільки як можливі анальгетики, але й як фармакологічні субстанції для створення антиоксидантних і протизапальних препаратів [3]. М. D. Mulligan та інші вже провели дослідження, спрямоване на вивчення фармакокінетичних властивостей похідних 1,2,4-тріазолу при моделюванні запалення на лабораторних тваринах і виявили потужний «подвійний» вплив цих речовин на 5-ліпоксигеназу та циклооксигеназу [4].

Підтверджено високу протизапальну й анальгетичну активність і меншу частоту шлункових виразкоутворень при використанні похідних 1,2,4-тріазолу порівняно з референс-препаратами [5–8].

Мета дослідження – вивчити анальгетичну активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Матеріали та методи. Аналгетичну активність вивчали на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 180–230 г. Було сформовано 9 груп по 7 лабораторних тварин: контрольна група – тваринам внутрішньоочередово вводили 0,9 % розчин NaCl у дозі 0,1 мл на 1 кг маси тіла; група порівняння – вводили анальгін у дозі 50 мг/кг у вигляді 10% розчину внутрішньоочередово (в/о); 3–9 групи – вводили досліджувані речовини – похідні 1,2,4-тріазолу (табл. 1) у вигляді 10 % суспензії (в/о у дозі 1/10 ЛД₅₀).

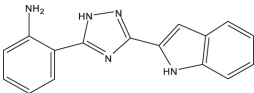
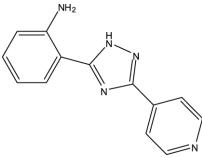
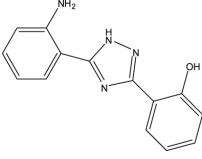
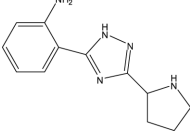
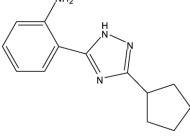
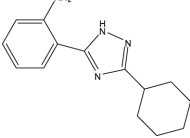
Досліджувані речовини відносилися до IV класу токсичності за Сидоровим і були синтезовані на кафедрі органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету під керівництвом професора С. І. Коваленка.

Методика експерименту з вивчення центрального компонента аналгетичного впливу полягала в наступному:

- больові відчуття в піддослідних тварин викликали шляхом електропоздразнення кінцівок імпульсним струмом напругою від 1 до 100 В, яке викликало відповідну рухову реакцію, що супроводжувалося писком [9];
 - вимірювання порога больової чутливості проводили до введення досліджуваних речовин і через 20 хв після введення;
 - аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних речовин змінювати поріг больової чутливості тварин порівняно з контрольною групою.
- Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми

Таблиця 1

Структура досліджуваних похідних 1,2,4-тріазолу

Шифр сполуки	Структурна формула	ЛД ₅₀ , мг/кг
ВК-32		2090
ПК-282		3340
ПК-293		1520
ПК-297		1060
ПК-370		1250
ПК-372		1660

Зміна больової чутливості в щурів під впливом похідних 1,2,4-тріазолу

Сполука (шифр)	Зміна порога больової чутливості, ΔV	Аналгетична активність, %
Контроль	$2,83 \pm 0,75$	–
Анальгін	$7,43 \pm 0,72^*$	162,54
ВК-32	$2,86 \pm 0,67^+$	1,06
ПК-274	$5,86 \pm 0,91^*$	107,07
ПК-282	$9,86 \pm 0,67^{*,+}$	248,41
ПК-293	$3,71 \pm 0,56^+$	31,09
ПК-297	$10,14 \pm 1,18^*$	258,30
ПК-370	$7,71 \pm 1,77^*$	172,44
ПК-372	$10,86 \pm 1,79^*$	283,74

Примітка. *Достовірність відмінностей відносно контрольної групи, $p < 0,05$;

+достовірність відмінностей відносно препарату порівняння, $p < 0,05$.

Statistica 7.0. Визначення достовірності міжгрупових відмінностей встановлювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично значимими при $P < 0,05$.

При виконанні експерименту дотримувалися правил і норм Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986 р.) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах, а також схваленої комісією з біоетики.

Результати та їх обговорення. У ході проведених досліджень було виявлено (табл. 2), що речовина ПК-282 (2- (3- (піридин-4-іл)-1Н-1,2,4-тріазол-5-іл) анілін) достовірно перевершувала препарат порівняння анальгін і проявляла аналгетичну активність відносно групи контролю на 248,41 %. Також речовини ПК-274, ПК-370, ПК-297 і ПК-372 проявляли аналгетичну активність на

рівні анальгину (на 107,07, 172,44, 258,30 і 283,74 % відповідно). Встановлено залежність структура–дія досліджуваних речовин: наявність аніліну в 5-му положенні в усіх досліджуваних сполуках призводила до появи аналгетичної дії, а приєднання по 3-му положенню піридину призводило до збільшення вираженості аналгетичної дії.

Висновки

За результатами проведеного експерименту, речовина ПК-282 проявила найбільшу аналгетичну активність, яка перевищувала анальгін. Сполуки ПК-274, ПК-370, ПК-297 і ПК-372 проявили активність на рівні препарату порівняння – анальгину. Отримані нами дані свідчать про наявність аналгетичної активності в ряду похідних 1,2,4-тріазолу, що створює передумови для подальшого поглибленого вивчення ефективності та безпечності найактивніших речовин.

1. Вернигородський С. В. Актуальні питання патоморфологічного вивчення гастропатій, що індуковані нестероїдними протизапальними засобами / С. В. Вернигородський // Світ медицини та біології. – 2014. – № 4 (46). – С. 186–190.
2. Журавлєва Л. В. НПВС-ассоциированные гастропатии в практике терапевта: пути профилактики и лечения с позиции доказательной медицины / Л. В. Журавлєва, Н. А. Лопина // Научно-практический журнал для лікарів та провізорів «Ліки України». – 2011. – № 1 (147). – С. 43–48.
3. Kūçūkgūzel Ş. G. Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones / Ş.G. Kūçūkgūzel, P. Çıkla-Sūzgūn // Eur J. Med Chem. – 2015. – № 97. – P. 830–870.
4. Design of 5-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles, -1,3,4-oxadiazoles, and -1,2,4-triazoles as orally-active, nonulcerogenic antiinflammatory agents / M. D. Mullican, M. W. Wilson, D. T. Connor [et al.] // J. Med Chem. – 1993. – № 36 (8). – P. 1090–1099.
5. Novel 1-[4-(Aminosulfonyl)phenyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives with remarkable selective COX-2 inhibition: design, synthesis, molecular docking, anti-inflammatory and ulcerogenicity studies / Abuo-Rahma Gel-D, M. Abdel-Aziz, N. A. Farag [et al.] // Eur J. Med Chem. – 2014. – № 83. – P. 398–408.

6. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of new 1,2,4-triazole derivatives / F. Ahmadi, M. R. Ghayahbashi, M. Sharifzadeh [et al.] // Med Chem. – 2014. – № 11 (1). – P. 69–76.
7. Analgesic activity of some 1,2,4-triazoleheterocycles clubbed with pyrazole, tetrazole, isoxazole and pyrimidine / S. Gajanan Khanage, A. Raju, P. Baban Mohite [et al.] // Adv Pharm Bull. – 2013. – № 3 (1). – P. 13–18.
8. New pyrazole derivatives containing 1,2,4-triazoles and benzoxazoles as potent antimicrobial and analgesic agents / A. M. Vijesh, A. M. Isloor, P. Shetty [et al.] // Eur J. Med Chem. – 2013. – № 62. – P. 410–415.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.

**І. М. Білай, Є. О. Михайлюк, О. В. Цис, К. П. Шабельник,
С. І. Коваленко, А. О. Остапенко**

Аналгетична активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі первинного фармакологічного скринінгу

Проблема болю й анальгезії займає одне з центральних місць у сучасній медицині, що свідчить про необхідність пошуку нових речовин з аналгетичними властивостями.

Мета дослідження – вивчити аналгетичну активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Аналгетичну активність визначали на білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 180–230 г. Лабораторні тварини були розподілені на наступні групи: контрольна група (тваринам внутрішньоочеревинно вводили 0,9 % розчин NaCl у дозі 0,1 мл на 1 кг маси тіла); група порівняння (вводили анальгін у дозі 50 мг/кг в/о у вигляді 10 % розчину); 3–9 групи (вводили досліджувані речовини – похідні 1,2,4-тріазолу у вигляді 10 % суспензії внутрішньоочеревинно в дозі 1/10 ЛД₅₀). Вивчення центрального компонента аналгетичної дії препаратів проводили відповідно до загальноприйнятої методики шляхом електроподразнення кінцівок імпульсним струмом напругою від 1 до 100 В. Вимірювання порога больової чутливості проводили до введення досліджуваних речовин і через 20 хв після введення.

Отримані дані свідчать про наявність аналгетичної активності у похідних 1,2,4-тріазолу. У результаті виконаного дослідження встановлено, що найбільшу активність відносно групи контролю проявляла сполука 2-(3-(піридин-4-іл)-1Н-1,2,4-тріазол-5-іл)анілін – ПК-282 (248,41 %), яка перевершувала препарат порівняння анальгін. При цьому речовини ПК-274, ПК-370, ПК-297 і ПК-372 проявляли аналгетичну активність на рівні анальгіна.

Проведений скринінг створює передумови для подальшого поглибленого вивчення ефективності та безпечності найактивніших речовин серед даного класу хімічних сполук і оцінки доцільності їх використання в практичній медицині.

Ключові слова: аналгетична активність, похідні 1,2,4-тріазолу

**І. М. Белай, Е. О. Михайлюк, А. В. Цыс, К. П. Шабельник,
С. И. Коваленко, А. А. Остапенко**

Анальгетическая активность производных 1,2,4-триазола на этапе первичного фармакологического скрининга

Проблема боли и анальгезии занимает одно из центральных мест в современной медицине, что свидетельствует о необходимости поиска новых веществ с аналгетическими свойствами.

Цель исследования – определение аналгетической активности производных 1,2,4-триазола на этапе первичного фармакологического скрининга.

Опыты проводили на белых крысах линии «Вистар» массой 180–230 г. Лабораторные животные были разделены на следующие группы: контроль (внутрибрюшинно вводили 0,9 % раствор NaCl); группа сравнения (внутрибрюшинно вводили анальгин в виде 10 % раствора в дозе 0,1 мл на 1 кг массы тела); 3–9 группы (вводили внутрибрюшинно исследуемые вещества в виде 10 % суспензии в дозе 1/10 ЛД₅₀). Изучение центрального компонента аналгетического действия препаратов проводили по общепринятой методике путем электрораздражения конечностей импульсным током напряжением от 1 до 100 В. Измерения порога болевой чувствительности проводили до и через 20 мин после введения исследуемых веществ.

Полученные данные свидетельствуют о наличии аналгетического действия у производных 1,2,4-триазола. В результате проведенного исследования установлено, что наивысшую активность относительно группы контроля проявляло вещество 2-(3-(пиридин-4-ил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)анилин – ПК-282 (248,41 %), которое превосходило препарат сравнения анальгин. При этом вещества ПК-274, ПК-370, ПК-297 (258,30 %) и ПК-372 (283,74 %) проявляли аналгетическую активность на уровне анальгина.

Проведенный скрининг создает условия для дальнейшего углубленного изучения эффективности и безопасности наиболее активных веществ среди данного класса химических соединений и оценки целесообразности их использования в практической медицине.

Ключевые слова: аналгетическая активность, производные 1,2,4-триазола

**I. M. Bilay, E. O. Mihayluk, O. V. Tsys, K. P. Shabel'nik,
S. I. Kovalenko, A. O. Ostapenko**

**Analgesic activity of 1,2,4-triazole derivatives in primary
pharmacological screening**

The problem of pain and analgesia occupies a central place in modern medicine, which indicates the need to find new substances with analgesic properties.

Aim of this investigation was to determine the level of the analgesic activity of 1,2,4-triazole derivatives at the stage of pharmacological screening.

Experiments were performed on a white Wistar rats weighing 180–230 g. Laboratory animals were divided into following groups: control (intraperitoneal injection of 0,9 % NaCl solution); reference group – with intraperitoneal injection of 10 % analgin solution in a dose of 0,1 ml per 1 kg of body weight; 3–9 groups were intraperitoneal injected the test substances in the form of a 10 % suspension at a dose of 1/10 LD₅₀. The study of the central analgesic action of the 1,2,4-triazole derivatives was performed by the standard procedure with electrical limb stimulation by pulse current voltage from 1 to 100. Measurement of pain threshold was carried out before the injection of the investigated substances and 20 min after injection.

The findings suggest that the derivatives of 1,2,4-triazole exhibit the analgesic activity. The study found that the most significant activity compared with the control group showed the substance 2-(3-(pyridin-4-yl)-1H-1,2,4-triazole-5-yl)aniline – PC-282 (248,41 %), which exceeded the reference drug analgin. The substances PC-274, PC-370, PC-297 and PC-372 showed analgesic activity at the level of analgin.

Screening creates preconditions for further in-depth study of the most active substances in this class of chemical compounds and evaluation of the efficacy, safety of the compounds and the feasibility of their use in practical medicine.

Key words: analgesic activity, 1,2,4-triazole derivatives

Надійшла: 2 листопада 2015 р.

Контактна особа: Білай І. М., доктор медичних наук, професор, кафедра клінічної фармації, фармакотерапії та УЕФ ФПО, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 96 795 98 28.
Електронна пошта: belay_im@mail.ru

М. Я. Головенко, І. П. Валіводзь, В. Б. Ларіонов

Участь фенобарбітал-індукованих ізоформ CYP450 у О-дезалкоксилюванні ^{14}C -етоксазепаму

Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського Національної академії наук України, м. Одеса

Ключові слова: етоксазепам, метаболізм, екскреція, цитохроми, фенобарбітал, індукція ензимів

Серед фармакокінетичних показників (всмоктування, розподіл, метаболізм, екскреція) чільне місце займають процеси метаболізму лікарських засобів. Необхідність визначення структури метаболітів та швидкості їх утворення зумовлено тим, що в результаті дії ферментів, які каталізують перетворення препаратів, може мати місце посилення або зменшення активності вихідної сполуки або виникнення побічної дії препарату. Зазначені явища необхідно враховувати при створенні та впровадженні інноваційних ліків та їхніх генеричних аналогів (доведення подібності методом біоеквівалентності).

Ключова роль у метаболізмі ліків належить ферментам суперсімейства цитохромів P450 (CYP), яких в організмі людини ідентифіковано 58 ізоформ. Причому, ізоферменти CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 каталізують близько 90 % реакцій окиснення лікарських засобів [1].

Активність монооксигеназної системи стосовно того чи іншого лікарського препарату визначається, головним чином, концентрацією та функціональною спроможністю, тобто активністю специфічних для нього ізоформ CYP. Інші компоненти монооксигеназної системи (NADPH-залежна редуктаза та цитохром b5), як правило, не є лімітуючими факторами в зазначених реакціях. Тому, індивідуальні особливості метаболізму лікарських сполук визначаються персональним профілем – концентрацією й активністю CYP [2]. Більше того, зазначена проблема пов'язана з взаємним впливом лікарських засобів, особливо при використанні їхніх комбінацій у фармакотерапії.

Мета дослідження – визначення ролі та оцінка участі фенобарбітал-індукованих ферментів CYP450 у метаболізмі ^{14}C -етоксазепаму, у зв'язку з доклінічними дослідженнями етера – 7-бром-5-феніл-3-етокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-она (етоксазепам),

Матеріали та методи. Досліди проводили на білих безпорідних мишах-самцях ($n = 4$, 20–25 г), яких утримували згідно з міжнародними та національними рекомендаціями з біоетики (Директива Європейського Союзу 2010/10/63 EU), на стандартній лабораторній дієті за природного світлового циклу з вільним доступом до води та їжі.

Для вивчення кінетики екскреції ^{14}C -етоксазепаму та його метаболітів ^{14}C -мічену сполуку (0,203 Кю/моль, синтезовано у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України кандидатом хімічних наук В. І. Павловським) вводили інтрагастралью мишам (у дозі 10 мг/кг) у фізіологічному розчині (суспензія в Tween 80). Тварин поміщали в метаболічні комірки та проводили відбір сечі та калу кожні 24 год протягом 5 діб. Після закінчення експерименту тварин витримували 2 доби за умов вільного доступу до води та їжі. Для індукції ізоформ цитохрому тваринам вводили інтрагастралью фенобарбітал (80 мг/кг) протягом 7 діб. По закінченні терміну індукції тваринам вводили ^{14}C -етоксазепам (10 мг/кг) й проводили відбір сечі та калу за наведеною вище схемою.

Для визначення вмісту ліпофільних метаболітів їх екстрагували хлороформом (4 рази по 4,0 см³), поєднані екстракти упарювали та розчиняли в певному об'ємі хлороформу (1,0–2,0 см³). Аліквоту отриманого розчину (0,5–1,0 см³) використовували для визначення вмісту індивідуальної речовини та окремих метаболітів методом препаративної тонкошарової радіохроматографії [3]. Хло-

роформний розчин наносили на хроматографічні пластини Sorbfil на відстані 5 см від краю та хроматографували спочатку в зворотному напрямку в чотирьохлористому вуглеці для видалення коекстрактивних речовин, а потім у прямому, у системі ацетонітрил : бензол : гексан : метанол (15 : 25 : 5 : 1), використовуючи як речовини-«свідки» немічену вихідну сполуку ($R_f = 0,53$) та її 3-гідроксипохідне ($R_f = 0,39$). Після хроматографування пластину проявляли під УФ-світлом, розрізали на зони, поміщали у флакони для рідинної сцинтиляційної фотометрії та заливали ксильно-спиртовим сцинтилятором. Уміст радіоактивних сполук у пробах визначали на рідинному сцинтиляційному фотометрі TRI CARB Canberra PACKARD 2700. Аналогічно проводили визначення вмісту ліпофільних метаболітів у калі після попереднього висушування, подрібнення та додавання 5 см³ дистильованої води.

Водне середовище, що залишилося після екстракції ліпофільних метаболітів, піддавали гідролізу β -глюкуронідазою (10 ЕД/см³) у 1 см³ ацетатного буферу (0,1 моль/л, рН 5,5) протягом 24 год при 37 °С. Уміст агліконів глюкуронідів визначали, екстрагуючи їх хлороформом (4 рази по 5 см³). Уміст залишкових (не гідролізованих) водорозчинних метаболітів в екскретах визначали у водній фазі, яку упарювали з додаванням мурашиної кислоти (1–2 см³), додавали 1 см³ Тритону Х-100, 10 см³ ксильно-спиртового сцинтилятора. Загальна кількість радіоактивного матеріалу дорівнювала сумі кількості окремих груп метаболітів. Отримані значення виражали як відсоток від введеної дози. Отримані дані оброблені за допомогою статистичного пакета програми MS Excel. Дані наведені як середнє та стандартне відхилення від середнього вибірки. Вірогідність відмінності даних за показниками екскреції кожної окремої групи метаболітів до та після введення фенobarбіталу оцінювали за допомогою критерію χ -квадрат.

Результати та їх обговорення. Визначення селективності ізоформ цитохромів Р450, що беруть участь в окисненні молекули лікарського засобу, потребує відповідних методів їхнього аналізу в

біологічному матеріалі. Існує низка методів вимірювання концентрації та активності СYP у біологічних об'єктах:

а) диференціальна спектроскопія, б) оцінка рівня експресії СYP за кількістю відповідної мРНК, в) імунологічні методи аналізу, г) методи протеомного аналізу СYP (електрофоретичні методи попереднього розділення білків суперсімейства СYP у протеоміці), д) мас-спектрометричний аналіз [4]. У експериментальній фармакології з успіхом використовують інгібіторний аналіз за допомогою хімічних сполук (маркерів), що впливають на вміст і активність цитохромів Р450, підвищуючи функціональну здатність (індукція), або знижуючи її (інгібування). Серед них найвідомішими індукторами є діоксин (ТХДД), 3-метилхолантрен, фенobarбітал, етанол, ацетон, ізоніазид, дексаметазон, тріацетил олеандоміцин.

Фенobarбітал (ФБ) є прототипом великої групи структурно неспоріднених індукторів цитохрому Р450, які впливають на певні клітинні процеси та викликають посилення експресії різних генів. ФБ індукуює не тільки підродина цитохромів: СYP2A, СYP2B, СYP2C, СYP2H, СYP3A, СYP6A, але й альдегіддегідрогеназу, епоксидгідролазу, NADPH-цитохром С редуктазу, УДФ-глюкуронілтрансферази (УДФТ) і деякі глутатіон S-трансферази. При цьому посилюється також проліферація гладкого ендоплазматичного ретикулу та збільшується вага печінки.

Отже, якщо в експерименті спостерігається зміна фармакокінетичного (метаболічного) профілю сполуки на тлі введення тваринам ФБ, то таким непрямим методом можна ідентифікувати ферменти, що прискорюють відповідний процес.

Для препаратів похідних 1,4-бенздіазепінів основними шляхами їхнього метаболізму є N1-деалкілювання (СYP2C9, 2C19, 2B6, 3A4, 3A5) та С3-гідроксилювання (3A4, 2C19) з наступним утворенням глюкуронідів [5]. Однак відсутність замісника в положенні «1» та наявність хімічно стабільного етоксильного радикала в положенні «2» молекули етоксазепаму визначає неможливість перебігу цих процесів.

Після інтрагастрального введення

^{14}C -етоксазепаму з організму мишей виводиться ($13,2 \pm 2,3$) % загальної кількості метаболітів (від введеної дози), що вказує на високу інтенсивність процесів елімінації мітки з його молекули (таблиця), при цьому ренальний шлях виведення є менш ефективним, ніж процес виведення з калом ($4,9 \pm 1,1$) та ($8,2 \pm 1,3$) % відповідно). Разом з тим, константи елімінації цих груп метаболітів мають однаковий порядок та низьке значення (таблиця). Статистично недостовірні відмінності між цими показниками, що визначені для сечі та калу, свідчать про майже однакову швидкість елімінації цих груп метаболітів обома екскреторними шляхами. На радіохроматограмах ліпофільних екстрактів наявність вихідної (R_f) сполуки реєструється лише протягом першої доби, тоді як у подальшому збільшується кількість більш гідрофільних радіоактивних метаболітів, що представлені гідроксильованими похідними (рис. 1).

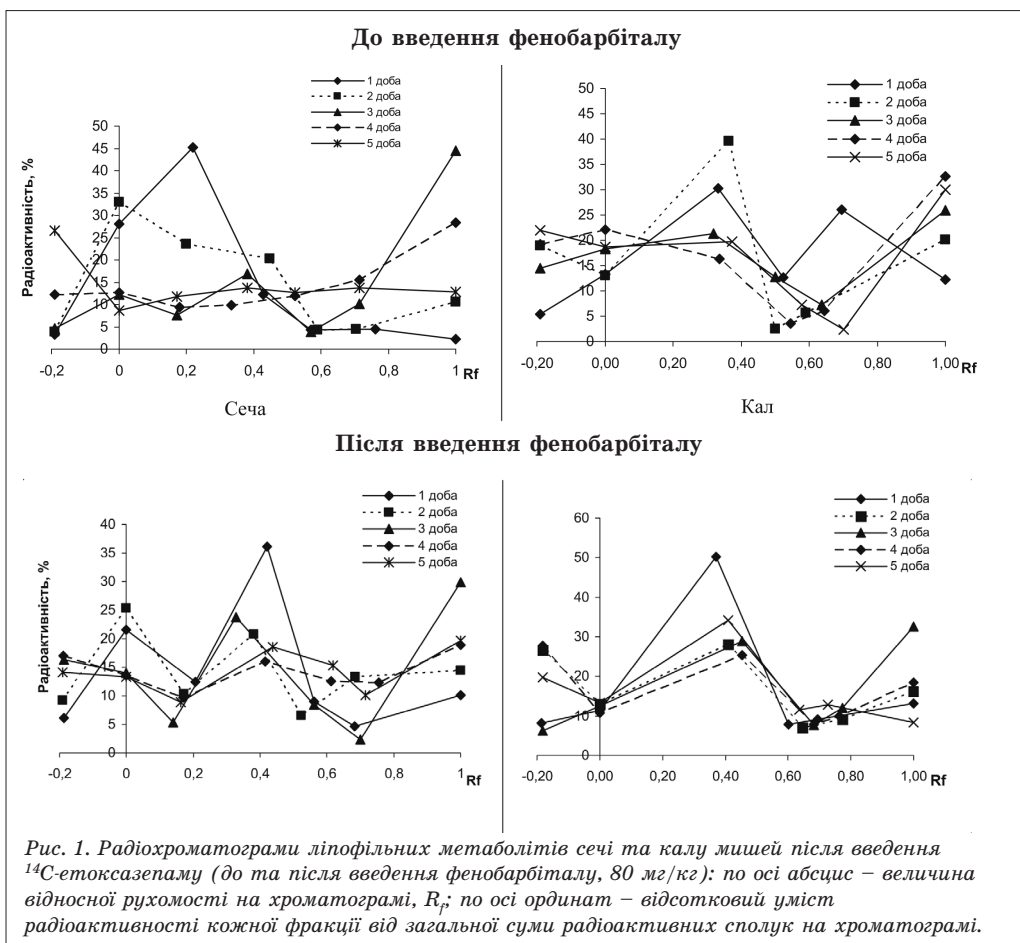
Попереднє введення тваринам ФБ призводить до збільшення виведення загальної кількості радіоактивних сполук ($17,5 \pm 3,8$) % та перерозподілу співвідношення різних груп метаболітів. При цьому загальна кількість метаболітів, що не гідролізуються глюкуронідазою, залишається незмінною. Помітно (рис. 2), що попереднє введення фенobarбіталу та подальша індукція ним цитохромного комплексу впливає на шлях виведення сполуки. Так, значно підвищується виведення з калом сполук другої фази метаболізму – гідрофільних метаболітів (переважно глюкуронідів).

Низька кількість виведення загального радіоактивного матеріалу з організму тварин після інтрагастрального введення етоксазепаму ($13,2 \pm 2,3$) % свідчить про інтенсивну біотрансформацію цієї сполуки, що в значному ступені спрямована на елімінацію ізотопної мітки з положення «3». Оскільки введення ФБ призводить до індукції окремих

Таблиця

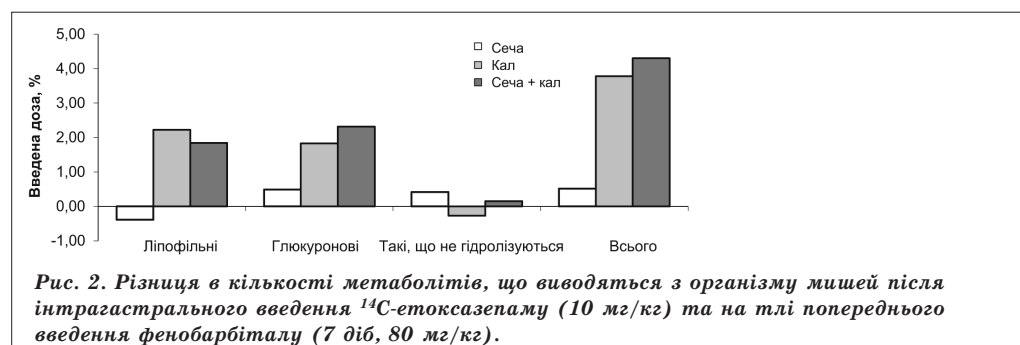
Параметри екскреції загальної кількості метаболітів та їхніх груп (ліпофільні, глюкуронові, такі, що не гідролізуються), які виводяться з організму мишей після інтрагастрального введення етоксазепаму (10 мг/кг) до та після попереднього введення фенobarбіталу, $M \pm m$ ($n = 4$)

Метаболіти	Сеча		Кал		Загальні	
	$Q_{\max}$, % від введеної дози	k_{el} , год $^{-1}$	$Q_{\max}$, % від введеної дози	k_{el} , год $^{-1}$	$Q_{\max}$, % від введеної дози	k_{el} , год $^{-1}$
До введення фенobarбіталу						
Ліпофільні	$2,2 \pm 0,2$	$0,054 \pm 0,004$	$2,5 \pm 0,5$	$0,047 \pm 0,009$	$4,7 \pm 0,7$	$0,050 \pm 0,007$
Глюкуронові	$0,8 \pm 0,2$	$0,042 \pm 0,009$	$2,8 \pm 0,5$	$0,023 \pm 0,005$	$3,6 \pm 0,7$	$0,030 \pm 0,006$
Такі, що не гідролізуються	$1,9 \pm 0,6$	$0,049 \pm 0,015$	$2,9 \pm 0,2$	$0,026 \pm 0,002$	$4,9 \pm 0,9$	$0,034 \pm 0,009$
Усього	$4,9 \pm 1,1$	$0,048 \pm 0,010$	$8,2 \pm 1,3$	$0,029 \pm 0,005$	$13,2 \pm 2,3$	$0,036 \pm 0,007$
Після введення фенobarбіталу						
Ліпофільні	$1,8 \pm 0,2$	$0,036 \pm 0,004$	$4,7 \pm 0,4$	$0,019 \pm 0,001$	$6,5 \pm 0,5$	$0,025 \pm 0,003$
Глюкуронові	$1,3 \pm 0,7$	$0,049 \pm 0,027$	$4,7 \pm 1,2$	$0,034 \pm 0,009$	$5,9 \pm 1,7$	$0,040 \pm 0,019$
Такі, що не гідролізуються	$2,4 \pm 0,6$	$0,034 \pm 0,008$	$2,7 \pm 0,7$	$0,011 \pm 0,003$	$5,1 \pm 1,3$	$0,017 \pm 0,004$
Усього	$5,5 \pm 1,5$	$0,039 \pm 0,016$	$12,1 \pm 2,4$	$0,018 \pm 0,004$	$17,5 \pm 3,8$	$0,024 \pm 0,010$



ізоформ цитохрому [6], можливо було б очікувати інтенсифікації цього процесу та, відповідно, зменшення загальної кількості метаболітів. Втім, підвищення суми радіоактивних сполук майже на 4 % хоча не є статистично вірогідним, однак, демонструє вплив даних ферментних систем на утворення окремих груп метаболітів етоксазепаму, зокрема, збільшення кількості в калі суми ліпофільних сполук та глюкуронідів. Попередніми дослідженнями [7] було доведе-

но, що метаболізм етоксазепаму перебігає через утворення 3-гідроксипохідного з подальшим звуженням семичленного гетероциклічного кільця до шестичленного внаслідок елімінації атома вуглецю з положення «3», що пояснює низьку кількість радіоактивних сполук, які реєструються. Разом з тим, перерозподіл між кількістю ліпофільних сполук у сечі та калі може бути зумовлений внутрішньоклітинною локалізацією основних ферментних систем, що беруть



участь у цьому процесі. Так, ізоформи CYP450 (після індукції фенобарбіталом це CYP3A4 – ізоформа з високим ступенем індукції (внесок у метаболізм ліків сягає 34 %), CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 [8]) локалізовані переважно в мітосомальній мембрані, оскільки їхня функція спрямована на функціоналізацію (гідроксилювання) ліпофільних сполук. Подальший етап кон'югації перебігає або за допомогою УДФГТ, що утворює мультиферментний комплекс у ендоплазматичному ретикулумі [9], або в цитозолі, де знаходиться інший фермент другої фази метаболізму – сульфотрансфераза, так як продукти їхньої реакції є водорозчинними сполуками. Оскільки на тлі попереднього введення ФБ спостерігається не зменшення загальної кількості радіоактивного матеріалу, а навпаки, їхнє збільшення, ймовірно є те, що вказані ізоформи цитохрому більш ефективно здійснюють гідроксилювання субстрату (етоксазепам) за положенням в ароматичних кільцях, ніж за положенням «3» гетерокільця (фенольний гідроксил), а утворені метаболіти ефективніше взаємодіють з УДФГТ. Також однією з властивостей похідних 1,4-бенздіазепіну є їхня кишково-печінкова циркуляція, завдяки якій при вторинному гідролізі глюкуронових кон'югатів у просвіті кишок збільшується кількість ліпофільних метаболітів. Це пояснює встановлений факт збільшення ліпофільних сполук, які виводяться з калом, та збільшення водорозчинних сполук у сечі, що не гідролізуються (рис. 2).

Попереднє введення ФБ також призводить до індукції ензимів, що здійснюють

О-деметилування [8], на підставі чого слід було б очікувати зменшення кількості виведеного загального радіоактивного матеріалу (наявність алкоксильної групи в молекулі етоксазепаму). Однак наведена зміна у співвідношенні груп певних метаболітів, їхньої кількості, що виводиться з калом та сечею окремо, та відносний склад радіоактивних метаболітів на радіохромограмах свідчать, що ензими цієї групи не мають суттєвого впливу на загальний напрямок біотрансформації етоксазепаму. Також слід відмітити, що кінетичні показники виведення етоксазепаму та його метаболітів (константи елімінації, таблиця) не мають статистично вірогідних відмінностей – цей факт також підтверджує відсутність впливу індукованих ізоформ на напрямок та ефективність метаболізму етоксазепаму.

Висновки

1. Ізоформи цитохрому P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8), активність яких збільшується при введенні фенобарбіталу, беруть незначну участь у метаболізмі ^{14}C -етоксазепаму, підвищуючи кількість загального радіоактивного матеріалу, що виводиться, з $(13,2 \pm 2,3) \%$ до $(17,5 \pm 3,8) \%$.
2. Напрямок зміни кількості окремих груп ліпофільних та гідрофільних метаболітів у сечі та калі при індукції ізоформ цитохрому вказує на інтенсифікацію процесів ароматичного гідроксилювання та відсутність суттєвого впливу реакцій О-дезалкоксилування на загальний процес метаболізму етоксазепаму.

1. Головенко Н. Я. Физико-химическая фармакология / Н. Я. Головенко. – Одесса : Астропринт, 2004. – 720 с.
2. Головенко Н. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах / Н. Я. Головенко. – Киев : Наук. думка, 1981. – 220 с.
3. Зиньковский В. Г. Оптимизация экстракции лекарственных веществ из биологических сред / Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. // Хим.-фарм. журн. – 1983. – Т. 17, № 3. – С. 361–366.
4. Москалева Н. Е. Современные методы анализа цитохромов P450 / Москалева Н. Е., Згода В. Г. // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, Вып. 6. – С. 617–634.
5. Otani K. Cytochrome P450 3A4 and Benzodiazepines / Otani K. // Seishin Shinkeigaku Zasshi. – 2003. – № 105, V. 5. – P.631–642.
6. Czekaj P. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes / Czekaj P. // Acta Biochim Pol. – 2000. – V. 47, № 4. – P. 1093–1105.

7. Механізми реакцій метаболізму етоксазепаму в гомогенатах печінки щурів / Головенко М. Я., Ларіонов В. Б., Валиводзь І. П., Жукова Н. О. // Запорізький мед. журн. – 2015. – № 4 (91). – С. 100–104.
8. Ляхович В. В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков / В. В. Ляхович, И. Б. Цырлов. – Новосибирск : Наука, 1981. – С. 21.
9. Vainio H. Linkage of microsomal drug oxidation and glucuronidaion/ Vainio H. // In.: Proc. 6 th Int. Congr. Pharmacol. Oxford. – 1976. – V. 6. – P. 53–56.

М. Я. Головенко, І. П. Валиводзь, Н. О. Жукова, В. Б. Ларіонов

Участь фенобарбітал-індукованих ізоформ CYP450 у О-дезалкоксилюванні ¹⁴С-етоксазепаму

Мета дослідження – визначення ролі та оцінка участі фенобарбітал-індукованих ферментів у метаболізмі ¹⁴С-етоксазепаму при інтрагастральному введенні.

Радіоактивні сполуки виділяли двофазною екстракцією хлороформом з екскретів мишей, яким вводили ¹⁴С-етоксазепам (10 мг/кг, інтрагастрально) окремо, або після попереднього введення фенобарбіталу (80 мг/кг, 7 дб). Уміст індивідуальної речовини та окремих метаболітів визначали препаративною тонкошаровою радіохроматографією та рідинною сцинтиляційною фотометрією.

Встановлено, що інтрагастральний спосіб введення речовини характеризується повільністю процесів виведення певних груп метаболітів, а ренальний шлях виведення ¹⁴С-етоксазепаму є менш ефективним, ніж процес виведення з калом ($4,9 \pm 1,1$) та ($8,2 \pm 1,3$) % відповідно). На радіохроматограмах ліпофільних екстрактів наявність вихідної сполуки реєструється лише протягом першої доби експерименту, у подальшому збільшується кількість більш гідрофільних метаболітів (гідроксильовані похідні).

Попереднє введення тваринам фенобарбіталу призводить до збільшення виведення кількості загальних радіоактивних сполук та перерозподілу співвідношення різних груп метаболітів – статистично невірогідно збільшується загальна кількість ліпофільних метаболітів (з ($4,7 \pm 0,7$) до ($6,5 \pm 0,5$) %) та глюкуронових кон'югатів (з ($3,6 \pm 0,7$) до ($5,9 \pm 1,7$) %).

Ізоформи цитохрому Р450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8), активність яких збільшується при введенні фенобарбіталу, беруть незначну участь у метаболізмі ¹⁴С-етоксазепаму, підвищуючи кількість загального радіоактивного матеріалу, що виводиться, з ($13,2 \pm 2,3$) % до ($17,5 \pm 3,8$) %. Відмічається інтенсифікація процесів ароматичного гідроксилювання та відсутність суттєвого впливу реакцій О-дезалкоксилювання на загальний процес метаболізму етоксазепаму.

Ключові слова: етоксазепам, метаболізм, екскреція, цитохроми, фенобарбітал, індукція ензимів

Н. Я. Головенко, І. П. Валиводзь, Н. А. Жукова, В. Б. Ларіонов

Участие фенобарбитал-индуцированных изоформ CYP450 в О-дезалкоксилировании ¹⁴С-этоксазепама

Цель исследования – определение роли и оценка участия фенобарбитал-индуцированных изоформ CYP450 в метаболизме ¹⁴С-этоксазепама при интрагастральном введении.

Радиоактивные соединения выделяли двухфазной экстракцией хлороформом из экскретов мышей, которым вводили ¹⁴С-этоксазепам (10 мг/кг, интрагастрально) отдельно, или после предварительного введения фенобарбитала (80 мг/кг, 7 сут). Содержание исходного соединения и отдельных метаболитов определяли препаративной тонкослойной радиохроматографией и жидкостной сцинтилляционной фотометрией.

Установлено, что интрагастральный способ введения вещества характеризуется замедлением процессов выведения некоторых групп метаболитов, а ренальный путь выведения ¹⁴С-этоксазепама менее эффективен, чем процесс выведения с калом ($4,9 \pm 1,1$) и ($8,2 \pm 1,3$) % соответственно). На радиохроматограммах липофильных экстрактов наличие исходного соединения регистрируется только в первые сутки эксперимента, в дальнейшем увеличивается количество более гидрофильных метаболитов (гидроксильированные производные).

Предварительное введение животным фенобарбитала приводит к увеличению выведения количества общих радиоактивных соединений и перераспределению соотношения разных групп метаболитов – статистически недостоверно увеличивается общее количество липофильных метаболитов (с ($4,7 \pm 0,7$) до ($6,5 \pm 0,5$) %) и глюкуроновых конъюгатов (с ($3,6 \pm 0,7$) до ($5,9 \pm 1,7$) %).

Изоформы цитохрома Р450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8), активность которых увеличивается при введении фенобарбитала, принимают незначительное участие в метаболизме ¹⁴С-этоксазепама, повышая количество выводимого радиоактивного материала с ($13,2 \pm 2,3$) % до ($17,5 \pm 3,8$) %. Отмечается интенсификация процессов ароматического гидроксирования и отсутствие существенного влияния реакций О-дезалкоксилирования на общий процесс метаболизма этоксазепама.

Ключевые слова: этоксазепам, метаболизм, экскреция, цитохромы, фенобарбитал, индукция ферментов

Participation of phenobarbital-induced CYP450 isoforms in desalcoxylation of ^{14}C -ethoxazepam

The aim of the study was to evaluate the role and participation of phenobarbital-induced CYP450 isoforms in metabolism of ^{14}C -ethoxazepam after intragastral administration.

Isotope-labeled compounds were extracted with chlorophorm from mice excretes (feces and urine) after administration of ^{14}C -ethoxazepam (10 mg/kg) alone or after previous treatment with phenobarbital (80 mg/kg, 7 days). Unchanged compound and its metabolites were quantified using preparative thin layer radiochromatography and liquid scintillation photometry.

It was found that after intragastral administration excretion of different metabolite's groups changed while renal excretion was less effective than with feces ($4,9 \pm 1,1$) and ($8,2 \pm 1,3$) % correspondingly). Lipophilic extracts radiochromatograms demonstrate the presence of unchanged substance only during the first 24 hours after administration; further the quantity of more hydrophilic metabolites (hydroxylated derivatives) increased.

Preliminary phenobarbital administration leads to enlarging in total radioactivity excretion and redistribution of different metabolite's groups: there was statistically unreliably increase the quantity of lipophilic metabolites (from $(4,7 \pm 0,7)$ to $(6,5 \pm 0,5)$ %) and glucuronic conjugates (from $(3,6 \pm 0,7)$ to $(5,9 \pm 1,7)$ %).

Phenobarbital-induced cytochrome P450 isoforms (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8) participate negligibly in ^{14}C -ethoxazepam metabolism, increasing the total radioactivity excreted from $(13,2 \pm 2,3)$ % до $(17,5 \pm 3,8)$ %. There are both intensification of aromatic hydroxylation and absence of essential influence of O-desalcoxylation on the total ethoxazepam metabolism.

Key words: ethoxazepam, metabolism, excretion, cytochromes, phenobarbital, enzyme induction

Надійшла: 11 листопада 2015 р.

Контактна особа: Головенко Микола Якович, доктор біологічних наук, професор, академік НАМН України, відділ фізико-хімічної фармакології, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАНУ, буд. 86, Люстдорфська дорога, м. Одеса, 65080. Тел.: + 38 0 48 766 23 93.
Електронна пошта: n.golovenko@gmail.com

M. L. Dronova

The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenoxy]-3-(*n*-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride under *in vivo* models

SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Key words: antibacterial activity, experimental bacterial infection, therapeutic efficacy, aryl aliphatic aminoalcohols

The continuous spread of resistant pathogens as well as decrease of the efficacy of current antimicrobial chemotherapy indicates the need of research and development of novel active compounds.

There are varieties of potential antimicrobials amongst such chemical classes as peptides [1–5], antisense compounds [6], pleuromutilins [7], aminobenzimidazoles [8], pyrrolidine diones [9], bisimidazolinyllindoles [10], lantibiotics [11], bis-indoles [12], 3-methoxybenzamides [13], derivatives of barbituric [14], *N*-alkyl urea hydroxamic acids [15], etc. One of the promising chemical classes is aryl aliphatic aminoalcohols, possessing a pronounced antibacterial properties *in vitro* [16, 17]. However, *in vitro* results yet do not show the clinical perspectives of potential new drugs.

The aim of this study was to investigate the therapeutic efficacy of aryl aliphatic aminoalcohol derivative 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(*N*-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride (compound KVM-194) using *in vivo* models of generalized and local bacterial infection.

Materials and methods. Therapeutic efficacy of aryl aliphatic aminoalcohol derivative KVM-194 was evaluated in models of generalized infection, topical inflammatory process and bacterial conjunctivitis.

Experimental generalized infection was reproduced in white nonlinear mice (18,0–20,0 g weigh) [18–20]. The overnight culture of *Pseudomonas aeruginosa* was injected intraperitoneally in dos-

age $4 \cdot 10^7$ CFU/animal. The compound was administered as follows:

- therapeutic regimen – a single intraperitoneal administration of compound 30 min after infection at dosages, equal to 0,1 LD₅₀ (51,5 mg/kg), 0,01 LD₅₀ (5,15 mg/kg) and 0,001 LD₅₀ (0,515 mg/kg) [21];
- preventive regimen – single intraperitoneal administration 24 h prior to infection at dosages, equal to 0,01 LD₅₀ and 0,001 LD₅₀.

Clinical signs of infection and survival rate were registered in animals of experimental and control groups. The presence of *P. aeruginosa* was confirmed by its isolation from blood samples and subsequent identification.

The efficacy of compound was examined as well on the rabbit models of topical inflammatory process (*n* = 10) and conjunctivitis (*n* = 9), caused by *Staphylococcus aureus*. Chinchilla rabbits (2,0–2,5 kg weight) were used for these experiments.

Topical inflammatory process was reproduced by intradermal injection of 0,5 ml ($1 \cdot 10^9$ CFU) of *S. aureus* inoculum, followed by skin scarification. Compound KVM-194 was applied on the inflamed areas as a 0,25 % hydrophilic ointment (ointment base contained PEO-400 and PEO-1500 in a ratio of 4:1) 2 times a day. The first application was made the next day post infection. Inflamed skin areas of animals of control group were moistened with sterile saline.

Bacterial conjunctivitis was reproduced on background of topical anesthesia by 0,5 % solution of proxymetacaine hydrochloride. Both eyes were administered 2 drops of 2,5 % ammonia solution and 0.1 ml of *S. aureus* inoculum ($1 \cdot 10^9$ CFU/ml) 30 min after [18–20].

Animals were divided into three groups of 3 animals: the first group was treated by 0,1 % solution of compound KVM-194; the second group was treated by 30 % solution of sodium sulfacil («Sulfacil», «JSC "Farmak»») as a reference; and finally, the third group included control animals (sterile saline only).

The examination was graded for clinical signs of conjunctivitis (ocular discharge, hyperemia and edema of conjunctiva) using the severity scale (0–3 points).

The presence of *S. aureus* was confirmed by its isolation from discharge samples and subsequent identification. Treatment was started 5 h after infection. Eyes were washed with sterile saline before each instillation of KVM-194 or «Sulfacil» solutions. Drug administration was performed 5 times a day every 2 h for 7 days.

Animal experiments were carried out according to the Directive 2010/63/EU [22].

Fisher's exact test and Mann-Whitney criteria were used for statistical analysis in the «StatSoft Statistica 6.0» [23].

Results and discussion. Antimicrobial activity of compound KVM-194 *in vivo*

was studied on the murine model of generalized *P. aeruginosa* infection. The data obtained are shown in Table 1 and Table 2.

Clinical signs of infection (weakness, tail and ear cyanosis) were noted on the 1st day post infection. All animals were observed during 14 days and mortality was registered to the 3rd day.

Mortality rate of the control animals in the study of therapeutic efficacy was 50 %. Administration of KVM-194 in the dosage, equal to 0,1 LD₅₀ did not improve the survival, furthermore, resulted in 100 % lethality. This effect could be due to distinct bactericidal properties of compound. Simultaneous lysis of bacteria led to the release of a significant amount of endotoxins, and consequently – to animal death. These effects are also observed in officinal bactericidal antibiotics [24].

Single intraperitoneal injection of 0,01 LD₅₀ of KVM-194 prevented the death of 70 % of infected animals, but showed no statistically significant differences comparatively to control. Compound at a 0,001 LD₅₀ demonstrated no advantages; mortality rate was equal to control (50 %).

Table 1

Therapeutic efficacy of the compound KVM-194 in a generalized P. aeruginosa infection

Group	Dosage	Animals	
		Total	Survived
KVM-194	51,5 mg/kg (0,1 LD ₅₀)	10	0*
	5,15 mg/kg (0,01 LD ₅₀)	10	7
	0,515 mg/kg (0,001 LD ₅₀)	10	5
Control	–	10	5

Note. **p* < 0,05 comparatively to control.

Table 2

Preventive efficacy of the compound KVM-194 in a generalized P. aeruginosa infection

Group	Dosage	Animals	
		Total	Survived
KVM-194	5,15 mg/kg (0,01 LD ₅₀)	10	5*
	0,515 mg/kg (0,001 LD ₅₀)	10	0
Control	–	10	0

Note. **p* < 0,05 comparatively to control.

Further studies revealed preventive efficacy of KVM-194 (Tab. 2).

The data obtained suggest, that mortality rate in this experiment was 100 %. Single administration of KVM-194 at a dosage 0,01 LD₅₀ reduced lethality to 50 %. Compound at a 0,001 LD₅₀ demonstrated no advantages; mortality rate was equal to control (100 %).

Thus, investigation of the compound KVM-194 action on the model of generalized *P. aeruginosa* infection showed the distinct preventive efficacy of compound at a dosage equal to 0,01 LD₅₀.

The rabbit model of topical inflammatory process was used to investigate the therapeutic efficacy of compound in the case of topical administration on the skin (Tabl. 3). Hyperemia, edema and infiltration of affected areas were observed 24 h post infection. Abscess formation was registered on 3rd–4th day of experiment in treated animals, and on 5th–6th day – in untreated control.

Administration of KVM-194 ointment on the skin surface 2 times a day reduced hyperemia and accelerated abscess forma-

tion and rupture. Skin necrosis and wound were not observed. Complete recovery was noted in 8 days for treated animals, while signs of inflammation in control animals were registered for 16 days. Statistically significant differences in size of inflammation zones between control and treated animals were registered starting from the 1st day of experiment.

Bacterial conjunctivitis model was used to investigate the therapeutic efficacy of topical administration of compound on the mucosa. Inflammation of conjunctiva of untreated animals lasted for 7 days (Tabl. 4).

Instillation of KVM-194 solution, as well as instillation of «Sulfacil», led to reduction of inflammation symptoms in conjunctiva of experimental animals, starting from the 1st day. Complete recovery of treated animals was registered on the 4th day of the experiment.

The experimental data suggest the efficacy of 0,1% solution of KVM-194 on the model of staphylococcal conjunctivitis, compound did not concede the reference drug «Sulfacil».

Table 3

Therapeutic efficacy of 0,25 % KVM-194 ointment on the model of topical inflammatory process caused by S. aureus, M ± m

Parameter	Term of observation					
	Day 1	Day 3	Day 6	Day 8	Day 14	Day 16
Hyperemia zone, sm ²						
- treated	4,14 ± 1,04*	1,15 ± 0,20*	0,73 ± 0,19*	0*	0*	0
- control	9,67 ± 2,37	2,08 ± 0,46	1,75 ± 0,20	1,80 ± 0,29	0,85 ± 0,07	0
Infiltrate, sm ²						
- treated	1,12 ± 0,18	1,03 ± 0,18*	0,73 ± 0,19*	0*	0*	0
- control	1,10 ± 0,24	2,23 ± 0,22	1,75 ± 0,20	1,80 ± 0,29	0,85 ± 0,07	0

Notes. *p < 0,05 comparatively to control group; M – mean value; m – standard error.

Table 4

Therapeutic efficacy (total score) of a 0,1 % KVM-194 solution on a model of staphylococcal conjunctivitis

Group	Prior to treatment	Term of observation				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7
I group (KVM-194)	36	26	9	6	0	0
II group («Sulfacil»)	36	28	10	6	0	0
III group (Control)	36	36	36	36	20	0

Conclusion

Our studies have shown a distinct preventive efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(N-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride (compound KVM-194) on the murine model of generalized *P. aeruginosa* infection at a dosage, equal to 0,01 LD₅₀. Aryl aliphatic aminoalcohol derivative also demonstrated therapeutic effect on

the rabbit models of topical inflammatory process and conjunctivitis, caused by *S. aureus*; administrations of compound reduced symptoms and shorten the course of the pathological processes. The data obtained suggest prospects of further animal studies to establish the spectrum of *in vivo* activity and rational dosage regimens of the compound KVM-194.

1. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains / M. Pastagia, C. Euler, P. Chahales [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55, № 2. – P. 738–744.
2. Battacin (Octapeptin B5), a new cyclic lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant Gram-negative bacteria / C. D. Qian, X. C. Wu, Y. Teng [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – V. 56, № 3. – P. 1458–1465.
3. Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista* / K. Wang, J. Yan, R. Chen [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – № 56. – P. 3318–3323.
4. Strand length-dependent antimicrobial activity and membrane-active mechanism of arginine- and valine-rich β -hairpin-like antimicrobial peptides / N. Dong, Q. Ma, A. Shan [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – № 56. – P. 2994–3003.
5. Mechanism of bactericidal activity of microcin L in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* / N. Morin, I. Lanneluc, N. Connil [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 5, № 3. – P. 997–1007.
6. Bobbarala V. A search for antibacterial agents / Bobbarala V. – InTech, 2012. – 344 p. – Available online: <http://www.intechopen.com/books/a-search-for-antibacterial-agents>
7. De Souza Mendes C. U. Pipeline of known chemical classes of antibiotics / C. U. De Souza Mendes, A. M. De Souza Antunes // *Antibiotics*. – 2013. – № 2. – P. 500–534.
8. *In vitro* characterization of the antibacterial spectrum of novel bacterial type II topoisomerase inhibitors of the aminobenzimidazole class / N. Mani, C. H. Gross, J. D. Parsons [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – V. 50, № 4. – P. 1228–1237.
9. Novel bacterial acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors with antibiotic efficacy *in vivo* / C. Freiberg, J. Pohlmann, P. G. Nell [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – V. 50, № 8. – P. 2707–2712.
10. Novel broad-spectrum bis-(imidazolylindole) derivatives with potent antibacterial activities against antibiotic-resistant strains / R. G. Panchal, R. L. Ulrich, D. Lane [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – V. 53, № 10. – P. 4283–4291.
11. Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Gram-positive pathogens / D. Jabés, C. Brunati, G. Candiani [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55, № 4. – P. 1671–1676.
12. Comparative *in vitro* activity profiles of novel bis-indole antibacterials against Gram-positive and Gram-negative clinical isolates / M. M. Butler, J. D. Williams, N. P. Peet [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54, № 9. – P. 3974–3977.
13. An improved small-molecule inhibitor of FTSZ with superior *in vitro* potency, drug-like properties, and *in vivo* efficacy / N. R. Stokesa, N. Bakera, J. M. Bennett [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – V. 57, № 1. – P. 317–325.
14. Miller A. A. Discovery and characterization of QPT-1, the progenitor of a new class of bacterial topoisomerase inhibitors / A. A. Miller, G. L. Bundy, J. E. Mott // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2008. – V. 52, № 8. – P. 2806–2812.
15. N-alkyl urea hydroxamic acids as a new class of peptide deformylase inhibitors with antibacterial activity / C. J. Hackbarth, D. Z. Chen, J. G. Lewis [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – V. 46, № 9. – P. 2752–2764.
16. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol quaternary salts / Yu. V. Korotkii, N. A. Vrynchanu, M. L. Dronova [et al.] // *Pharmaceutical Journal*. – 2015. – № 1. – P. 56–61.
17. Dronova M. L. Susceptibility of *staphylococcus aureus* biofilms to arylaliphatic aminoalcohols / M. L. Dronova // *Universum: Medicine and pharmacology*. – 2015. – № 2. – Available online: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1932>.
18. Sarkisov D. S. Reproduction of human diseases in the experiment / D. S. Sarkisov, P. I. Remezov. – M. : Medicine, 1960. – 780 p.
19. Lazarev N. V. Disease reproduction in animals. – M. : Medgis, 1954. – 396 p.
20. Methods of experimental chemotherapy / [Ed. H. N. Pershin] – M. : Medicine, 1971. – 541 p.

21. Pharmacological and toxicological properties of 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy-3-amino-2-propanols and its quaternary salts / M. L. Dronova, N. A. Vrynchanu, Yu. V. Korotkii [et al.] // «The Forth European Conference on Biology and Medical Sciences», (13 January 2015). – Vienna, 2015. – P. 144–154.
22. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes / Official Journal of European Union. – 2010. – L. 276. – P. 33–79
23. Khalafyan A. A. Statistica 6. Statistical analysis of the data / Khalafyan A. A. – M.: Binom-Press, 2007. – 512 p.
24. Bactericidal Antibiotics temporarily increase inflammation and worsen acute kidney injury in experimental sepsis / Peng Z.-Y., Wang H.-Z., Srisawat N. [et al.] // Critical care medicine. – 2012. – V. 40, № 2. – P. 538–543.

М. Л. Дронова

Терапевтична ефективність 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлориду на моделях *in vivo*

Похідні арилаліфатичних аміноспиртів – новий перспективний клас сполук, що проявляють виразну антимікробну активність в умовах *in vitro*. Мета дослідження – встановлення терапевтичної ефективності похідного арилаліфатичних аміноспиртів 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлориду (шифр KBM-194) на моделі генералізованої інфекції та при місцевих ураженнях бактеріального генезу.

Експериментальну генералізовану інфекцію відтворювали на білих нелінійних мишах з використанням *Pseudomonas aeruginosa*. Інфікуюча доза складала $4 \cdot 10^7$ КУО/тварину. При моделюванні місцевого патологічного процесу кролям внутрішньошкірно вводили $1 \cdot 10^9$ КУО *Staphylococcus aureus* (0,5 мл) з наступною скарифікацією шкіри. Для відтворення кон'юнктивіту в око кролям вносили по 2 краплі 2,5 % розчину аміаку на фоні анестезії 0,5 % розчином проксиметакаїну гідрохлориду. Через 30 хв на кон'юнктиву наносили 0,1 мл культури *S. aureus* зі щільністю $1 \cdot 10^9$ КУО/мл.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що при генералізованій синьогнійній інфекції найвиразнішу ефективність сполука KBM-194 проявляє в дозі, що відповідає 0,01 ЛД₅₀. Дослідження впливу сполуки при місцевому застосуванні показало, що нанесення 0,25 % мазі KBM-194 сприяло зменшенню гіперемії, прискорило формування абсцесу та його розрив. Повне зникнення ознак запалення в дослідних тварин відмічали на 8 добу, у тварин контролю – на 16 добу. На моделі бактеріального кон'юнктивіту сполука у вигляді 0,1 % розчину також проявила ефективність, спостерігалось зменшення проявів запалення та скорочення терміну перебігу патологічного процесу.

Проведені дослідження на тваринах свідчать про необхідність подальших поглиблених досліджень ефективності сполуки на моделях інфекційного процесу *in vivo* для встановлення широти спектра дії та дозування сполуки KBM-194.

Ключові слова: антибактеріальна активність, експериментальна бактеріальна інфекція, терапевтична ефективність, арилаліфатичні аміноспирти

М. Л. Дронова

Терапевтическая эффективность 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси]-3-(N-бензилгексаметилениминий)-2-пропанол хлорида на моделях *in vivo*

Производные арилаліфатичних аміноспиртов – новый перспективный класс соединений, проявляющих выраженную антимикробную активность в условиях *in vitro*. Цель исследования – установление терапевтической эффективности производного арилаліфатичних аміноспиртов 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлорида (шифр KBM-194) на модели генерализованной инфекции и при местных поражениях бактериального генеза.

Експериментальную генерализованную инфекцию воспроизводили на белых нелинейных мышах с использованием *Pseudomonas aeruginosa*. Инфицирующая доза составляла $4 \cdot 10^7$ КОЕ/животное. При моделировании местного патологического процесса кроликам внутрикожно вводили $1 \cdot 10^9$ КОЕ *Staphylococcus aureus* (0,5 мл) с последующей скарификацией кожи. Для воспроизведения конъюнктивита в глаза кроликам вносили по 2 капли 2,5 % раствора аммиака на фоне анестезии 0,5 % раствором проксиметакаина гидрохлорида. Через 30 мин на конъюнктиву наносили 0,1 мл культуры *S. aureus*, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что при генерализованной синегнойной инфекции наибольшую эффективность соединения KBM-194 проявляет в дозе, соответствующей 0,01 ЛД₅₀. Исследование влияния соединения при местном применении показало, что нанесение 0,25 % мази KBM-194 способствовало уменьшению гиперемии, ускорило формирование абсцесса и его разрыв. Полное исчезновение признаков воспаления у опытных животных отмечалось на 8 сут, у животных контроля – на 16 сут. На модели бактериального конъюнктивита

соединение в виде 0,1 % раствора также проявило эффективность, наблюдалось уменьшение воспаления и сокращение длительности патологического процесса.

Проведенные исследования на животных свидетельствуют о необходимости дальнейших углубленных исследований эффективности соединения на моделях инфекционного процесса *in vivo* для установления широты спектра действия и дозировки соединения KBM-194.

Ключевые слова: антибактериальная активность, экспериментальная бактериальная инфекция, терапевтическая эффективность, арилалифатические аминоспирты

Dronova M. L.

The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl) phenoxy]-3-(N-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride under *in vivo* models

Aryl aliphatic aminoalcohol derivatives are a new promising chemical class, possessing a pronounced antibacterial properties *in vitro*. The aim of this study was to investigate the therapeutic efficacy of aryl aliphatic aminoalcohol derivative 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(N-benzylhexametylenimino)-2-propanol chloride (compound KBM-194) using *in vivo* models of generalized and local bacterial infections.

Experimental generalized infection, caused by *Pseudomonas aeruginosa* was reproduced in white nonlinear mice; infecting dose was $4 \cdot 10^7$ CFU/animal. Topical inflammatory process was reproduced by intradermal injection of $1 \cdot 10^9$ CFU (0,5 ml) of *Staphylococcus aureus* inoculum, followed by skin scarification. Bacterial conjunctivitis was reproduced on background of topical anesthesia by 0,5 % solution of proxymetacaine hydrochloride. Both eyes were administered 2 drops of 2,5 % ammonia solution and 0,1 ml of *S. aureus* inoculum ($1 \cdot 10^9$ CFU/ml) 30 min after.

Investigation of the compound KBM-194 action on the model of generalized *P. aeruginosa* infection showed the distinct efficacy of compound at a dosage equal to 0,01 LD₅₀. Topical administration of KBM-194 (0,25 % ointment) on inflamed skin surface reduced hyperemia and accelerated abscess formation and rupture. Complete recovery was noted in 8 days for treated animals, while signs of inflammation in control animals were registered for 16 days. Compound showed efficacy on the model of bacterial conjunctivitis as well. Instillation of 0,1 % KBM-194 solution resulted in reduction of inflammation symptoms and shortening the course of the pathological process.

The data obtained suggest prospects of further animal studies to establish the spectrum of *in vivo* activity and rational dosage regimens of the compound KBM-194.

Key words: antibacterial activity, experimental bacterial infection, therapeutic efficacy, aryl aliphatic aminoalcohols

Надійшла: 4 грудня 2015 р.

Контактна особа: Дронова М., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 83 32.
Електронна пошта: ml.dronova@gmail.com

Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк,
Л. В. Бойцова, І. В. Данова, С. М. Тишкін, О. С. Хромов

Корекція порушень гемостазу при гострій масивній крововтраті ліпосомальними препаратами

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосоми, Ліпофлавон, ліпосомальна форма цитохрому С, коагуляційний гемостаз

Використання нових видів озброєння в локальних конфліктах і велико-масштабних війнах, техногенні та природні катастрофи, транспортні аварії потребують вдосконалення організації допомоги пораненим та ураженим.

Причиною смерті потерпілих на етапах медичної евакуації є крововтрата (25 %), та крововтрата в поєднанні з травматичним шоком (19 %). Загалом крововтрата, шок і їхнє поєднання зумовлюють смерть від безпосередньої дії травми на етапах медичної евакуації понад 51 % поранених військовослужбовців. Слід зазначити, що бойова травма в 85 % випадків поєднується з кровотечею з ушкоджених тканин [1]. У мирний час навіть в умовах стаціонарного лікування поєднана дія травматичного шоку і крововтрати призводить до 60 % смертності при травмах [2].

Тяжкість крововтрати визначається її видом, швидкістю розвитку, об'ємом втраченої крові, ступенем гіповолемії та можливим розвитком шоку. Фізіологічними реакціями організму на крововтрату є централізація кровообігу, компенсаторна автогемодилуція, активація гемопоєзу, збільшення хвилинного об'єму крові, гіперкоагуляція.

На особливу увагу заслуговує гіперкоагуляція, що підвищує гемостатичний потенціал крові та сприяє підтриманню гемостазу в пошкоджених судинах. Однак при масивній крововтраті ця захисна реакція трансформується в важку патологію – ДВЗ-синдром (син-

дром дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові), коли рівновага між механізмами тромбоутворення та фібринолізу порушується [3]. Цьому сприяють тканинна гіпоксія, ацидоз, порушення мікроциркуляції, агрегація елементів крові, ендотоксикоз, значна травма тканин [4].

Мета дослідження – вивчення впливу ліпосомальних препаратів на систему згортання крові при гострій масивній крововтраті.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на 36 статевозрілих білих лабораторних щурах-самцях масою (220 ± 25) г, яких утримували на стандартному раціоні віварію без обмеження доступу до води. Методом випадкової вибірки тварин розподілили на 5 груп.

Щури I–V груп були використані для вивчення впливу гострої масивної крововтрати (ГМК) та її поповнення різними розчинами на систему згортання та кислотно-лужний стан крові. У 10 щурів I групи крововтрата не компенсувалася жодним розчином. Кров для аналізів була взята перед крововтратою та через 30 хв після кровопускання. Тваринам II–V груп через 30 хв після крововтрати внутрішньовенно вводили розчин у об'ємі, що відповідає об'єму втраченої крові. Кров для аналізів була взята перед крововтратою та через 30 хв після введення розчину. 8 щурам II групи вводили фізіологічний розчин, 6 щурам III групи – лецитинові ліпосоми (аналог ліпіну) у дозі 50 мг/кг, 6 тваринам IV групи – Ліпофлавон у дозі 50 мг/кг за ліпідом, 6 щурам V групи – ліпосомальну форму цитохрому С (ліпохром) у дозі 50 мг/кг за ліпідом.

Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до законодавства України [5], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [6].

Знеболювання та операційна підготовка. Знеболювання у тварин проводили за допомогою суміші хлоралою та уретану (1:10 за масою, 2 мг/кг за хлоралою, внутрішньочеревинно). Тварин у хірургічній стадії наркозу розташовували на термостабілізованому операційному столі, у дистальні відділи кінцівок підшкірно вводили електроди для реєстрації електрокардіограми (ЕКГ) у другому стандартному відведенні. Надалі проводили хірургічну підготовку – трахеотомію, катетеризацію *a. carotis comm. sin., v. jugularis sin.*

Моделювання гострої масивної крововтрати у щурів. Кровопускання здійснювали в об'ємі 2,5 мл/100 г зі швидкістю 2 мл/хв з загальної сонної артерії, що загалом становить 33 % від загальної кількості циркулюючої крові [7–9]. Ізоволімічне поповнення крововтрати фізіологічним розчином або суспензією ліпосом проводили внутрішньовенно.

Дослідження системи згортання крові. Кров було зібрано з сонної артерії до початку кровопускання й через 30 хв після нього (група I) або через 30 хв після поповнення крововтрати (групи II–V) у пробірці з 3,8 % цитратом натрію (Vascutest Kima, Італія). Виділено плазму з використанням центрифуги MPW – 340 (Mechanika Precyzyjna, Польща). За допомогою коагулометра K-3002 OPTIC (Ksel Med, Польща) визначали тромбіновий час, протромбіновий час та активований парціальний тромбoplastинний час.

Методи вивчення кислотно-лужного стану (КЛС) та газів артеріальної крові. Показники КЛС крові визначали на аналізаторі газів Gastat-mini (Techno Medica, Японія) за допомогою картриджів Gastat-mini 981 (Techno Medica, Японія) у крові, яку було зібрано з сонної артерії до початку крововтрати й через 30 хв після неї (група II) або через 30 хв після введення розчинів (групи III–VI).

Параметри, які вимірювали: концентрація водневих іонів (pH), парціальна напруга вуглекислоти в крові (pCO₂), парціальна напруга кисню (pO₂); параметри, які розраховували: бікарбонати плазми (HCO₃), насичення крові киснем (O₂SA), надлишок лугів крові (BE), суму аніонів буферних систем крові (BB).

Використані реактиви та розчини. У ході дослідження були використані: альфа-хлоралою (Sigma, США), етилкарбамат (Уретан, Sigma, США), гепарин (ТОВ Фарма Лайф, Україна), кальцію хлорид (10 % розчин CaCl₂, Arterium, Україна), NaCl (Reaxim, Україна), лецитинові ліпосоми (ТОВ «Наномедтех», Україна), ліпофлавіон (ТОВ «Наномедтех», Україна), ліпохром (ТОВ «Наномедтех», Україна), КН₂РO₄ (Sigma, США), NaOH (Sigma, США). Для формування ліпосом було використано яєчний лецитин.

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

Результати та їх обговорення. Гостра масивна крововтрата (ГМК) викликала загибель усіх тварин I групи протягом (49,7 ± 4,4) хв. Враховуючи це, поповнення проводили через 30 хв після кровопускання.

ГМК призводила до розвитку різноспрямованих порушень у системі згортання крові, які через 30 хв після кровопускання проявлялися підвищеною активністю системи згортання крові, а до кінця періоду спостереження – її зниженням.

Найвиразніше різноспрямовані зміни системи гемостазу відстежуються на прикладі протромбінового часу (ПТ), який характеризує зовнішній шлях згортання крові. Через 30 хв після кро-

вовтрати цей показник скорочується на 31,5 %, що свідчить про посилення коагуляційної активності крові, надалі він демонструє подовження на 29,7 %, характерне для стадії гіпокоагуляції з виснаженням факторів згортання та антикоагулянтів, виражених гіпофібриногенемії та тромбоцитопенії, а також посилення фібринолітичної активності [10]. Активований парціальний тромбoplastиновий час (АПТЧ), що відображає шлях внутрішньої активації згортання крові [11], навіть при відсутності вірогідних змін за короткий проміжок часу, свідчить про тенденцію до гіперкоагуляції через 30 хв після ГМК та достовірно вказує на гіпокоагуляцію в більш пізній час (рисунк).

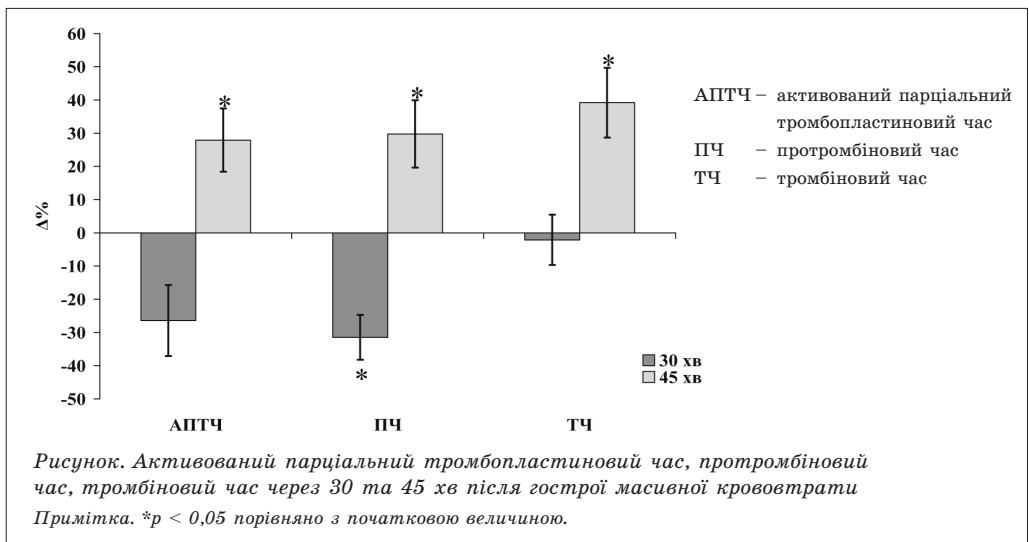
Серед факторів, що сприяють порушенням у системі гемостазу, ацидоз є одним з найважливіших предикторів коагулопатії в травмованих хворих [12], до того ж збільшення проявів ацидозу підвищує ймовірність смерті [13–15]. Через 30 хв після кровопускання поряд із зазначеними порушеннями спостерігали розвиток декомпенсованого метаболічного ацидозу. На користь цього свідчили характерні зміни параметрів кислотно-лужного стану крові (табл. 1). Інші показники також свідчили про розвиток метаболічного ацидозу: відбувалося зменшення напруги CO_2 , зростав дефіцит буферних лугів (ВЕ) в артеріальній крові. Згубними наслідками ацидозу при ГМК є порушення активності ферментів, зменшен-

ня концентрації фібриногену, подовження часу згортання крові та збільшення часу кровотечі [16].

При ізоволемічному поповненні крововтрати фізіологічним розчином зберігаються порушення функціонального стану системи згортання крові та кислотно-лужного стану (табл. 1, 2). Через 1 год після кровопускання в тварин цієї групи спостерігали декомпенсований метаболічний ацидоз. Такі зміни сприяють посиленню тканинної гіпоксії, зниженню продукції АТФ, гіперполяризації клітинних мембран, кальцієвому перевантаженню клітин, порушенню окиснювального фосфорилування. Внаслідок цього виникає ще більший дефіцит кисню, збільшується киснева заборгованість [17]. Метаболічний ацидоз у поєднанні з ознаками гіпокоагуляції, які спостерігали в цієї групи тварин, можуть свідчити про розвиток ДВЗ-синдрому.

Додавання ліпосомальних препаратів до інфузійного середовища значною мірою сприяло усуненню такого ускладнення. Так, внутрішньовенне введення через 30 хв після крововтрати суспензії ліпосомальних препаратів (ліпосоми або Ліпофлакон) у фізіологічному розчині призводило до більш повноцінної корекції порушень системи згортання крові та КЛС у тварин.

Введення ліпохрому в зазначеній дозі також практично усувало зміни функціонального стану системи згортання крові та порушення кислотно-



Таблиця 1

Параметри кислотно-лужного стану артеріальної крові за умов гострої масивної крововтрати та застосування ліпосомальних препаратів

Період	Показник					
	pH	pCO ₂ , мм рт.ст.	HCO ₃ , ммоль/л	O ₂ SA, %	BE, ммоль/л	BB, ммоль/л
Початкова величина (n = 8)	7,465 ± 0,003	38,62 ± 0,60	20,52 ± 0,42	99,29 ± 0,01	-0,75 ± 0,04	46,99 ± 0,36
Гостра масивна крововтрата, 30 хв (n = 6)	7,322 ± 0,003*	34,64 ± 0,45*	18,37 ± 0,56*	90,40 ± 0,02	-2,40 ± 0,09*	39,80 ± 0,27
Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин, 60 хв (n = 6)	7,333 ± 0,004*	36,50 ± 0,24**	19,40 ± 0,44	98,50 ± 0,03#	-5,40 ± 0,06**	42,50 ± 0,38**
Гостра масивна крововтрата + ліпосоми, 60 хв (n = 6)	7,433 ± 0,002#	25,20 ± 0,28**	16,80 ± 0,34**	99,20 ± 0,03#	-2,70 ± 0,05*	43,20 ± 0,34
Гостра масивна крововтрата + Ліпофлавон 60 хв (n = 6)	7,455 ± 0,001#	32,50 ± 0,24**	22,30 ± 0,32#	99,20 ± 0,03#	0,00 ± 0,04**	47,90 ± 0,45
Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 6)	7,442 ± 0,003#	35,64 ± 0,29	24,21 ± 0,28	99,34 ± 0,02#	1,30 ± 0,07#	49,34 ± 0,41#

Примітка. Тут і в табл. 2: *p < 0,05 порівняно з початковою величиною;

#p < 0,05 порівняно з групою ГМК.

Таблиця 2

Функціональний стан системи згортання крові за умов гострої масивної крововтрати та застосування ліпосомальних препаратів

Група тварин	Показник		
	АПТЧ, с	ПЧ, с	ТЧ, с
Початкова величина (n = 16)	39,4 ± 4,0	41,0 ± 3,7	47,2 ± 4,1
Гостра масивна крововтрата, 45 хв (n = 6)	50,4 ± 4,8	53,2 ± 5,4*	65,7 ± 6,9
Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин (n = 6)	168,9 ± 12,6**	35,7 ± 0,9	–
Гостра масивна крововтрата + ліпосоми (n = 6)	45,3 ± 6,7	37,8 ± 2,7	94,3 ± 9,3**
Гостра масивна крововтрата + ліпофлавон (n = 6)	23,7 ± 2,7	39,6 ± 8,5#	48,2 ± 5,5
Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 6)	23,73 ± 2,70*	39,6 ± 4,5#	48,2 ± 5,5

лужного стану крові (табл. 1, 2). Разом з тим, зменшення на 39,4 % активованого парціального тромбінового часу свідчить про можливе збереження гіперкоагуляції.

Тільки при використанні порожніх ліпосом з боку системи згортання зберігалися ознаки гіпокоагуляції, що проявлялося в значному подовженні тромбінового часу (табл. 1).

Перспективи застосування ліпосомальних препаратів при ГМК зумовлені здатністю ліпосом впливати на осно-

вні ланки патогенезу [18–19]. Нормалізація КЛС при крововтраті після інфузії ліпосомальних препаратів підтверджує доцільність такої терапії, а зміни параметрів системи згортання крові потребують подальшого вивчення.

Висновки

Гостра масивна крововтрата із загальної сонної артерії в об'ємі 2,5 мл/100 г маси щурів зі швидкістю 2 мл/хв викликає розвиток декомпенсованого геморагічного шоку. Розвиток шоку

супроводжується різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому періоді спостерігаються ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому.

Введення ліпосомальних препаратів (ліпосом, Ліпофлауону, ліпохрому) значною мірою сприяє усуненню порушень гемостазу та запобігає розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу.

1. Военно-полевая хирургия локальных войн и вооруженных конфликтов: Руководство для врачей / Под ред. Е. К. Гуманенко, И. М. Самохина. – Москва : ГОЭТАР-Медиа, 2011. – С 135–148.
2. Корик В. Е. Политравма мирного времени / Корик В. Е., Дудинский Р. П., Панасенко С. И. // Военная медицина. – 2008. – С. 15–19.
3. Li Y. Creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype by modulation of acetylation in models of hemorrhagic and septic shock / Li Y., Alam H. B. // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – № 710. – P. 107–133.
4. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation / Levi M., Toh C. H., Thachil J., Watson H. G. // British Journal of Haematology. – 2009. – V. 145, Iss. 1. – P. 24–33.
5. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2006. – № 27. – С. 990, стаття 230. – (Бібліотека офіційних видань).
6. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/main?find=1&sp=i&user=c393&text=%F2%E2%E0%F0%E8%ED&x=10&y=5>.
7. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review / Fülöp A., Turóczy Z., Garbaisz D. [et al.] // European Surgical Research. – 2013. – № 50. – P. 57–70.
8. McGuill M. W. Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques / McGuill M. W., Rowan A. N. // ILAR J. – 1989. – № 31 (4). – p. 5–20.
9. Experimental Trauma Models: An Update / Frink M., Andruszkow H., Zeckey Ch. [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – 15 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2011/797383.pdf>.
10. Мачабели М. С. Тромбогеморрагическая теория общей патологии / Мачабели М. С. // Успехи физиол. наук. – 1986. – Т. 17, № 2. – С. 56.
11. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / Баркаган З. С., Момот А. П. – Москва : Ньюдиамед, 2001. – 296 с.
12. Predicting life-threatening coagulopathy in the massively transfused trauma patient: hypothermia and acidosis revisited / Cosgriff N., Moore E. E., Sauaia A. [et al.] // J. Trauma. – 1997. – № 42. – P. 857–861.
13. Updates in the management of severe coagulopathy in trauma patients / Lynn M., Jeroukhimov I., Klein Y., Martinowitz U. // Intensive Care Med. – 2002. – № 28, Suppl 2. – P. S241–247.
14. Mikhail J. The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy / Mikhail J. // AACN Clin Issues Crit Care Nurs. – 1999. – № 10. – P. 85–94.
15. Moore F. A. The next generation in shock resuscitation / Moore F. A., McKinley B. A., Moore E. E. // Lancet 2004. – № 363. – P. 1988–1996.
16. Martini W. Z. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine / Martini W. Z. // Metabolism. – 2007. – № 56. – P. 214–221.
17. Carroel R. G. Prevention of "irreversible" hemorrhagic shock by the preservation of cellular integrity / R. G. Carroel, S. G. Jams. // Med. Hypotheses. – 1987. – V. 24, № 1. – P. 69–75.
18. Baue A. E. Multiple Organ Failure: Pathophysiology, Prevention, and Therapy / A. E. Baue, E. Faist, D. Fry. – 2000. New York: Springer. – 712 p.
19. Risk factors for trauma-induced coagulopathy- and transfusion-associated multiple organ failure in severely injured trauma patients / K. Balvers, M. R. Wirtz, S. van Dieren [et al.] // Frontiers in medicine. – 2015. – № 2. – P. 1–11.

**Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк, Л. В. Бойцова,
І. В. Данова, С. М. Тишкін, О. С. Хромов**

Корекція порушень гемостазу при гострій масивній крововтраті ліпосомальними препаратами

Мета дослідження – вивчення впливу ліпосомальних препаратів на систему згортання крові при гострій масивній крововтраті.

Проведені дослідження показали, що гостра масивна крововтрата з загальної сонної артерії в об'ємі більшому, ніж 33 % об'єму циркулюючої крові супроводжувалася розвитком шокowego стану та загибеллю тварин (щурів) протягом 49 хв.

Гостра масивна крововтрата викликала розвиток декомпенсованого геморагічного шоку. Розвиток шоку супроводжувався різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому

періоді спостерігали ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому.

Уведення ліпосомальних препаратів (ліпосом, Ліпофлаону, ліпосомальної форми цитохрому С – ліпохрому) до інфузійного середовища призводило до 100 % виживання тварин упродовж усього періоду спостереження (60 хв) та значною мірою сприяло усуненню порушень гемостазу та запобігало розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу.

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосоми, Ліпофлафон, ліпосомальна форма цитохрому С, коагуляційний гемостаз

**Н. В. Добреля, Т. А. Карацуба, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк, Л. В. Бойцова,
І. В. Данова, С. М. Тишкін, А. С. Хромов**

Коррекция нарушений гемостаза при острой массивной кровопотере липосомальными препаратами

Цель исследования – изучение влияния липосомальных препаратов на систему свертывания крови при острой массивной кровопотере.

Проведенные исследования показали, что кровопускание из общей сонной артерии в объеме больше, чем 33% объема циркулирующей крови, приводило к возникновению декомпенсированного геморрагического шока, сопровождавшегося гибелью животных (крыс) в течение 49 мин.

Развитие шока сопровождалось разнонаправленными изменениями коагуляционного гемостаза: в раннем периоде наблюдали признаки гипер-, а на поздних этапах – гипоккоагуляции, что следует расценивать как начало ДВС-синдрома. Все оцениваемые индикаторные показатели состояния свертывающей системы крови через 30 мин после кровопотери уменьшались: протромбиновое время – на 31,5 %, тромбиновое время – на 39,2 %, активированное парциальное тромбопластиновое время – на 27,9 %, что свидетельствовало об усилении коагуляционной активности крови. Через 45 мин после кровопотери все эти показатели были значительно увеличены, что характерно для стадии гипоккоагуляции. Наблюдалось развитие субкомпенсированного метаболічного ацидоза с уменьшением напряжения CO_2 и дефицитом буферных оснований в артериальной крови.

Введение липосомальных препаратов (липосом, Липофлавона, липосомальной формы цитохрома С – липохрома) в инфузионную среду приводило к 100 % выживаемости животных в течение всего периода наблюдения (60 мин), во многом способствовало устранению нарушений гемостаза и предотвращало развитие декомпенсированного метаболіческого ацидоза.

Ключевые слова: острая массивная кровопотеря, липосоми, Липофлафон, липосомальная форма цитохрома С, коагуляционный гемостаз

**N. V. Dobrelia, T. A. Karazuba, N. S. Gula, Y. O. Dunyak, L. V. Boytsova,
I. V. Danova, S. M. Tishkin, O. S. Khromov**

The correction of hemostatic disorders with liposomal drugs in acute massive blood loss

This study was aimed to investigate a haemostatic activity of the liposomal drugs in acute massive blood loss.

The received data showed that acute massive exsanguination from the common carotid artery above 33 % of blood volume resulted to the development of decompensated hemorrhagic shock accompanied by death of the animals (rats) within 49 min.

The shock development was accompanied with the multidirectional changes in coagulation haemostasis: hypercoagulation in the early period and hypocoagulation in the later stages, which should be regarded as the onset of disseminated intravascular coagulation (DIC). All measured indicators of the blood coagulation status were decreased 30 min after blood loss: prothrombin time – by 31,5 %, thrombin time – by 39,2 %, activated partial thromboplastin time – by 27,9 %, indicating the blood coagulation activity strengthening. All these indicators became significantly increased 45 min after blood loss, which is typical for the hypocoagulation stage. The subcompensated metabolic acidosis was developed with decrease in CO_2 tension and lack of buffer bases in the arterial blood.

The infusion of saline solution with the liposomal drugs (liposomes, Lipoflavon, liposomal form of cytochrome C – Lipochrom) led to 100 % survival of animals throughout the follow-up period (60 min), contributed significantly to the elimination of hemostasis disorders, and prevents the development of decompensated metabolic acidosis.

Key words: acute massive blood loss, liposomes, Lipoflavon, liposomal cytochrome C, coagulation hemostasis

Надійшла: 4 грудня 2015 р.

Контактна особа: Хромов Олександр Станіславович, головний науковий співробітник,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680.
Тел.: + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: askhromov@mail.ru

Л. В. Иванов¹, А. Н. Ляпунов², Н. Т. Картель¹, О. А. Нардид³,
Я. О. Черкашина³, Л. В. Деримедведь⁴

Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов

¹Институт химии поверхности имени А. А. Чуйка НАН Украины, г. Киев

²Институт монокристаллов НАН Украины, г. Харьков

³Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

⁴Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

*Ключевые слова: фармацевтические
вспомогательные вещества,
микровязкость, мембраны эритроцитов,
метод спиновых зондов*

В настоящее время при создании различных лекарственных форм кроме фармакологически активных, действующих веществ используют вспомогательные вещества (ВВ), в том числе низкомолекулярные растворители и высокомолекулярные полимеры (молекулярная масса выше 600) различной химической структуры с различными физико-химическими свойствами, обеспечивающими необходимую консистенцию, стабильность, хранение и эффективность лекарственных форм. Ранее с помощью метода спиновых зондов было показано, что фармацевтические растворители и полимеры эффективно взаимодействуют с мембранами модельных клеток липосом и мембранами интактных клеток, вытесняя по конкурентному механизму из мембран лекарственные вещества (ЛВ), влияют на проницаемость и целостность мембран клеток, текучесть липидов мембран липосом [1–6].

Изучение за рубежом проницаемости глицерина через мембрану эритроцитов крови восьми млекопитающих показало, что только эритроциты крови крыс и человека имеют достаточно высокую проницаемость для глицерина, сравнимую между собой. Проницаемость для глицерина эритроцитов крови других млекопитающих заметно ниже и не может быть объяснена различием фос-

фолипидного состава мембран исследованных эритроцитов [7].

Вопрос о влиянии современных фармацевтических растворителей и полимеров на конформационную подвижность липидов мембран клеток (микровязкость мембран) является актуальным, так как биодоступность ЛВ является многократной трансдиффузией молекул ЛВ в мембранах клеток и напрямую зависит от их микровязкости. Создание лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием (заданной биодоступностью) для медицины и ветеринарии требует использования ВВ, способных замедлять или ускорять процессы трансмембранной диффузии ЛВ, а это, в свою очередь, требует конкретных данных об особенностях влияния определенных ВВ на микровязкость мембран клеток человека и животных, либо об универсальности действия определенных ВВ на биодоступность для человека и различных видов животных.

Недавно нами было опубликовано исследование, посвященное изучению механизмов цитотоксичности ряда гидрофильных полуксамеров, в котором показано значительное снижение микровязкости мембран эритроцитов человека и крыс под действием ряда полуксамеров [15]. Эксперименты показали, что разжижающее действие гидрофильных полуксамеров на мембраны эритроцитов крыс меньше, чем человека, что обусловило продолжение такого сравнительного исследования микровязкости эритроцитов человека и крыс в присутствии ряда других фар-

мацевтических вспомогательных веществ.

Цель исследования – сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ (растворителей и высокомолекулярных полимеров) на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов. Полученные результаты могут дать новую информацию о механизмах цитотоксичности фармацевтических вспомогательных веществ, а также могут быть использованы при создании лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием и оптимальной биодоступностью.

Материалы и методы. В работе использован метод спиновых зондов, в котором по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильных нитроксильных радикалов с липофильным органическим заместителем (что позволяет им внедриться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в липидах мембран клеток.

Для изучения микровязкости мембран эритроцитов в присутствии растворителей и полимеров был выбран спиновый зонд **1** (рис. 1) на основе пальмитиновой кислоты – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ТЕМПО, содержащий в своем составе четвертичный аммониевый фрагмент и синтезированный по схемам [8, 9]:

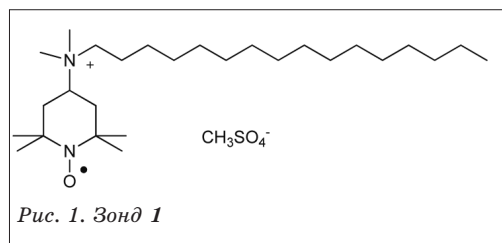


Рис. 1. Зонд 1

Введение зонда **1** в водную взвесь эритроцитов осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО во взвеси эритроцитов была в пределах 0,5–1,0 %. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400».

Оценку микровязкости мембран эритроцитов проводили на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов – спинового зонда **1**, находящегося в липидном бислое мембран эритроцитов [10, 11]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) использовали такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивность компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа сверхтонкой структуры $A_{\text{изо}}$ (рис. 2) [10]. Базовым уравнением для оценки вязкости любых сред является уравнение Стокса-Эйнштейна:

$$\tau = 4\pi a^3 \cdot \eta / 3kT, \quad (1)$$

где

τ – время, за которое спиновый зонд поворачивается на 1 радиан (57°) в 1 с, η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР [10, 11].

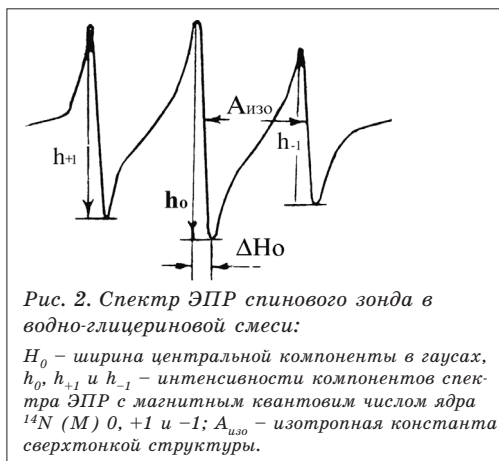
$$1/\tau_{c(+1)} = 2 \cdot 10^8 / [(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 c^{-1} \quad 2(a)$$

$$1/\tau_{c(-1)} = 3,6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 c^{-1} \quad 2(b)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 6,65 \cdot 10^{-10} / [(h_{+1}/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_{+1} c^{-1} \quad 2(b)$$

Учитывая структуру спинового зонда **1**, а также анизотропное вращение его вокруг длинной оси молекулы, при анализе результатов, в первую очередь, обращали внимание на время корреляции $\tau_{c(+1/-1)}$, которое учитывает анизотропию спектров ЭПР и анизотропное вращение зонда в мембране клеток [10, 11].

Эритроциты крыс для исследований получали из крови крыс самцов согласно [9]. Эритроциты человека получали из свежееконсервированной донорской крови, заготовленной на глюколиновом консерванте. Кровь получали на Харьковской областной станции переливания крови. С целью унификации объекта в работе использовали кровь II группы. После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л хлорид натрия, 0,01 моль/л трис-буфер, pH 7,4).



Изучали следующие фармацевтические растворители и полимеры: пропиленгликоль (ПГ), полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 (ПЭГ-300), ПЭГ-400, гексиленгликоль (ГГ) и N-метилпирролидон (N-МР), а также высокомолекулярный полимер ПЭГ-1500.

Растворители и водные растворы полимеров вводили во взвесь эритроцитов путем добавления по каплям разбавленных водных растворов растворителей (полимеров) в различных соотношениях таким образом, чтобы конечная их концентрация во взвеси эритроцитов составляла необходимые 10 или 5 % (табл. 1 и 2).

Исследования проводили в светлое время суток на беспородных белых крысах-самцах массой 180–210 г. Кровь отбирали у каждого из шести животных ($n = 6$), а также использовали кровь шести доноров ($n = 6$). Все опыты на животных проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (г. Страсбург, 1986 г.), и «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001 г.).

Таблица 1

Значения величин времени корреляции τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда 1 в мембранах эритроцитов человека в присутствии фармацевтических вспомогательных веществ при температуре 25 °С

Вспомогательное вещество	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^{10}$, с
Контроль	17,90 ± 0,89	70,30 ± 4,20
ПЭГ 1500 10 % 10 мин	17,70 ± 0,88	68,50 ± 4,10
ПЭГ 1500 10 % 30 мин	15,60 ± 0,70*	67,00 ± 4,01
ПЭГ 1500 10 % 60 мин	15,00 ± 0,85	60,10 ± 3,65*
ПЭГ 400 10 % 10 мин	18,50 ± 0,98	71,00 ± 4,28
ПЭГ 400 10 % 30 мин	19,50 ± 0,99	81,00 ± 4,85*
ПЭГ 400 10 % 60 мин	18,30 ± 0,96	75,00 ± 4,70
ПЭГ 300 10 % 10 мин	19,80 ± 1,01*	86,90 ± 5,23*
ПЭГ 300 10 % 30 мин	21,70 ± 1,10*	87,30 ± 5,26*
ПЭГ 300 10 % 60 мин	18,10 ± 0,92	75,10 ± 4,55
ПГ 10 % 10 мин	19,60 ± 0,98	71,90 ± 4,35
ПГ 10 % 30 мин	19,00 ± 0,95	90,60 ± 5,43*
ПГ 10 % 60 мин	20,10 ± 1,05*	70,50 ± 4,30
ГГ 10 % 10 мин	14,70 ± 0,78*	65,00 ± 3,95
ГГ 10 % 30 мин	13,60 ± 0,72*	52,60 ± 3,25*
ГГ 10 % 60 мин	10,10 ± 0,56*	24,90 ± 1,58*
N-МР 5 % 10 мин	19,60 ± 1,05	73,00 ± 4,42
N-МР 5 % 30 мин	18,10 ± 1,01	69,70 ± 4,25
N-МР 5 % 60 мин	17,00 ± 0,93	69,50 ± 4,22

Примечание. Здесь и в табл. 2: *р < 0,05 по отношению к контролю.

Значения величин времени корреляции τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда 1 в мембранах эритроцитов крыс в присутствии фармацевтических вспомогательных веществ при температуре 25 °С

Вспомогательное вещество	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}, \text{с}$	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^{10}, \text{с}$
Контроль	15,20 ± 0,78	66,30 ± 3,37
ПЭГ 1500 10 % 5 мин	16,20 ± 0,84	55,40 ± 2,99*
ПЭГ 1500 10 % 30 мин	14,00 ± 0,75	64,40 ± 3,32
ПЭГ 1500 10 % 60 мин	16,00 ± 0,86	67,10 ± 3,46
ПЭГ 400 10 % 5 мин	15,10 ± 0,81	66,20 ± 3,39
ПЭГ 400 10 % 30 мин	17,20 ± 0,87*	69,30 ± 3,49
ПЭГ 400 10 % 60 мин	19,30 ± 0,99*	85,40 ± 4,46*
ПГ 10 % 5 мин	16,20 ± 0,83	82,20 ± 4,93*
ПГ 10 % 30 мин	16,00 ± 0,84	69,00 ± 3,55
ПГ 10 % 60 мин	15,20 ± 0,80	78,10 ± 4,20*
ГГ 10 % 5 мин	14,10 ± 0,75	56,20 ± 3,16*
ГГ 10 % 30 мин	16,00 ± 0,88	61,00 ± 3,35
ГГ 10 % 60 мин	13,20 ± 0,69*	45,10 ± 2,76*
N-MP 5 % 5 мин	15,50 ± 0,81	64,00 ± 3,35
N-MP 5 % 30 мин	15,10 ± 0,83	61,00 ± 3,26

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методами вариационной статистики с помощью стандартных пакетов программ Statistica 7 for Windows, Microsoft Excel XP. При сравнении результатов между группами использовали модифицированный параметрический t-критерий Стьюдента для выборок с неравными дисперсиями. Проводили расчет средних величин, стандартного отклонения (табл. 1, табл. 2) [16]. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Спиновый зонд 1, имеющий положительный заряд, по-видимому, встраивается в мембрану подобно фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холиновую «головку» и два алкильных «хвоста». Показано, что нитроксильный фрагмент зонда 1 с неспаренным электроном находится в липидном окружении мембран, так как его константа $A_{\text{изо}}$ равна 14,6 гс и соответствует нахождению нитроксильного фрагмента в неполярном окружении. В полярном окружении нитроксильного фрагмента спинового зонда $A_{\text{изо}}$ составляет около 17,2 гс [10, 11]. Наибольшую плотность и наи-

меньшую подвижность липидный бислой мембран клеток имеет на поверхности мембран на уровне фосфолипидных «головок», а конформационная подвижность алкильных хвостов фосфолипидов возрастает при удалении от поверхности мембраны вглубь (вязкость падает) [12]. Нитроксильный фрагмент зонда 1 «зажат» между фосфолипидными головками в мембране, поэтому величина τ_c вращательной подвижности зонда 1 может быть весьма чувствительна к изменению плотности упаковки фосфолипидов мембран клеток (микровязкости) под действием ВВ. Внедрение молекул ВВ между молекулами фосфолипидов мембран может менять плотность упаковки фосфолипидов в мембране (микровязкость), нарушать жидкокристаллическую структуру мембран, а также параметр $A_{\text{изо}}$ зонда 1 – полярность микроокружения нитроксильного фрагмента. Исследования, проведенные ранее, показали, что $\tau_{+1/-1}$ зонда 1 в мембране эритроцитов более чувствительно к изменению микровязкости мембран, чем τ_{+1} или τ_{-1} , так как более адекватно отображает анизотропию вращательной подвижности зонда 1 вокруг длинной оси молекулы.

Анализ влияния изучаемых фармацевтических растворителей и полимеров на микровязкость мембран эритроцитов должен учитывать, что осмотически активные растворители одновременно вызывают разнонаправленные эффекты изменения микровязкости в мембране клеток: дегидратацию и сжатие клеток, набухание клеток вследствие диффузии низкомолекулярных растворителей внутрь клеток, нарушение жидкокристаллической структуры мембран клеток, нарушение белок-липидных взаимодействий в мембране клеток [1–6].

Анализ τ_c (пропорционального микровязкости мембран, формула 1) зонда **1** в мембране эритроцитов крови человека (табл. 1) показал, что введение ПГ в эритроциты человека сопровождалось слабым, но достоверным повышением микровязкости мембран эритроцитов в течение 1 ч для параметра τ_{-1} и заметным повышением микровязкости мембран в течение получаса для чувствительного параметра $\tau_{+1/-1}$ (дегидратация клеток) с последующим снижением микровязкости в течение 1 ч до нормы – набухание клеток вследствие диффузии низкомолекулярных растворителей внутрь клеток и выравнивание осмотического давления внутри и снаружи. Аналогичные тенденции наблюдаются и для эритроцитов крыс при введении ПГ, однако, начальное заметное повышение микровязкости мембран согласно чувствительному параметру $\tau_{+1/-1}$ (табл. 2) не сопрово-

ждается последующим снижением микровязкости мембран до нормы вследствие набухания клеток. По параметру τ_{-1} микровязкость мембран эритроцитов крыс в течение часа колеблется в пределах ошибки, обозначая по средним значениям τ_{-1} лишь тенденции процессов дегидратации и набухания клеток.

Введение ПЭГ-300 во взвесь эритроцитов крови человека приводит к заметному и стабильному увеличению микровязкости мембран клеток вследствие дегидратации в первый период времени, исходя из параметров $\tau_{+1/-1}$ и τ_{-1} . Через 1 ч микровязкость мембран восстанавливается практически до нормы вследствие диффузии ПЭГ-300 внутрь эритроцитов и набухания клеток (табл. 1). На рисунках 3–4 представлены спектры ЭПР спинового зонда **1** в мембранах эритроцитов человека в присутствии некоторых ВВ, из которых видно, что параметры спектров ЭПР, например, h_0/h_{-1} , связанные в вращательной подвижностью зонда **1** в мембране, при введении ВВ в эритроциты, отличаются от таковых в контроле.

При введении ПЭГ-400 в эритроциты человека чувствительный параметр $\tau_{+1/-1}$ вращательной диффузии зонда **1** в мембране демонстрирует небольшое увеличение микровязкости мембран через 30 мин вследствие дегидратации и падение микровязкости через 1 ч вследствие набухания клеток (табл. 1).

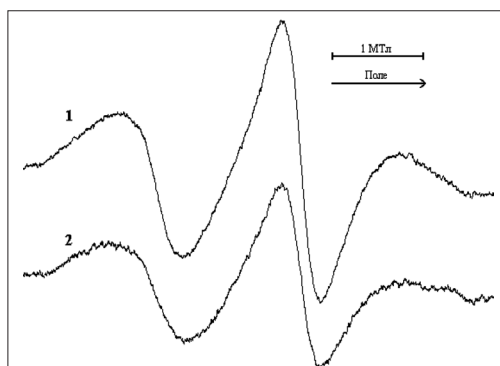


Рис. 3. Спектры ЭПР спинового зонда **1** в мембранах эритроцитов человека:

1 – контроль, 2 – в присутствии 10 % ПГ через 30 мин после введения в эритроциты (25 °C).

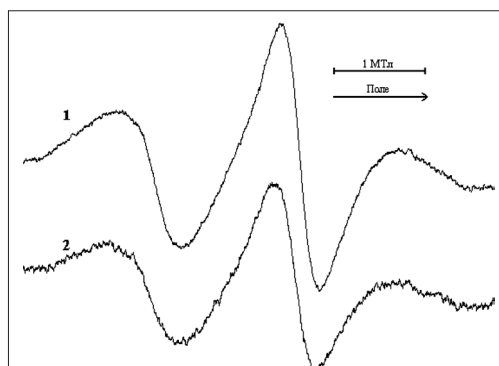


Рис. 4. Спектры ЭПР спинового зонда **1** в мембранах эритроцитов человека:

1 – контроль, 2 – в присутствии 10 % ПЭГ-400 через 30 мин после введения в эритроциты (25 °C).

При введении ПЭГ-400 в эритроциты крыс микровязкость мембран постепенно увеличивается в течение 1 ч инкубации по двум параметрам времени корреляции в разной степени (табл. 2), что можно объяснить насыщением поверхностных слоев мембран клеток более крупными молекулами ПЭГ-400 (большая вязкость растворителя), чем ПГ или ПЭГ-300, которые достаточно быстро диффундируют внутрь клеток эритроцитов. В противоположность этому действие очень вязкого растворителя полимера ПЭГ-1500 на мембраны эритроцитов человека заключается в небольшом достоверном снижении микровязкости мембран для всех параметров времени корреляции зонда 1 в мембране на протяжении 1 ч (табл. 1). Это можно объяснить образованием стабильного комплекса ПЭГ-1500 с компонентами липидного поверхностного слоя мембран, которое нарушает жидкокристаллическую структуру мембран эритроцитов и белок-липидные взаимодействия в мембране эритроцитов, что приводит к разжижению липидного бислоя мембран эритроцитов человека [13, 14].

В то же время введение ПЭГ-1500 во взвесь эритроцитов крыс приводит к начальному снижению микровязкости мембран и дальнейшему быстрому выходу значений микровязкости на уровень нормы в течение 30 и 60 мин. Несовпадение кинетики реагирования эритроцитов человека и крысы на введение осмотически активных фармацевтических ВВ отражает различие величины и длительности процессов дегидратации клеток эритроцитов человека и крысы и процессов набухания клеток вследствие трансмембранной диффузии низкомолекулярных ВВ внутрь клеток. А это, в свою очередь, определяется различием фосфолипидного состава мембран этих клеток у человека и крысы.

Значительные изменения в мембране эритроцитов человека происходят при введении в эритроциты низкомолекулярного растворителя ГГ, который считается активатором всасывания лекарственных веществ: наблюдается постепенное сильное снижение микровязкости мембран в течение 1 ч, которое

быстро развивается во времени. Такой эффект сильного разжижения мембран эритроцитов похож на действие полоксамеров на мембраны эритроцитов человека и крысы, обнаруженного и описанного нами ранее [15].

Величина максимального эффекта для ГГ по разным параметрам времени корреляции составляет 40–60 % (табл. 1). По-видимому, присутствие в молекуле ГГ трех гидрофобных метильных и одной метиленовой группы с одной стороны, а также двух гидроксильных групп с другой стороны позволяет молекулам ГГ осуществлять многоточечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок-липидное взаимодействие.

Взаимодействие ГГ с мембранами эритроцитов крыс не вызывает такого сильного понижения микровязкости мембран, как в случае с эритроцитами человека: наблюдаемые эффекты заметно меньше и даже для чувствительного параметра $\tau_{+1/-1}$ составляют около 30 % (табл. 2). И в этом случае мембрана эритроцитов крыс оказывается более устойчива к цитотоксическому растворителю ГГ, чем мембрана эритроцитов человека. При введении в эритроциты человека низкомолекулярного растворителя метилпирролидона (N-MP) микровязкость мембраны эритроцитов человека и крысы в течение 1 ч достоверно не менялась.

Выводы

Действие на мембраны эритроцитов относительно нетоксичных, водорастворимых, низкомолекулярных фармацевтических растворителей пропиленгликоля ПЭГ-300 или ПЭГ-400 не приводит к существенному изменению микровязкости мембран эритроцитов человека или крысы. Различие в устойчивости (резистентности) мембран эритроцитов человека и крысы к действию ВВ появляются при взаимодействии с мембраной клеток цитотоксически активных ВВ (растворителей и полимеров), имеющих в молекулах достаточное количество метильных и метилено-

вых гидрофобных групп – полоксамеров, гексилеңгликоля, высокомолекулярных ПЭГ. Увеличение молекулярной массы ВВ полимеров приводит к увеличению многоточечного связывания макромолекулы полимера с различными компонентами липидного бислоя мембран, которое в сумме приводит к значительному падению микровязкости мембран вследствие нарушения жидкокристаллической структуры мембран эритроцитов.

Заметное снижение микровязкости мембран эритроцитов в присутствии ГГ, по-видимому, объясняется наличием в молекуле ГГ трех гидрофобных метильных и одной метиленовой групп

с одной стороны, а также двух гидроксильных групп, позволяющих молекулам ГГ осуществлять многоточечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок-липидное взаимодействие (с поверхностными белками мембраны). Резистентность мембран эритроцитов человека и крысы к ГГ заметно отличается вследствие различий фосфолипидного состава мембран, который определяет структуру, свойства и резистентность липидного бислоя и всей мембраны клетки в целом.

1. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны / Иванов Л. В., Ляпунов Н. А., Цымбал Л. В. [и др.] // Хим.-фармац. ж. – 1986. – № 12. – С. 1437–1443.
2. Иванов Л. В. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов / Иванов Л. В., Орлова И. Н. // В сб. «Технология и стандартизация лекарств». Т. 2. – Харьков, 2000. – С. 558–615.
3. Иванов Л. В. Изучение взаимодействия некоторых гидрофильных неводных растворителей с биомембранами различных клеток методами спиновых и флуоресцентных зондов / Иванов Л. В. // Фармаком. – 1999. – № 2. – С. 45–47.
4. Иванов Л. В. Изучение механизмов дегидратации клеток эритроцитов под действием гидрофильных неводных растворителей / Иванов Л. В. // Фармаком. – № 5. – 1998. – С. 43–47.
5. Иванов Л. В. Изучение механизмов влияния вспомогательных веществ на биодоступность / Иванов Л. В., Георгиевский В. П. // Материалы I Международной научно-практической конференции "Создание, производство, стандартизация, фармакоэкономика лекарственных средств и биологических добавок". – Тернополь, 2004. – С. 19.
6. Иванов Л. В. Мембранотропные свойства лекарственных и фармацевтических вспомогательных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности лекарственных веществ / Иванов Л. В. // Материалы IV научно-практического семинара Координационного Совета Отделения химии НАН Украины по проблеме "Научные основы создания лекарственных средств". – Гурзуф, 2003. – С. 28–33.
7. Wessels J. M. C. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkam'p // Biochimica et Biophysica Acta. – 1973. – V. 291. – P. 190–196.
8. Розанцев Э. Г. Свободные иминоксильные радикалы / Э. Г. Розанцев. – Москва : Химия, 1970. – 216 с.
9. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови / Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель [и др.] // Поверхность. – 2014. – Вып. 6 (21). – С. 292–304.
10. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – Москва : Наука, 1974. – С. 12–24.
11. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – Москва : Мир, 1979. – 639 с.
12. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – Москва : Наука, 1974. – С. 205, 208.
13. Межидов С. Х. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред / С. Х. Межидов, В. А. Моисеев, О. А. Нардид // Кробиология. – 1989. – № 2. – С. 13–16.
14. Нардид О. А. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов / О. А. Нардид, Л. В. Цымбал, А. К. Гулевский // Физико-химические процессы в кробиологических системах. – Харьков, 1991. – С. 102–106.
15. Вивчення механізмів цитотоксичності низки гідрофільних полоксамерів методом спинових зондів / Л. В. Іванов, Н. Т. Картель, А. Н. Ляпунов [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 4–5 (45). – С. 46–58.
16. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.

**Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель, О. А. Нардид,
Я. О. Черкашина, Л. В. Деримедведь**

Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов

Изучено влияние ряда фармацевтических вспомогательных веществ (ВВ) на микровязкость мембран эритроцитов человека и крыс методом спиновых зондов. Действие на мембраны эритроцитов относительно нетоксичных, водорастворимых, низкомолекулярных фармацевтических растворителей типа пропиленгликоля (ПГ), ПЭГ-300 или ПЭГ-400 не приводит к существенному отличию изменений микровязкости мембран эритроцитов человека или крыс. Введение в эритроциты человека и крыс ПГ или ПЭГ-300 приводит к начальному повышению микровязкости мембран клеток вследствие дегидратации и последующему уменьшению микровязкости мембран до начального уровня вследствие диффузии этих ВВ внутрь клеток и выравнивания внеклеточного и внутриклеточного осмотического давления. Различие в резистентности мембран эритроцитов человека и крыс к действию ВВ появляются при взаимодействии клеток с цитотоксическими осмотически активными ВВ (растворителями и полимерами), имеющими в молекулах достаточное количество метильных и метиленовых гидрофобных групп – гексиленгликоля (ГГ) и высокомолекулярных ПЭГ. В этом случае мембраны эритроцитов крыс демонстрируют повышенную резистентность к действию ВВ – изменение микровязкости мембран эритроцитов крыс в присутствии таких ВВ меньше, чем в случае мембран эритроцитов человека.

Очевидно, что увеличение молекулярной массы ВВ полимеров приводит к увеличению многоочечного связывания макромолекулы полимера с различными компонентами липидного бислоя мембран, которое в сумме приводит к значительному падению микровязкости мембран вследствие разрушения жидкокристаллической структуры мембран эритроцитов. Снижение микровязкости мембран эритроцитов на 40–60 % в присутствии 10 % ГГ, по-видимому, объясняется наличием в его молекуле трех гидрофобных метильных и одной метиленовой группы с одной стороны, а также двух гидроксильных групп, позволяющих молекулам ГГ осуществлять многоочечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок-липидное взаимодействие с поверхностными белками мембраны.

Полученные результаты имеют практическую значимость для создания лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием и заданной биодоступностью.

Ключевые слова: фармацевтические вспомогательные вещества, микровязкость, мембраны эритроцитов, метод спиновых зондов

**Л. В. Иванов, О. М. Ляпунов, М. Т. Картель, О. А. Нардид,
Я. О. Черкашина, Л. В. Деримедведь**

Порівняльне дослідження впливу низки фармацевтичних допоміжних речовин на мікрів'язкість мембран еритроцитів крові людини та щурів методом спінових зондів

Вивчено вплив ряду фармацевтичних допоміжних речовин (ДР) на мікрів'язкість мембран еритроцитів людини і щурів методом спінових зондів. Дія на мембрани еритроцитів нетоксичних, водорозчинних, низькомолекулярних фармацевтичних розчинників пропіленгліколю (ПГ), поліетиленгліколів з молекулярною масою 300 (ПЕГ-300) та молекулярною масою 400 (ПЕГ-400) не призводить до суттєвої різниці в зміні мікрів'язкості мембран еритроцитів людини або щурів. Введення до еритроцитів людини або щурів ПГ або ПЕГ-300 призводить до початкового підвищення мікрів'язкості мембран клітин внаслідок дегідратації й подальшого зменшення мікрів'язкості мембран до початкового рівня внаслідок дифузії цих ДР всередину клітин і вирівнювання позаклітинного та внутрішньоклітинного осмотичного тиску.

Різниця в резистентності мембран еритроцитів людини та щурів до дії ДР з'являється при взаємодії клітин з цитотоксичними, осмотично активними ДР (розчинниками і полімерами), що мають у молекулах достатню кількість метильних і метиленових гідрофобних груп – гексиленгліколем (ГГ) і високомолекулярними ПЕГ. У цьому випадку мембрани еритроцитів щурів показують підвищену резистентність до дії ДР – зміна мікрів'язкості мембран еритроцитів щурів у присутності таких ДР менше, ніж мембран еритроцитів людини.

Вочевидь, збільшення молекулярної маси ДР полімерів призводить до збільшення багаточесного зв'язування макромолекули полімеру з різними компонентами ліпідного бішару мембран, яке загалом призводить до значного падіння мікрів'язкості мембран внаслідок руйнування рідкокристалічної структури мембран еритроцитів. Зниження мікрів'язкості мембран еритроцитів на 40–60 % у присутності 10 % гексиленгліколю, мабуть, пояснюється наявністю в молекулі ГГ трьох гідрофобних метильних і однієї метиленової групи з одного боку, а також двох гідроксильних груп, що дозволяють молекулам ГГ здійснювати багаторівневе зв'язування з поверхневими полярними і

гідрофобними внутрішніми ділянками мембран еритроцитів, порушуючи як рідкокристалічну структуру мембран, так і білок-ліпідну взаємодію з поверхневими білками мембрани. Отримані результати мають практичну значимість для створення лікарських препаратів з регульованим всмоктуванням і заданою біодоступністю.

Ключові слова: фармацевтичні допоміжні речовини, мікров'язкість, мембрани еритроцитів, метод спінових зондів

**L. V. Ivanov, A. N. Lyapunov, N. T. Kartel, O. A. Nardid, Ya. O. Cherkashina,
L. V. Derimedvid**

**Comparative study of the influence of some pharmaceutical excipients
on membrane microviscosity of human and rat blood erythrocytes
by spin probe method**

It was studied the influence of a number of pharmaceutical excipients (PE) on microviscosity of human and rat erythrocyte membranes by method of spin probes. Relatively non-toxic, water-soluble, low molecular weight solvents such as propylene glycol pharmaceutical, PEG-300 or PEG-400 did not lead to a significant changes of the erythrocyte membrane microviscosity both human and rat. Introduction to human or rat red blood cells PG or PEG-300 leads to an initial increase of cell membranes microviscosity as a result of dehydration and subsequent reduction microviscosity membrane to the initial level due to diffusion of PE into the cells and the extracellular and intracellular alignment osmotic pressure.

The difference in the resistance of human and rat erythrocyte's membranes appears under interaction with cytotoxic osmotically active PE (solvents, polymers) having a sufficient number of hydrophobic methyl and methylene groups in molecules – high molecular weight PEG and hexylene glycol. In this case rat erythrocyte's membranes exhibited enhanced resistance to the action of PE – changes of rat erythrocyte membranes microviscosity in the presence of such PE was smaller than in the case of human erythrocyte membranes.

Evidently, increasing the molecular weight of the polymers PE increases multipoint binding of macromolecule polymer with various components of the lipid bilayer membrane, which leads to a considerable drop in membrane microviscosity due to the destruction of liquid crystal structure erythrocyte membranes. Reduced erythrocyte membrane microviscosity by 40–60 % in the presence of 10 % hexylen glycol (HG), apparently is due to the presence in its molecule of three hydrophobic methyl and one methylene group, and two hydroxyl groups, allowing molecules HG to perform multipoint binding with surface polar and hydrophobic inner portions of erythrocyte membranes, disturbing as liquid crystal membrane structure and protein lipid interaction. The results obtained are of practical importance for the creation of drugs with adjustable absorption and defined bioavailability.

Key words: pharmaceutical excipients, microviscosity, membranes of erythrocytes, spin probe method

Надійшла: 11 листопада 2015 р.

Контактна особа: Ляпунов Олексій Миколайович, ДНУ «Науково-технологічний комплекс
«Інститут монокристалів НАН України», м. Харків. Тел.: + 38 0 57 341 01 09.
Електронна адреса: newmanpir@rambler.ru

К. О. Калько¹, С. М. Дроговоз¹, Н. В. Захарко², Т. К. Юдкевич³

Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків²Рівненський державний базовий медичний коледж³Центральна науково-дослідна лабораторія Національного фармацевтичного університету, м. Харків

Ключові слова: печінка, гострий гепатит, парацетамол, циркадіанний ритм, прооксидантно-антиоксидантна система

Розробка хронодетермінованих схем прийому препаратів – перспективний напрям оптимізації терапії. Основою даного терапевтичного підходу є врахування циркадіанного ритму показників функціонального стану організму та їхній десинхроноз за умов патології [1]. Практично при всіх патологічних процесах організму реєструється десинхроноз (порушення) зі сторони прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу [2, 3]. Однак даних відносно десинхронозу системи ПОЛ-АОЗ на моделі парацетамолового ушкодження печінки немає, тоді як саме дана модель парацетамолового гепатиту подібна за механізмом пошкодження печінки лікарськими засобами, що призначаються тривалими терапевтичними курсами (антибіотиками, протигрибковими, протиепілептичними та ін.) [4]. Отже, встановлення особливостей десинхронозу циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ при патології є актуальним питанням, а отримані дані можна використувати при хронодетермінованому призначенні лікарських препаратів, зокрема, гепатопротекторів.

Мета дослідження – встановлення циркадіанного ритму системи ПОЛ – АОЗ у фізіологічних умовах та її десинхроноз за умов парацетамолового ушкодження печінки.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі парацетамолового гепатиту (березень 2015 року). Модель гострого

ушкодження печінки викликали одноразовим введенням даного ксенобіотику в дозі 1000 мг/кг у вигляді суспензії на 2 % розчині крохмального гелю в наступні години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 [5]. Евтаназію тварин і забір крові та печінки проводили через 24 год після введення парацетамолу. У гомогенаті печінки визначали вміст відновленого глутатіону (ВГ), ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази [6]. Вибір обох статей тварин для експерименту зумовлений прагненням встановити добову залежність десинхронізуючого впливу токсичних доз парацетамолу з урахуванням статевієї приналежності тварин.

У експерименті було використано 128 щурів, а в кожній групі було по 8 самиць та 8 самців масою 170–220 г. З метою нівелювання впливу світлового фактора на синтез мелатоніну у вечірній та нічний періоди досліди проводили під інфрачервоною лампою [7]. Дані статистично опрацьовані за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP та пакета статистичних програм «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ [8].

Під час аналізу отриманих даних визначали **акрофазу** (момент доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника) та **бати-фазу** (момент доби, коли значення досліджуваного показника мінімальне), мезор (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) та амплітуду (найбільше відхилення від мезора

в обидва боки) показників системи АОЗ та активності процесів ПОЛ [8, 9]. Останні два показники вираховували за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [9].

Результати та їх обговорення. Парацетамол (пара-ацетамінофен) – ненаркотичний анагетик з центральним механізмом дії, у процесі біотрансформації утворює полярний високотоксичний метаболіт N-ацетил-р-бензохінонімін, який активує процеси ПОЛ у гепатоцитах [10].

Встановлено, що введення токсичних доз парацетамолу щурам призводить до розвитку десинхронозу системи АОЗ, що підтверджується зміною циркадіанної ритміки ключових компонентів АОС. Оскільки в метаболізмі парацетамолу бере участь система глутатіону [2], у групах патології спостерігали зниження вмісту саме ВГ у гепатоцитах у тварин обох статей. У самиць незалежно від годин дослідження, у які моделювали патологію (03.00; 09.00; 15.00; 21.00), рівень ВГ знижувався практично однаково – на 18–20 %, тоді як у самців показник знижувався по різному (табл. 1). Зокрема, розвиток парацетамолового гепатиту о 15.00 характеризується зниженням рівня ВГ на 20 % у тварин з патологією відносно інтактних, тоді як о 09.00 і 21.00 однаково – на 40 % та на 48 % о 03.00. У всіх вищенаведених випадках уміст ВГ у самиць та самців з патологією відносно інтактних тварин мав виразну тенденцію до зниження, але показник був статистично недостовірним (табл. 1).

За умов парацетамолового ушкодження печінки величина мезору вмісту ВГ зменшувалася на 21 % у самиць та на 36 % у самців відносно здорових тварин, що вказує на зниження рівня ключового компонента системи АОЗ за умов патологічного процесу. У щурів обох статей з патологією незмінним залишався період акрофази (15.00) та батифази (03.00), циркадіанного вмісту ВГ, який характерний здоровим тваринам. Також, незмінною залишалася амплітуда ритму ВГ у самців, тоді як у самиць вона знижувалася на 25 % відносно інтактних щурів, що свідчить про збереження у самців архітектоники

ритму, характерного інтактним тваринам, та про «згладження» ритму в самиць за умов патології (табл. 2).

Таким чином, згідно з вищенаведеними результатами, одноразове введення токсичної дози парацетамолу призводить до зниження вмісту ВГ, а виразність даних змін характеризується циркадіанною залежністю та статтю досліджуваних тварин.

На тлі введення парацетамолу самицям та самцям циркадіанна активність СОД не зазнає суттєвих змін, зокрема, у самиць мезор знижується з $(44,20 \pm 1,08)$ до $(40,24 \pm 2,26)$ у. о., а у самців – з $(44,97 \pm 2,32)$ до $(41,01 \pm 1,71)$ у. о.; амплітуда ритму незмінна в самиць та зменшується в 3,4 разу в самців («згладження» – вирівнювання циркадіанного ритму активності СОД у самців) (табл. 2).

На відміну від циркадіанної активності СОД на тлі патології, ритм активності каталази зазнавав змін протягом 1 доби. Зокрема, нівелюється циркадіанний пік активності (акрофаза) даного ферменту, який у інтактних тварин обох статей спостерігається о 15.00. Введення парацетамолу призводить до достовірного зниження активності каталази в цей період в 1,6 разу в самиць та в 1,8 разу в самців відносно інтактних тварин (табл. 1). Мезор даного показника зменшується на 15 % у самиць та на 18 % у самців, тоді як суттєво зменшується амплітуда ритму: у самиць на 97 % та на 76 % у самців, що свідчить про нівелювання циркадіанного ритму даного показника. Отже, аналіз величини мезору та амплітуди циркадіанного ритму активності каталази у тварин з патологією підтверджує розвиток десинхронозу на тлі парацетамолового ушкодження з порушенням циркадіанної архітектоники норморитму діяльності печінки, що характерна інтактним тваринам.

За фізіологічних умов у гепатоцитах присутній певний рівень ТБК-АП, уміст яких зазнає добових коливань залежно від стану системи ПОЛ-АОЗ (табл. 1). Рівень ТБК-АП, встановлений у наших експериментах як маркер активності процесів ПОЛ на тлі введення парацетамолу, практично не змінюється

Таблиця 1

Зміни циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ у щурів під впливом токсичної дози парацетамолу (n = 6-7)

Показник	Група тварин	Години доби, коли вводили токсичну дозу парацетамолу			
		03.00	09.00	15.00	21.00
Самиці					
Відновлений глутатіон, у. о.	Інтактний контроль	87,52 ± 8,25	105,21 ± 11,65	154,25 ± 13,52	78,33 ± 14,54
	Парацетамол, 1 г/кг	70,02 ± 19,78	75,49 ± 12,45	123,84 ± 8,57	68,45 ± 16,93
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		↓20	↓18	↓20	↓18
Супероксид-дисмутаза, у. о.	Інтактний контроль	42,59 ± 3,18	48,83 ± 2,59	46,04 ± 3,63	39,36 ± 3,73
	Парацетамол, 1 г/кг	39,16 ± 3,94	43,48 ± 2,56	43,00 ± 2,84	35,34 ± 2,88
Каталаза, мккат/л	Інтактний контроль	43,60 ± 2,89	50,46 ± 4,24	78,22 ± 3,74	50,08 ± 3,07
	Парацетамол, 1 г/кг	48,15 ± 6,76	46,27 ± 5,56	48,98 ± 8,19*	46,58 ± 5,25
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		–	–	↓37	–
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Інтактний контроль	25,85 ± 2,85	16,24 ± 2,36	17,21 ± 3,37	30,51 ± 0,81
	Парацетамол, 1 г/кг	29,06 ± 4,88	16,23 ± 3,60	19,02 ± 2,03	33,12 ± 3,61
Самці					
Відновлений глутатіон, у. о.	Інтактний контроль	70,74 ± 17,93	105,65 ± 10,96	157,75 ± 13,58	89,71 ± 17,47
	Парацетамол, 1 г/кг	36,54 ± 12,99	62,98 ± 3,44	125,81 ± 14,82	47,68 ± 13,27
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		↓48 %	↓40 %	↓20 %	↓40 %
Супероксид-дисмутаза, у. о.	Інтактний контроль	47,09 ± 3,65	48,35 ± 4,26	44,28 ± 3,92	40,16 ± 4,49
	Парацетамол, 1 г/кг	40,34 ± 4,98	43,16 ± 2,29	39,88 ± 2,50	40,67 ± 4,15
Каталаза, мккат/л	Інтактний контроль	45,77 ± 6,49	48,13 ± 5,86	81,37 ± 1,32	50,27 ± 5,83
	Парацетамол, 1 г/кг	52,05 ± 5,96	44,80 ± 8,24	44,32 ± 9,64*	40,81 ± 8,99
Зміна показника відносно інтактного контролю, %		–	–	↓45 %	–
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Інтактний контроль	26,93 ± 2,24	16,12 ± 4,98	19,74 ± 7,08	34,40 ± 2,85
	Парацетамол, 1 г/кг	28,20 ± 3,74	16,02 ± 3,39	18,37 ± 4,00	31,84 ± 2,70

Примітка. Тут і в табл. 2: *відхилення показника достовірно значущі ($p < 0,05$) відносно інтактних тварин; n – кількість тварин у групі.

*Хронобіологічна характеристика стану системи ПОЛ-АОЗ інтактних тварин та тварин за умов патології (циркадіанний ритм)
за програмою Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP (n = 6–7)*

Показник	Інтактний контроль		Парацетамол, 1 г/кг	
	Мезор	Амплітуда	Мезор	Амплітуда
Самиці				
Відновлений глутатіон, у. о	106,33 ± 6,06	35,97 ± 7,15	84,45 ± 8,58	27,14 ± 4,22
Супероксиддисмутаза, у. о	44,20 ± 1,08	5,04 ± 1,66	40,24 ± 2,26	4,50 ± 1,39
Каталаза, мккат/л	55,59 ± 2,06	17,31 ± 2,48	47,49 ± 3,02	0,44 ± 2,01
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	22,45 ± 1,18	8,34 ± 1,06	24,36 ± 0,88	9,82 ± 2,00
Самці				
Відновлений глутатіон, у. о.	105,96 ± 6,49	44,23 ± 10,22	68,25 ± 9,48*	45,29 ± 7,54
Супероксиддисмутаза, у. о.	44,97 ± 2,32	4,33 ± 2,06	41,01 ± 1,71	1,27 ± 1,23
Каталаза, мккат/л	55,38 ± 1,74	17,83 ± 2,56	45,49 ± 6,91	4,35 ± 2,70
ТБК-активні продукти, мкмоль/г	24,30 ± 2,85	9,82 ± 1,86	23,61 ± 2,47	9,31 ± 1,67

протягом 1 доби порівняно з інтактними тваринами: акрофази та батифази вмісту ТБК-АП здорових тварин і тварин з патологією зберігаються (21.00 та 09.00 відповідно), а величини мезору та амплітуди не мають суттєвих відмінностей у тварин з патологією відносно інтактних щурів (табл. 1; табл. 2).

Як правило, на тлі патологічного процесу спостерігається суттєве зростання вмісту ТБК-АП відносно фізіологічного рівня [2], відсутність такого за умов даного експерименту можна пояснити тим, що ТБК-АП – вторинні продукти процесів ПОЛ, та за умов моделюваної патології, коли евтаназію тварин проводили через 24 год після введення парацетамолу, пройшло недостатньо часу для утворення саме вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-АП. Проте отримані результати додатково підтверджують наявність чіткого циркадіанного ритму вмісту ТБК-АП у гепатоцитах щурів, синхронного у тварин обох статей.

Висновки

1. Уведення токсичної дози парацетамолу призводить до зниження пулу ВГ у тварин обох статей відносно інтактних щурів: у самиць – на 18–20 %, у самців – на 20–48 %. У тварин обох статей на тлі патології періоди акро-

фази та батифази вмісту ВГ аналогічні таким інтактних тварин.

2. Уведення токсичної дози парацетамолу щурам обох статей призводить до десинхронозу циркадіанного ритму активності каталази з нівелюванням виразної акрофази, характерної для інтактних тварин – о 15.00, та зі «згладженням» архітекτονіки ритму – амплітуда зменшується на 97 % у самиць та на 76 % у самок.
3. Уведення токсичної дози парацетамолу не впливає на зміну мезору циркадіанного ритму активності СОД у самиць та самців щурів, однак, амплітуда ритму в самців зменшується в 3,4 рази, що вказує на «згладження» ритму.
4. Реєструється чіткий циркадіанний ритм умісту ТБК-АП у гепатоцитах щурів, синхронний у тварин обох статей, який не порушується за умов одноразового введення токсичної дози парацетамолу.
5. Аналіз отриманих результатів щодо токсичного впливу парацетамолу на ритм показників системи ПОЛ-АОЗ свідчить про відсутність суттєвих міжстатевих відмінностей у розвитку десинхронозу під впливом даного ксенобіотика в щурів обох статей, за винятком більш виразного зниження рівня ВГ у самців порівняно з самицями.

1. Хронофармакология наглядно (Хронофармакология в таблицах и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз [и др.]. – Харьков : Титул, 2014. – 128 с.
2. Біохімія: підручник / за загальною редакцією проф. А. Л. Загайко, проф. К. В. Александрової. – Харків : Вид-во «Форт», 2014 – 728 с.
3. Tong X. Circadian rhythms in liver physiology and liver diseases / X. Tong, L. Yin // Compr Physiol. – 2013. – № 3. – P. 917–940.
4. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам групп лекарственных для печени / А. В. Матвеев. – Симферополь : ИТ «Ариал», 2013 – 384 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под. ред. док. мед. наук. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч.1. – 944 с.
6. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
7. Семененко С. Б. Особливості структури хроноритмів екскреторної функції нирок за умов гіперфункції шишкоподібної залози / С. Б. Семененко // Буковинський медичний вісник. – 2014. – Т. 18, № 2 (70). – С. 99–101.
8. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
9. Карп В. П. Вычислительные методы анализа в хронобиологии и хрономедицине / В. П. Карп, Г. С. Катинас. – Санкт-Петербург, 1997. – 115 с.
10. Дроговоз С. М. Лекарственная токсикология: учебник-справочник / С. М. Дроговоз, В. Д. Лукьянчук, Б. С. Шейман. – Харьков : Титул, 2015. – 592 с.

К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич

Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу

Мета дослідження – встановлення циркадіанного ритму системи ПОЛ-АОЗ за фізіологічних умов та її десинхроноз за умов парацетамолового ушкодження печінки. Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі гострого парацетамолового гепатиту, який моделювали в наступні періоди доби: ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00) одноразовим введенням парацетамолу в дозі 1000 мг/кг щура. Евтаназію тварин проводили через 24 год після введення ксенобіотику. Циркадіанний ритм системи ПОЛ-АОЗ оцінювали за активністю СОД, каталази, вмісту ВГ і ТБК-АП.

Встановлено, що розвиток гострого парацетамолового гепатиту призводить до десинхронозу системи АОЗ, про що свідчить зміна циркадіанного ритму ключових компонентів АОС. Зокрема, нівелюється добовий ритм активності каталази (амплітуда знижується на 97 % у самиць та на 76 % у самців), тоді як такий у активності СОД зберігається (зменшення мезору ритму відносно інтактних тварин несуттєве: на 9 % у самиць та на 10 % у самців). Зниження вмісту ВГ підтверджується зміною мезору ритму даного показника на 21 % у самок та на 36 % у самців відносно інтактних тварин, тоді як збереження мезору на тлі патології та амплітуди вмісту ТБК-АП, характерного для інтактних тварин, свідчить про відсутність змін даного показника за умов одноразового гострого парацетамолового гепатиту. Отримані результати слід враховувати з метою адекватної оцінки результатів експериментів при вивченні традиційних і перспективних гепатопротекторів.

Ключові слова: печінка, гострий гепатит, парацетамол, циркадіанний ритм, прооксидантно-антиоксидантна система

Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич

Влияние токсических доз парацетамола на циркадианный ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза

Цель исследования – установить циркадианный ритм системы ПОЛ-АОЗ в физиологических условиях и ее десинхроноз при парацетамоловом повреждении печени. Исследования проводили на крысах обоих полов на модели острого парацетамолового гепатита, который моделировали в следующие периоды суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00) однократным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг. Эвтаназию животных проводили через 24 ч после введения ксенобіотику. Циркадианный ритм системы ПОЛ-АОЗ оценивали по активности СОД, каталазы, содержанию ВГ и ТБК-АП.

Установлено, что развитие острого парацетамолового гепатита приводит к десинхронозу системы АОЗ, о чем свидетельствуют изменения циркадианного ритма ключевых компонентов АОС. В частности нивелируется суточный ритм активности каталазы (амплитуда снижается на 97 % у самок и на 76 % у самцов), тогда как ритм активности СОД сохраняется (уменьшение мезора ритма относительно интактных животных незначительное: на 9 % у самок и на 10 % у самцов). Снижения содержания ВГ подтверждается изменением мезора ритма данного показателя на 21 % у самок и на 36 % у самцов относительно интактных животных, тогда как сохранение мезора и амплитуды ритма содержания ТБК-АП, характерного для интактных животных, подтверждает отсутствие изменения данного показателя в условиях острого парацетамолового гепатита. Полученные данные следует учитывать для адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

Ключевые слова: печень, острый гепатит, парацетамол, циркадианный ритм, прооксидантно-антиоксидантная система

K. O. Kalko, S. M. Drogovoz, N. V. Zakharko, T. K. Yudkevich
The influence of paraacetaminofen toxic dose on circadian rhythm
of prooxidant-antioxidant homeostasis

The aim of the study was to establish the circadian rhythm of prooxydant- antioxidant system in physiological conditions and it's desynchronosis under paraacetaminofen liver damage. The study was conducted on rats of both sexes on the model of acute paraacetaminofen hepatitis which performed in subsequent periods of day: in the morning (09.00), day (15.00), evening (21.00) and night (03.00) by administration of paraacetaminofen at a dose of 1000 mg/kg. The evaluation of circadian rhythm of prooxydant-antioxidant system in animals performed 24 h after administration of xenobiotic on such parameters as SOD and catalase activities and also on the malondialdehyde and reduced glutathione (RG) contents.

It was found that the development of acute paraacetaminofen hepatitis leads to the desynchronosis of prooxydant-antioxidant system evidenced by changes in circadian rhythm of it key components. In particular, the catalase activity circadian rhythm was leveled (amplitude reduced by 97 % in females and 76 % in males) while the circadian rhythm of SOD activity was kept (decrease of mezor was negligible relative to intact animals: by 9 % in females and 10 % in males). Reduction of RG content confirmed by the changes mezor rhythm of this index by 21 % in females and 36 % in males as to intact animals, while preserving mezor and amplitude rhythm of malondialdehyde content characteristic for intact animals confirms no changes of this indicator in terms of acute paraacetaminofen hepatitis. The results obtained should be considered in order to adequately assess the results of experiments during the study of traditional and advanced hepatoprotective drugs.

Key words: liver, acute paraacetaminofen hepatitis, circadian rhythm, prooxydant-antioxidant system

Надійшла: 12 жовтня 2015 р.

Контактна особа: Калько Катерина Олександрівна, аспірант з відривом від виробництва, старший лаборант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61000. Тел.: + 38 0 96 943 17 94.
Електронна пошта: kalko_sonkina@mail.ru

Н. О. Мєшкова¹, О. В. Міщенко¹, В. Л. Олійник¹,
Г. М. Олійник², Н. І. Шарикіна¹

Дослідження цитостатичної дії похідних хіназоліну

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії
медичних наук України», м. Київ

²Державна установа «Науково-практичний центр ендovasкулярної нейрорентгенохірургії
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: похідні хіназоліну, Ерлотиніб, Теразозин, сполука 3105, трансдукція мітогенного сигналу EGFR, EGF, сурамін, тирфостин, цитостатична дія

Нашими попередніми дослідженнями була показана здатність α_1 -адрено-блокаторів – похідних хіназоліну проявляти цитостатичну дію на лінії недрібноклітинного раку легенів людини та штамах експериментальних пухлин [1, 2], яка дорівнювала чи перевищувала активність препарату-стандарту Ерлотинібу, що є одним з провідних протипухлинних засобів для лікування недрібноклітинного раку легенів людини та низки інших форм пухлинної хвороби [3]. Найактивнішими серед похідних хіназоліну були Теразозин та сполука 3105.

Мета дослідження – вивчення окремих ланок цитостатичної дії Ерлотинібу, Теразозину та сполуки 3105 у трансдукції мітогенних сигналів каскаду епідермального фактора росту (EGF) та його рецептора (EGFR).

Матеріали та методи. *Культивування пухлинних клітин.* А549 – клітинна лінія недрібноклітинного раку легенів, отримана в 1972 році D. J. Giard та ін. шляхом культивування експлантів карциноматозної тканини легені 58-річного чоловіка [1].

Клітинну лінію недрібноклітинного раку легенів людини А549 культивували у повному поживному середовищі RPMI 1640 (HyClone, США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS) (HyClone, США) у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂, 95 % повітря (стандартні умови). По досягненню

рівня конфлюентності моношару 80–90 % старе поживне середовище видаляли, додавали 1 мл 0,25 % трипсину (HyClone, США) та культивували за стандартних умов протягом 10 хв до відокремлення клітин від стінки флакона. Після інактивації трипсину 100 мкл FBS концентрацію клітин підраховували за допомогою камери Горяєва, розбавляли клітинну суспензію необхідною кількістю свіжого повного поживного середовища та висівали в 96-лунковий планшет у концентрації 10 000 клітин на 1 лунку і культивували за стандартних умов протягом 3 діб.

Оцінка цитотоксичності сполук in vitro за допомогою МТТ-тесту. EGF вносили в лунки в концентрації 100 нг/мл, решту досліджуваних сполук – у концентрації 100 мкмоль/л (n = 4). У планшеті залишали лунки з інтактними клітинами – контроль життєздатності клітин (n = 8). Оцінку цитотоксичної активності речовин на клітинах недрібноклітинного раку легенів людини А549 проводили в колориметричному тесті з використанням жовтого барвника (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ) (Appllichem, Німеччина), що в живих клітинах перетворюється на пурпуровий формазан [4]. Після закінчення експозиції досліджуваних сполук з лунок видаляли культуральне середовище та вносили по 10 мкл розчину МТТ з 100 мкл свіжого поживного середовища та інкубували протягом 4 год у темряві за стандартних умов. Після цього вміст лунок видаляли й розчиняли МТТ-формазанові кристали додаванням 50 мкл ДМСО у кожен лунку. Оптичну густину забарвлених клітин вимірювали

на спектрофотометрі для мікропланшет (АКИЦ-01, Росія) за довжини хвилі 490 нм. Ступінь пригнічення росту клітин у дослідних лунках визначали відносно контрольних лунок.

Статистичну обробку та графічне оформлення результатів здійснювали за допомогою MS Excel 2007 (Microsoft Office, США) з використанням t-критерію Стюдента. Зміни вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Проведено вивчення впливів на ланки передачі мітогенного сигналу в каскаді епідермального фактора росту на лінії недрібноклітинного раку легенів з експресованою активністю рецептора епідермального фактора росту [1], екзогенного епідермального фактора росту, сураміну, який, за даними авторів, може переривати передачу мітогенного сигналу від епідермального фактора росту [7], протеази тирфостину, що інактивує фосфотирозин рецептора [8].

Додавання до клітин А549 екзогенного EGF практично не змінювало кількість живих клітин порівняно з контролем (клітини без додавання БАР) (оптична густина відповідно $(0,82 \pm 0,12)$ та $(0,68 \pm 0,11)$).

Тирфостин значно зменшує кількість живих клітин (оптична густина $(0,12 \pm 0,01)$ порівняно з контролем $(0,64 \pm 0,03)$). Тирфостин зменшує кількість живих клітин на фоні додавання EGF $(0,15 \pm 0,01)$.

Ерлотиніб має здатність значно знижувати кількість живих клітин лінії недрібноклітинного раку легенів люди-

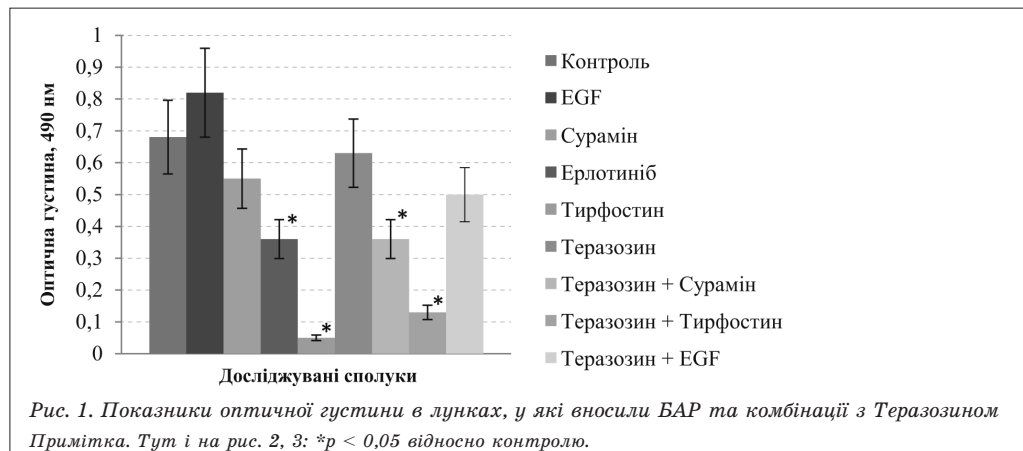
ни (А549) (показник оптичної густини $(0,48 \pm 0,01)$ порівняно з контролем – $(0,64 \pm 0,03)$).

При екзогенному введенні EGF + Ерлотиніб цей показник оптичної густини практично не змінюється $(0,45 \pm 0,02)$. Різде зниження живих клітин при введенні тирфостину $(0,15 \pm 0,01)$ підсилюється введенням Ерлотинібу $(0,10 \pm 0,01)$.

Таким чином, у дії Ерлотинібу мають місце механізми, які здатні послаблювати дію EGF: пригнічуюча дія на активність рецептора епідермального фактора росту та пригнічення трансактивації рецепторів GPCR та EGFR.

Результати дослідження впливу на пухлинні клітини лінії недрібноклітинного раку легенів людини (А549) похідних хіназоліну – Теразозину та сполуки 3105, які були зазначені в попередніх дослідженнях як перспективні, відображено на рисунках 1–3. Препарат-стандарт – Ерлотиніб.

Теразозин незначно зменшує кількість живих клітин у культурі порівняно з контролем (оптична густина відповідно $(0,63 \pm 0,05)$, $(0,69 \pm 0,11)$), поступається Ерлотинібу $(0,36 \pm 0,03)$. Сурамін зменшує кількість живих клітин у культурі до $(0,55 \pm 0,02)$. При додаванні Теразозину показник становить $(0,35 \pm 0,03)$. Сполука 3105 при дії на культуру недрібноклітинного раку легенів людини знижує кількість живих клітин з $(0,69 \pm 0,11)$ у контролі до $(0,24 \pm 0,01)$, що за ефективністю вище, ніж у Ерлотинібу $(0,36 \pm 0,03)$ та значно перевищує Теразозин $(0,63 \pm 0,05)$.



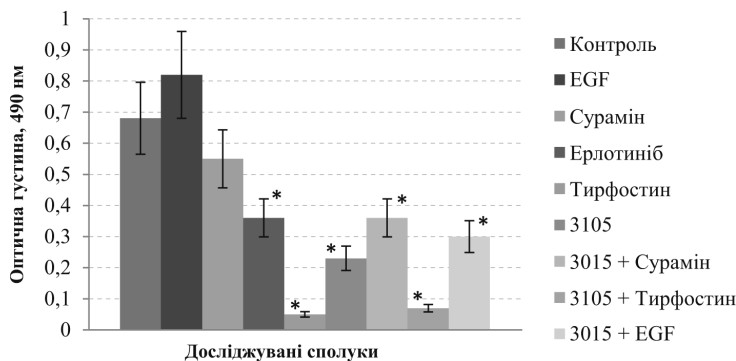


Рис. 2. Показники оптичної густини в лунках, у які вносили БАР та комбінації зі сполукою 3105.

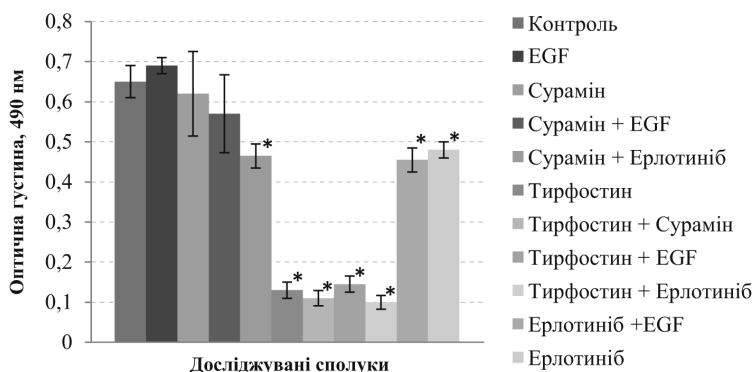


Рис. 3. Показники оптичної густини в лунках, у які вносили БАР та комбінації з Ерлотинібом.

У цілому, дослідження показали, що на лінії недрібноклітинного раку легенів людини (A549) здатність зменшувати кількість живих клітин найвираженіша в сполуки 3105. Її ефект перевищує такий у препарату-стандарту Ерлотинібу (показники оптичної густини ($0,24 \pm 0,01$) та ($0,36 \pm 0,03$) відповідно). Теразозин практично не виявив активність на цій моделі (показник

оптичної густини – ($0,63 \pm 0,05$), контроль – ($0,69 \pm 0,11$).

Висновок

Показано, що за цитостатичною активністю серед досліджуваних похідних хіназоліну найвищий ефект має сполука 3105, дія якої перевищувала таку відомого таргетного препарату Ерлотинібу.

1. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J. [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 1973. – V. 51, № 5. – P. 1417– 1423.
2. Цитостатична дія α_1 -адреноблокаторів – похідних хіназоліну / Мешкова Н. О., Міщенко О. В., Захаренко В. В., Шарикіна Н. І. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 4– 5 (45) – С. 65– 68.
3. D'Arcangelo M. Erlotinib in the first-line treatment of non-small -cell lung cancer / D'Arcangelo M., Cappuzzo F. // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2013. – V. 13, № 5. – P. 523– 533.
4. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / Mosmann T. // Journal of Immunological Methods. – 1983. – V. 1–2, № 65. – P. 55–63.
5. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylations at tyrosine 992 and enhanced *in vivo* tyrosine phosphorylation of cell substrates / Walton G.M., Chen W.S., Rosenfeld M.G. [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 1750–1754.
6. Hongxiang Hui // The α_1 -adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- κ B signaling to induce breast cancer cell apoptosis / Hongxiang Hui, M. A. Fernando, A. P. Heaney // European Journal of Cancer. – 2008. – V. 44, №1. – P. 160–166.

-
7. Mechanisms of growth stimulation by suramin in non-small-cell lung cancer cell lines / Lokshin A., Peng X., Campbell P.G. [et al.] // Cancer Chemother Pharmacol. – 1999. – V. 43, № 4. – P. 341– 347.
8. Weyergang A. Photodynamic targeting of EGFR does not predict the treatment outcome in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor Tyrphostin AG1478 / Weyergang A., Kaalhus O., Berg K. // Photochem Photobiol Sci. – 2008 – V. 7, № 9. – P. 1032–1040.

Н. О. Мешкова, О. В. Мищенко, В. Л. Олійник, Г. М. Олійник, Н. І. Шарикіна
Дослідження цитотоксичної дії похідних хіназоліну

На лінії недрібноклітинного раку легенів людини A549 було досліджено вплив похідних хіназоліну, а також EGF, сураміну і тирфостину на передачу мітогенного сигналу в каскаді епідермального фактора росту. За допомогою МТТ-тесту показано, що серед похідних хіназоліну цитотоксична дія найбільша в сполуки 3105. Протипухлинна активність останньої перевищує таку препарату-стандарту Ерлотинібу.

Ключові слова: похідні хіназоліну, Ерлотиніб, Теразозин, сполука 3105, трансдукція мітогенного сигналу EGFR, EGF, сурамін, тирфостин, цитостатична дія

Н. О. Мешкова, О. В. Мищенко, В. Л. Олейник, Г. М. Олейник, Н. И. Шарыкина
Исследование цитотоксического действия производных хиназолина

На линии немелкоклеточного рака легких человека A549 изучено влияние производных хиназолина, а также EGF, сурамина и тирфостина, на передачу митогенного сигнала в каскаде эпидермального фактора роста. С помощью МТТ-теста показано, что среди производных хиназолина цитотоксическое действия наиболее выражено у вещества 3105. Противоопухолевая активность последнего превышает активность препарата-стандарта Эрлотиниба.

Ключевые слова: производные хиназолина, Эрлотиниб, Теразозин, вещество 3105, трансдукция митогенного сигнала EGFR, EGF, сурамин, тирфостин, цитостатическое действие

N. O. Meshkova, O. V. Mishchenko, V. L. Oliynyk, G. M. Oliynyk, N. I. Sharykina
The investigation of cytostatic action of quinazoline derivatives

On the non-small-cell lung cancer cell line A549 there was studied the influence of quinazoline derivatives, EGF, suramin and tyrphostin on mitogen signal transmission in EGF signaling pathway. With the use of MTT assay it was shown that among all quinazoline derivatives studied in this paper substance 3105 has the highest cytotoxic activity. Its antitumor activity exceeds such activity of standart drug Erlotinib.

Key words: quinazoline derivatives, Erlotinib, Terazosin, substance 3105, transduction of mitogenic signal EGFR: EGF, suramin, tyrphostin, cytostatic action

Надійшла: 4 грудня 2015 р.

Контактна особа: Мешкова Наталія Олександрівна, молодший науковий співробітник, відділ онкофармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 83 22. Електронна пошта: sharykina-39@ukr.net

М. А. Мохорт, Ю. М. Кутовий

Дослідження захисних ефектів фармакологічного прекондиціювання похідними імідазо[1,2-а] азепінію на функціонування серця щурів *in vivo* за умов регіональної ішемії

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: рекондиціювання
міокарда, похідні імідазо[1,2-а]азепінію,
ішемія-реперфузія, інфаркт міокарда

Короткі періоди ішемії зменшують пошкодження міокарда, що виникають унаслідок наступних триваліших періодів ішемії. Цей кардіопротекторний ефект називають ішемічним рекондиціюванням [1]. Встановлено, що феномен рекондиціювання запускається не тільки у відповідь на ішемію, але й під дією фармакологічних агентів. Такий вид рекондиціювання назвали фармакологічним [2]. Хоча процеси на тригерній та медіаторній стадіях рекондиціювання сьогодні ще достеменно невідомі, встановлено, що важливу участь під час ранньої фази рекондиціювання беруть протеїнкінази C і B, MAPK-, PI3K-, ERK1/2 – сигнальні шляхи, NO-синтаза, α_1 -адренорецептори [3]. Подальші дослідження виявили участь α_1 -адренорецепторів у процесах раннього [4–5] та пізнього рекондиціювання [6]. Було встановлено, що мітохондріальні АТФ-чутливі калієві канали (K_{ATP}) також залучені до механізмів рекондиціювання [7]. Наприклад, їхній активатор діазоксид проявляє дію, подібну до ранньої фази ішемічного рекондиціювання [8], а застосування 5-гідроксидеканонату (5HD), блокатора даних каналів, унеможливорює кардіопротекторні ефекти раннього ішемічного та фармакологічного рекондиціювання [9]. Припускають, що мітохондріальні K_{ATP} канали беруть участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу під час запуску ранньої фази рекондиціювання, викликаній активацією α_1 -адренорецепторів [10].

У відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» ведуться пошуки ефективних сполук, здатних рекондиціювати міокард, серед похідних імідазо[1,2-а]азепінію, синтезованих у тому самому інституті у відділі синтезу фізіологічно активних речовин під керівництвом доктора фарм. наук, професора А. М. Демченка [13]. Попередні дослідження показали, що низка синтезованих сполук ефективно знижували тонус судин на фоні гіперкалієвої констрикції за умов *in vitro* [14]. Зважаючи на попередні дослідження *in silico*, зроблено припущення, що вазодилаторна активність виділених похідних може бути пов'язаною з впливом на мітохондріальні K_{ATP} канали. Було проведено скринінгове дослідження 9 сполук щодо здатності рекондиціювати міокард на моделі ізолюваного серця щура і виділено 2 сполуки-лідери під шифрами ІФТ_000280 та ІФТ_000281. У подальших дослідженнях дані сполуки помітно знижували ступінь ушкодження міокарда, спричиненого ішемією-реперфузією, що виражалось в нижчих показниках активності маркерів інфаркту міокарда (лактатдегідрогенази та ізоформи МВ креатинкінази) у серцевому ефлюенті. Беручи до уваги вищевказані факти, ми вирішили провести вивчення кардіопротекторної дії речовин ІФТ_000280 і ІФТ_000281 на моделі *in vivo*, моделюючи регіональну ішемію. У даній роботі наведено результати цих досліджень.

Мета дослідження – вивчити захисні ефекти фармакологічного рекондиціювання похідними імідазо[1,2-а]азепінію

під шифрами ІФТ_000280 і ІФТ_000281 на функціонування серця щурів *in vivo* за умов регіональної ішемії.

Матеріали та методи. В експерименті використано 2 похідних імідазо[1,2-а]азепінію під шифрами ІФТ_000280 та ІФТ_000281. Як препарат порівняння використовували активатор K_{ATP} флокалін [15, 16]. Дослідження проводили на нелінійних білих щурах обох статей масою 150–300 г (розведення ПП «Біомодельсервіс») відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [17]. Досліджувані сполуки вводили *per os* 1 раз на 1 день протягом 3 днів напередодні експерименту. Тваринам контрольної групи вводили таким самим способом фізіологічний розчин. Тварин наркотизували шляхом внутрішньоочеревинного введення уретану з розрахунку 1,5 г/кг. Тваринам у стані хірургічного наркозу здійснювали трахеотомію, проводили катетеризацію лівої сонної артерії (для вимірювання артеріального тиску) та лівого шлуночка (для вимірювання тиску в ньому). Здійснювали моделювання регіональної ішемії шляхом оклюзії лівої коронарної артерії з подальшою реперфузією за штучної вентиляції легень з частотою 60–70 дихальних рухів за 1 хв і дихальним об'ємом 200–300 см³ за допомогою апарата РО-6Р. Для оцінки захисної дії досліджуваних сполук проводили оклюзію лівої коронарної артерії протягом 20 хв з подальшою реперфузією тривалістю 60 хв. Наприкінці реперфузії щурам протягом 1 хв внутрішньовенно вводили 2 % розчин метиленового синього для візуалізації меж ішемізованої ділянки міокарда. Потім серце швидко видаляли, промивали у фізіологічному розчині та розрізали в поперечному напрямку на 5 зрізів однакової товщини. Отримані зрізи фіксували 5 хв у 10 % розчині формаліну. Отримані препарати фотографували під мікроскопом і визначали площу зони інфаркту за допомогою комп'ютерної програми IpSquare 5.0.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили в програмі Statistica 6.0 [18]. Достовірними вважа-

лися значення при $p < 0,05$. Результати, представлені на рисунку, наведено у вигляді змін (y %) відносно контролю.

Результати та їх обговорення. Результати вимірювання показників гемодинаміки за умов експериментальної ішемії-реперфузії міокарда у контрольних та дослідних тварин наведено в таблиці.

Як видно з результатів, наведених у таблиці 1, під час регіональної ішемії в тварин, яким вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, спостерігали підвищення системного артеріального тиску ($117,50 \pm 6,73$ % та $109,20 \pm 7,49$ % відповідно, $p < 0,05$, $n = 6$), у той час як у групах тварин із введенням препарату порівняння флокаліну та контрольній групі спостерігали зниження даного показника порівняно з вихідними значеннями (до регіональної ішемії). Флокалін знижував частоту серцевих скорочень у період ішемії ($83,5 \pm 7,29$ %), $p < 0,05$, $n = 6$) порівняно з вихідними значеннями, тоді як досліджувані сполуки не викликали статистично значущої зміни параметра.

Під час ішемії тиск у лівому шлуночку та швидкість скорочення ($dp/dt_{\max}$) і розслаблення ($dp/dt_{\min}$) міокарда у тварин усіх груп знижувалися, але помітної різниці між групами не спостерігали.

У період реперфузії системний артеріальний тиск у тварин усіх досліджуваних груп знижувався, але в групах тварин, яким вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281 це зниження було меншим ($89,10 \pm 6,11$ % і $92,6 \pm 4,19$ % відповідно, $p < 0,05$, $n = 6$) порівняно з контрольною групою та групою з введенням флокаліну.

Частота серцевих скорочень у групах тварин, яким вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, під час реперфузії залишалася стабільною і статистично не відрізнялася від вихідних значень, тоді як у контрольних тварин вона підвищувалася, а в групі флокаліну – навпаки зменшувалася.

Тиск у лівому шлуночку в групах тварин, яким вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, був знижений ($94,50 \pm 8,05$ % та $96,20 \pm 6,81$ % відповідно, $p < 0,05$, $n = 6$)

Показники каардіогемодинаміки в щурів за умов ішемії-реперфузії та впливу похідних імідазо[1,2-а]азепінію (% до вихідного значення)

Показник	Експериментальна група	10 хв ішемії	20 хв ішемії	10 хв реперфузії	30 хв реперфузії	60 хв реперфузії
Системний артеріальний тиск	Ішемія (контроль)	81,30 ± 3,19	76,10 ± 9,05	109,30 ± 2,41	88,50 ± 7,26	60,40 ± 8,58
	ІФТ_000280	91,10 ± 3,85	117,50 ± 6,73*	105,10 ± 4,91	94,80 ± 5,39	89,10 ± 6,11*
	ІФТ_000281	89,20 ± 5,54*	109,20 ± 7,49*	100,90 ± 8,36	99,40 ± 8,64*	92,60 ± 4,19*
	Флокалін	95,10 ± 8,03	92,50 ± 4,42	89,30 ± 5,39*	84,10 ± 3,94	78,4 ± 4,49
ЧСС	Ішемія (контроль)	105,60 ± 8,11	114,20 ± 8,63	119,30 ± 8,83	120,20 ± 11,24	118,10 ± 6,92
	ІФТ_000280	101,20 ± 7,75	96,20 ± 8,49	107,10 ± 6,02*	102,30 ± 9,24*	105,90 ± 10,64
	ІФТ_000281	100,10 ± 9,05	93,50 ± 7,91*	101,40 ± 10,21*	97,80 ± 8,17*	102,60 ± 8,73*
	Флокалін	88,20 ± 6,54*	83,50 ± 7,29*	80,10 ± 8,97*	77,90 ± 7,08*	89,10 ± 4,16*
Тиск у лівому шлуночку	Ішемія (контроль)	90,60 ± 7,22	96,20 ± 6,29	108,40 ± 9,53	103,10 ± 8,96	95,10 ± 7,09
	ІФТ_000280	92,80 ± 9,47	90,30 ± 5,81	91,10 ± 8,52*	94,50 ± 8,05*	97,50 ± 7,12
	ІФТ_000281	95,30 ± 6,03	91,80 ± 7,29	93,10 ± 8,09	96,20 ± 6,81	97,60 ± 5,93
	Флокалін	94,10 ± 8,14	96,70 ± 6,13	92,50 ± 8,03*	94,20 ± 9,51*	95,30 ± 9,02
dp/dt _{max}	Ішемія (контроль)	93,40 ± 7,76	92,70 ± 6,94	97,30 ± 7,18	79,20 ± 5,57	71,20 ± 8,84
	ІФТ_000280	92,10 ± 5,33	91,30 ± 7,08	88,10 ± 7,89	93,10 ± 8,12*	89,20 ± 6,07*
	ІФТ_000281	96,10 ± 5,46	90,80 ± 9,15	87,60 ± 6,11*	86,10 ± 5,38	87,40 ± 4,99*
	Флокалін	97,10 ± 8,36	95,10 ± 7,03	83,40 ± 5,79*	85,10 ± 6,82	81,30 ± 7,73
dp/dt _{min}	Ішемія (контроль)	93,60 ± 8,68	94,30 ± 7,41	80,40 ± 8,41	78,80 ± 9,73	77,40 ± 8,04
	ІФТ_000280	93,80 ± 4,67	91,70 ± 8,51	89,10 ± 7,43*	85,90 ± 7,84	86,90 ± 7,62
	ІФТ_000281	95,30 ± 5,69	90,10 ± 6,55	87,20 ± 4,57	87,40 ± 6,41*	88,10 ± 8,09*
	Флокалін	91,10 ± 5,19	89,30 ± 5,85	84,10 ± 4,98	86,40 ± 7,59*	88,10 ± 7,43*

Примітка. Результати наведено у вигляді $M \pm m$, $n = 6$; * $p < 0,05$ відносно контролю.

порівняно зі значеннями контрольної групи ($103,10 \pm 8,96$) %, $p < 0,05$, $n = 6$) та статистично не відрізнявся від такого у групі з введенням флокаліну.

Швидкість скорочення ($dp/dt_{\max}$) і розслаблення ($dp/dt_{\min}$) міокарда в період реперфузії зменшувалася відносно вихідних значень у тварин усіх груп, але в групі з введенням ІФТ_000280 зменшення даних показників було меншим, ніж у інших групах ($89,20 \pm 6,07$) % для $dp/dt_{\max}$ та ($86,90 \pm 7,62$) % для $dp/dt_{\min}$ наприкінці реперфузії, $p < 0,05$, $n = 6$), у той час як у контрольній групі значення $dp/dt_{\max}$ становило ($71,20 \pm 8,84$) %, а $dp/dt_{\min}$ – ($77,40 \pm 8,04$) % від вихідних значень.

Таким чином, аналіз зміни показників кардіогемодинаміки під час моделювання регіональної ішемії-реперфузії показав, що відбувається зниження (окрім частоти серцевих скорочень) досліджуваних показників – системного артеріального тиску, тиску у лівому шлуночку, швидкості скорочення ($dp/dt_{\max}$) і розслаблення ($dp/dt_{\min}$) міокарда. Але у тварин, яким вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, зниження значень системного артеріального тиску та тиску в лівому шлуночку було меншим, ніж у контрольних тварин, а в групі тварин із введенням ІФТ_000280 спостерігалася стабілізація показників $dp/dt_{\max}$ і $dp/dt_{\min}$.

Після гострої регіональної ішемії-реперфузії площа зони інфаркту в тварин контрольної групи становила ($11,30 \pm 2,15$)% від загальної площі лівого шлуночка, тоді як у тварин, яким вводили досліджувані сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, ці значення становили $10,7 \pm 2,03$ % і $8,9 \pm 1,35$ % відповідно, або ж порівняно з контрольними значеннями – ($94,70 \pm 6,38$) % та ($78,80 \pm 5,25$) % відповідно (рисунок).

Тобто, сполука ІФТ_000280 не впливала помітно на розмір зони інфаркту, а інше похідне імідазо[1,2-а]азепінію – ІФТ_000281 спричиняло статистично значуще зменшення площі зони інфаркту, хоча цей ефект був виражений менше, ніж за впливу відомого активатора $K_{\text{АТФ}}$ каналів флокаліну (відношення зони інфаркту до площі лівого

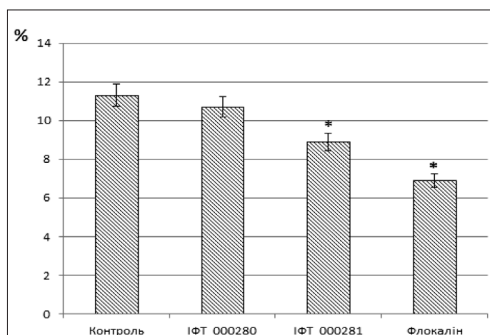


Рисунок. Відношення площі зони інфаркту до площі лівого шлуночка для сердець тварин різних груп, %

Примітка. * $p < 0,05$ відносно контролю.

шлуночка становило ($61,10 \pm 4,13$) % від контрольних значень).

Отже, показано, що досліджені нові хімічні сполуки – похідні імідазо[1,2-а]азепінію під шифрами ІФТ_000280 та ІФТ_000281 під час моделювання гострої регіональної ішемії-реперфузії на щурах продемонстрували ефекти, які можуть сприяти їхній кардіопротекторній дії. Це помірно зниження артеріального тиску, тиску у лівому шлуночку і скоротливості міокарда та попередження тахікардії порівняно з показником контрольної групи тварин зменшує навантаження на уражене серце і сприяє підтриманню стабільного його функціонування в період ішемії. У результаті сполука ІФТ_000281 сприяла зменшенню зони інфаркту міокарда. Зазначені особливості досліджуваних речовин подібні до дії відомого активатора $K_{\text{АТФ}}$ каналів флокаліну, що може опосередковано вказувати на участь $K_{\text{АТФ}}$ каналів у реалізації фармакологічного preconditioning.

Висновок

У результаті дослідження захисних ефектів фармакологічного preconditioning похідними імідазо[1,2-а]азепінію під шифрами ІФТ_000280 та ІФТ_000281 на функціонування серця щурів *in vivo* було встановлено, що дані речовини стабілізують показники кардіогемодинаміки та запобігають розвитку тахікардії під час ішемії, а сполука ІФТ_000281 сприяє зменшенню розміру зони інфаркту міокарда.

1. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms / M. Zaugg, E. Lucchinetti, M. Uecker [et al.] // *Brit. J. Anaesth.* – 2003. – V. 91. – P. 551–565.
2. Noradrenaline reduces induced arrhythmia in anesthetized rats: involvement of alpha1-adrenoreceptors and mitochondrial KATP channels / A. Imani, M. Faghihi, S. S. Sadr [et al.] // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2008. – V. 19. – P. 309–315.
3. Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes / D. M. Rojas Gomez, J. S. Schulte, F. W. Mohr [et al.] // *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2008. – V. 377. – P. 77–85.
4. Obligatory role of cardiac nerves and alpha1-adrenergic receptors for the second window of ischemic preconditioning in conscious pigs / R. K. Kudej, Y. T. Shen, A. P. Peppas [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – V. 99. – P. 1270–1276.
5. Alpha-adrenergic receptor stimulation produces late preconditioning through inducible nitric oxide synthase in mouse heart / M. I. Tejero-Taldo, E. Gursoy, T. C. Zhao et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – V. 34. – P. 185–195.
6. Ischemic preconditioning prevents reperfusion heart injury in cardiac hypertrophy by activation of mitochondrial KATP channels / K. G. Rajesh, S. Sasaguri, R. Suzuki [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2004. – V. 96. – P. 41–49.
7. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels delays ischemia-induced cellular uncoupling in rat heart / Y. L. Shen, Y. Y. Chen, X. D. Wu [et al.] // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2004. – V. 25. – P. 22–28.
8. A role of opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning via activation of protein kinase C in the canine heart / O. Tsukamoto, H. Asanuma, J. Kim [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 338. – P. 1460–1466.
9. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and post-conditioning by sevoflurane in the rat *in vivo* / D. Obal, S. Dettwiler, C. Favocchia [et al.] // *Anesth. Analg.* – 2005. – V. 101. – P. 1252–1260.
10. Gao H. Activation of alpha1B-adrenoceptors alleviates ischemia/reperfusion injury by limitation of mitochondrial Ca²⁺ overload in cardiomyocytes / H. Gao, L. Chen, H. T. Yang // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – V. 75. – P. 584–595.
11. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / [Мойбенко О. О., Досенко В. Э., Пархоменко О. М.]. – Киев, Наукова думка. – 2008. – 520 с.
12. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів / Р. Б. Струтинський, О. О. Мойбенко, Л. М. Ягупольський [та ін.] // *Фізіологічний журнал.* – 2001. – Т. 47, №2. – С. 16–23.
13. Патент на корисну модель № 73591 «Похідні 1-феніл-3-арил-3-гідрокси-2,3,6,7,8,9-гексагідро-5H-імідазо[1,2-A]азепінію, що проявляють міотропну спазмолітичну активність». З. № у 2012 04579, від 25.09.2012.
14. *Геращенко І.* Токोलітична активність похідних імідазо[1,2-а]азепінію / І. Геращенко // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2012. – Т. 31, № 6 – С. 37–41.
15. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних КАТФ-каналів / Р. Б. Струтинський, С. М. Пивовар, Л. В. Тумановська, О. О. Мойбенко // *Фізіологічний журнал.* – 2008. – Т. 54, № 6. – С. 15–23.
16. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокаліну / О. О. Мойбенко, Р. Б. Струтинський, Л. М. Ягупольський, М. А. Мохорт // *Наука та інновації.* – 2006. – Т. 2, № 4. – С. 114–119.
17. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137.
18. *Лапач С. Н.* Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2002. – 640 с.

М. А. Мохорт, Ю. М. Кутовий

Дослідження захисних ефектів фармакологічного прекодиціювання похідними імідазо[1,2-а]азепінію на функціонування серця щурів *in vivo* за умов регіональної ішемії

У попередніх дослідженнях було проведено скринінг кардіопротекторної активності в нових похідних імідазо[1,2-а]азепінію і виділено дві сполуки-лідери.

Мета дослідження – вивчення захисних ефектів фармакологічного прекодиціювання двох похідних імідазо[1,2-а]азепінію під шифрами ІФТ_000280 і ІФТ_000281 на функціонування серця щурів *in vivo* та за умов регіональної ішемії.

У результаті дослідження кардіопротекторних ефектів цих сполук на моделі *in vivo* за умов регіональної ішемії виявлено, що в тварин експериментальних груп, яким попередньо вводили сполуки ІФТ_000280 та ІФТ_000281, під час ішемії-реперфузії спостерігали стабілізацію функціонування

серця (попередження різкого зменшення скоротливої активності серця в період ішемії та розвитку тахікардії під час реперфузії). Крім цього, сполука ИФТ_000281 сприяла зменшенню зони інфаркту міокарда. Ці ефекти дуже подібні до дії фторвмісного активатора K_{ATP} каналів флокаліну, який використовували як препарат порівняння.

Отримані результати демонструють наявність кардіопротекторних ефектів у досліджуваних сполук, зокрема в ИФТ_000281. Зроблено припущення, що дані ефекти зумовлені запуском процесу фармакологічного preconditioning в організмі щурів. Щодо механізмів дії, то факти свідчать про високу ймовірність активації K_{ATP} каналів кардіоміоцитів сполуками ИФТ_000280 та ИФТ_000281.

Ключові слова: preconditioning міокарда, похідні імідазо[1,2-а]азепінію, ішемія-реперфузія, інфаркт міокарда

Н. А. Мохорт, Ю. М. Кутовой

Исследование защитных эффектов фармакологического preconditionирования производными имидазо[1,2-а]азепиния на функционирование сердца крыс *in vivo* в условиях региональной ишемии

В предыдущих исследованиях был проведен скрининг кардиопротекторной активности среди производных имидазо[1,2-а]азепиния и выделено два соединения-лидеры.

Цель исследования – изучение защитных эффектов фармакологического preconditionирования двух производных имидазо[1,2-а]азепиния под шифрами ИФТ_000280 и ИФТ_000281 на функционирование сердца крыс *in vivo* в условиях региональной ишемии.

В результате исследования кардиопротекторных эффектов этих соединений на модели *in vivo* в условиях региональной ишемии выявлено, что у животных экспериментальных групп, которым предварительно вводили соединения ИФТ_000280 и ИФТ_000281, при ишемии-реперфузии наблюдали стабилизацию функционирования сердца (предупреждение резкого уменьшения сократительной активности сердца в период ишемии и развития тахикардии во время реперфузии). Кроме этого, соединение ИФТ_000281 способствовало уменьшению зоны инфаркта миокарда. Эти эффекты подобны действию фторсодержащего активатора K_{ATP} каналов флокалина, который использовали в качестве препарата сравнения.

Полученные результаты демонстрируют наличие кардиопротекторных эффектов у исследуемых соединений, в частности, у вещества ИФТ_000281. Предполагается, что данные эффекты обусловлены запуском процесса фармакологического preconditioning в организме крыс. Если рассматривать механизмы действия, то факты свидетельствуют о высокой вероятности активации K_{ATP} каналов кардиомиоцитов соединениями ИФТ_000280 и ИФТ_000281.

Ключевые слова: preconditioning миокарда, производные имидазо[1,2-а]азепиния, ишемия-реперфузия, инфаркт миокарда

М. А. Mokhort, I. M. Kutovyi

Protective effects of pharmacological preconditioning by imidazo[1,2-a]azepinium derivatives on rat heart function *in vivo* upon regional ischemia

Previous studies had shown the ability of some imidazo[1,2-a]azepinium derivatives to induce cardio-protective effects similar to the effects of myocardial preconditioning. These effects include optimization of contractile activity of myocardium, coronary vessels dilatation and attenuation of ischemia-reperfusion injury. On the basis of previous results we have chosen two leader compounds, namely ИФТ_000280 and ИФТ_000281 to investigate their activity on live rat organism (*in vivo*).

The goal of this study was to investigate the protective effects of imidazo[1,2-a]azepinium derivatives ИФТ_000280 and ИФТ_000281 on rat heart functioning *in vivo* upon regional ischemia.

Chosen substances after introducing orally into rat organism have led to preventing tachycardia and contractile activity and blood pressure abrupt during ischemia-reperfusion. Besides that, a compound ИФТ_000281 significantly decreased myocardial infarction area. These effects were similar to flocalin – ATP-dependent potassium channels activator. So it was proposed the involvement channels of this type in the mechanisms of pharmacological preconditioning by ИФТ_000280 and ИФТ_000281.

In conclusion, it is clear that new imidazo[1,2-a]azepinium derivatives ИФТ_000280 and ИФТ_000281 have marked cardioprotective potential and need to be further investigated.

Key words: myocardium precondition, imidazo[1,2-a]azepinium derivatives, ischemia-reperfusion, myocardial infarction

Надійшла: 9 грудня 2015 р.

Контактна особа: Кутовой Юрій Миколайович, аспірант, відділ фармакології серцево-судинних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: +38 044 456 82 90. Електронна пошта: yurakutovyi@gmail.com.

О. С. Попов¹, С. К. Шебеко¹, І. А. Зупанець¹, А. С. Шаламай²

Дослідження впливу препарату «Диклокор» на спонтанну больову реакцію в експерименті

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», м. Київ

Ключові слова: Диклокор, диклофенак натрію, кверцетин, остеоартрит, щури, анальгезія

Диклофенак натрію (ДН) є препаратом з добре відомим і широко використовуваним анальгетичним ефектом. Показання для його застосування включають ревматичні захворювання, посттравматичне та постопераційне запалення, головний біль, мігрень тощо. Тим не менш, чисельні клінічні дослідження свідчать про наявність у цього препарату деяких побічних ефектів, насамперед, підвищення ризику гастропатій та інфаркту міокарда [1]. Тому актуальною науковою задачею є пошук таких комбінацій ДН з іншими сполуками, що дозволять знизити його дозування (а разом з цим і частоту виникнення побічних ефектів) при збереженні терапевтичної ефективності препарату. У зв'язку з цим, науковий інтерес становить новий комбінований лікарський засіб «Диклокор», який є фармацевтично підготовленою комбінацією ДН з біофлаваноїдом кверцетином. Кверцетин характеризується підтвердженою в експерименті фармакологічною активністю – виявляє потужну антиоксидантну дію, здатність інгібувати ліпоксигеназу, брати участь у регуляції синтезу простагландинів. Такий спектр фармакологічних властивостей кверцетину дозволяє прогнозувати виявлення синергізму протизапальної, анальгетичної та антиульцерогенної дії в складі композиційного засобу «Диклокор».

Мета дослідження – вивчити анальгетичні властивості препарату «Диклокор» шляхом оцінки його впливу на перебіг спонтанної больової реакції в щурів при одноразовому та повторному введенні на фоні розвитку гострого остеоартриту колінного суглоба [2, 3].

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження є оригінальний препарат «Диклокор» у капсулах, що містить 40 мг кверцетину та 25 мг ДН виробництва ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (Україна).

Як препарат порівняння використовували ДН (препарат «Вольтарен»). Обидва препарати вводили тваринам внутрішньощлунково 1 раз на 1 добу протягом 5 діб у дозах, що відповідають ЕД₅₀ за анальгетичною активністю – 12,0 мг/кг для Диклокору (доза ДН у складі Диклокору дорівнювала 4,6 мг/кг) та 5 мг/кг для ДН [4]. ЕД₅₀ Диклокору за анальгетичною активністю було визначено на попередньому етапі дослідження. Препарати вводили у вигляді суспензій, які готували на фізіологічному розчині при додаванні необхідної кількості Твін-80.

Дослідження впливу Диклокору на перебіг спонтанної больової реакції за умов розвитку гострого експериментального остеоартриту проводили на 20 білих нелінійних щурах обох статей масою 150–180 г, яких розподілили на 2 дослідні групи по 10 тварин: 1 група – тварини з остеоартритом, що отримували Диклокор у дозі 12,0 мг/кг (ЕД₅₀ за анальгетичною активністю); 2 група – тварини з остеоартритом, що отримували ДН у дозі 5 мг/кг (ЕД₅₀ за анальгетичною активністю [4]).

На початку експерименту всіх тварин піддавали наркозу шляхом внутрішньочеревинного введення розчину фенобарбіталу в дозі 40 мг/кг (при цьому орієнтовна тривалість наркозного сну складала 1,0–1,5 год [5]) та негайно проводили відтворення гострого остеоартриту колінного суглоба на правій задній лапі шляхом внутрішньосуглобового введення 25 мкл 2 % розчину

λ-карагеніну (Sigma, США), виготовленого асептично на фізіологічному розчині. У колінний суглоб лівої задньої лапи вводили еквівалентну кількість фізіологічного розчину [5].

Через 4 год після відтворення патології й далі щоденно протягом 5 діб усім тваринам вводили одноразово внутрішньошлунково препарати у відповідних дозах у вигляді суспензій, які попередньо виготовляли у необхідній кількості фізіологічного розчину з стабілізатором ТВІН-80.

За цих умов інтенсивність больової реакції було доцільно визначати через 6 год після відтворення патології для оцінки ефективності одноразових доз Диклокору і далі на 3 та 5 добу – для вивчення ефекту повторних введень дослідного засобу, оскільки саме в ці періоди ступінь патофізіологічних змін мала яскраво виражений характер і відповідала перебігу суглобового синдрому в клінічній практиці.

Вимірювання інтенсивності спонтанної больової реакції проводили станом на 1, 3 та 5 добу дослідження за 30 хв та через 2 год після введення дослідних засобів. Для цього кожну тварину поміщали до фіксуючої камери «тестера інвалідності» – Incapacitance Tester MkV («Linton Instrumentation», Великобританія) та витримували там протягом 5 хв для акліматизації, поки тварина не адаптується та не прийме зручне положення. При цьому задні кінцівки щура мали знаходитися на навантажувальних пластинах приладу, кожна окремо, а передні кінцівки – на похилій передній стінці камери [6–8]. Таким чином, вся маса тварини перерозподілялася через задні кінцівки на вагові датчики «тестера інвалідності». Вимірювання перерозподілу маси тіла тварини проводили тричі з інтервалом у 5 с та фіксували середнє значення маси тіла, що приходить на праву та ліву кінцівку окремо. Далі розраховували індекс інвалідності (ІІ) [9, 10]:

$$II = \frac{M_{пк}}{M_{пк} + M_{лк}}, \quad \text{де}$$

ІІ – індекс інвалідності (у. о.);

Мпк – маса тіла тварини, що розподіляється на праву (ушкоджену) кінцівку;

Млк – маса тіла тварини, що розподіляється на ліву (здорову) кінцівку.

Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних засобів зменшувати інтенсивність спонтанної больової реакції у тварин [9, 10], що проявлялося в збільшенні ІІ порівняно з вихідними даними, та виражали у відсотках:

$$AA = \frac{II_2 - II_1}{II_1} \cdot 100\%,$$

де АА – аналгетична активність, %;

ІІ₁ – значення індексу інвалідності в групі дослідних тварин до введення лікарського засобу;

ІІ₂ – значення індексу інвалідності в групі дослідних тварин після введення лікарського засобу.

Усі дослідження проводили відповідно до директиви Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети. План представлено дослідження було затверджено Комітетом з біоетики Національного фармацевтичного університету.

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і непараметричних методів аналізу (Mann-Whitney U Test) за допомогою комп'ютерних програм STATISTICA 7.0, StatPlus 2009 та MS Excel 2007 і представляли у вигляді порівняльних таблиць з результатами різних груп.

Результати та їх обговорення. Отримані результати наведено в таблиці. Їхній аналіз свідчить, що Диклокор у випадку дослідження впливу на перебіг спонтанної больової реакції в щурів чинить виражену аналгетичну дію, оскільки значно збільшує ІІ протягом усього періоду спостережень. Це зумовлює наступні показники АА: станом на 1 добу досліджень – 45,48 %, на 3 добу – 51,71 % та на 5 добу – 65,11 %. Слід відмітити, що збільшення рівня АА дослідного препарату

**Інтенсивність спонтанної больової реакції в щурів з гострим гонартритом
за впливу Диклокору і диклофенаку натрію, $M \pm m$**

Експериментальна група	Індекс інвалідності, у. о.		Аналгетич- на актив- ність, %
	вихідні дані	2 год після вве- дження препарату	
1 доба			
Диклокор, 12 мг/кг (n = 10)	0,250 ± 0,008	0,363 ± 0,011	45,48 ± 3,88
Диклофенак натрію, 5 мг/кг (n = 10)	0,248 ± 0,006	0,351 ± 0,007	41,97 ± 1,66
3 доба			
Диклокор, 12 мг/кг (n = 10)	0,189 ± 0,005	0,287 ± 0,008	51,71 ± 3,00
Диклофенак натрію, 5 мг/кг (n = 10)	0,186 ± 0,004	0,274 ± 0,007	47,42 ± 1,59
5 доба			
Диклокор, 12 мг/кг (n = 10)	0,291 ± 0,004	0,480 ± 0,003*	65,11 ± 2,69*
Диклофенак натрію, 5 мг/кг (n = 10)	0,294 ± 0,007	0,462 ± 0,008	57,41 ± 2,21

Примітка. *Відмінності вірогідні відносно тварин, що отримували ДН ($p < 0,05$).

пояснюється не тільки потенціюючим впливом його повторних введень, але й підвищенням вихідного рівня ІІ, що вказує на зменшення спонтанних больових відчуттів тварин внаслідок згасання патофізіологічних проявів гострого гонартриту.

Аналогічну картину, але при меншому ступені виразності, спостерігали під впливом ДН. Так, рівень його АА на 1 добу спостереження склав 41,97 %, на 2 добу – 47,42 % і на 5 добу – 57,41 %. Слід відмітити, що за рівнем АА на 5 добу дослідження ДН вірогідно поступався активності Диклокору, хоча доза останнього за ДН дорівнювала лише 4,6 мг/кг і була на 8 % меншою, ніж при застосуванні ДН. Ймовірно, підвищення анальгетичної активності, що спостерігали в групі Диклокору, викли-

кано синергетичною дією кверцетину в складі цього лікарського засобу.

Висновки

Отримані дані свідчать, що Диклокор у дозі 12,0 мг/кг як при одноразовому, так і повторному введенні проявив виражений анальгетичний вплив на перебіг спонтанної больової реакції у тварин на тлі розвитку гострого гонартриту, за ступенем якого вірогідно перевершив активність ДН на 5 добу спостереження.

Це свідчить про те, що незважаючи на меншу на 8 % дозу ДН у складі Диклокору, знеболювальний ефект цього комбінованого препарату виявляється тривалішим, ніж при монотерапії диклофенаком. Отже, Диклокор є перспективним препаратом для подальшого дослідження.

- McGettigan P., Henry D. Cardiovascular Risk with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Systematic Review of Population-Based Controlled Observational Studies. Strom BL, ed. PLoS Medicine. 2011;8(9):e1001098. doi:10.1371/journal.pmed.1001098.
- Drug discovery and evaluation: pharmacological assays / Ed. H.G. Vogel. – 3rd edition. – Berlin : Springer-Verlag, 2008. – 2071 p.
- Techniques for assessing knee joint pain in arthritis / V. Neugebauer, J. S. Han, H. Adwanikar [et al.] // Molecular Pain. – 2007. – V. 3. – P. 8–13. doi: 10.1186/1744-8069-3-8.
- Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / [Я. А. Сигидин, Г. Я. Шварц, А. П. Арзамасцев, С. С. Либерман]. – Москва : Медицина, 1988. – 240 с.
- Anti-inflammatory synergy of MEN16132, a kinin B2-receptor antagonist, and dexamethasone in carrageenan-induced knee joint arthritis in rats / C. Valenti, S. Giuliani, C. Cialdai [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2010. – V. 161. – P. 1616–1627.
- Effect of intra-articular 4-(S)-amino-5-(4-{4-[2,4-dichloro-3-(2,4-dimethyl-8-quinolyloxymethyl)phenylsulfonamido]-tetrahydro-2H-4-pyranylcarbonyl} pipe-razino)-5-oxopentyl[(trimethyl)ammonium chloride hydrochloride (MEN16132), a kinin B2 receptor antagonist, on nociceptive response in monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats / C. Cialdai, S. Giuliani, C. Valenti [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2009. – V. 331 (3). – P. 1025-1032.

7. Kissin E. Y. The effects of intraarticular resiniferatoxin in experimental knee-joint arthritis / Kissin E. Y., Freitas F. C., Kissin I. // *Anesthesia & Analgesia*. – 2005. – V. 101. – P. 1433–1439.
8. Regulation of pain sensitivity in experimental osteoarthritis by the endogenous peripheral opioid system / J. J. Inglis, K. E. McNamee, Sh.-L. Chia [et al.] // *Arthritis & Rheumatism*. – 2008. – V. 58, № 10. – P. 3110–3119.
9. McDougall J. J. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis / McDougall J. J., Watkins L., Li Z. // *Pain*. – 2006. – V. 123 – P. 98–105.
10. Videoradiographic analysis of the range of motion in unilateral experimental knee joint arthritis in rats / M. K. Boettger, J. Leuchtweis, H. G. Schaible¹, M. Schmidt // *Arthritis Research & Therapy*. – 2011. – V. 13 (3) : R79. – 11 p. doi: 10.1186/ar3342.

О. С. Попов, С. К. Шебеко, І. А. Зупанець, А. С. Шаламай

Дослідження впливу препарату «Диклокор» на спонтанну больову реакцію в експерименті

Диклокор – це композиційний нестероїдний протизапальний препарат, що поєднує в своєму складі диклофенак натрію в дозі 25 мг і кверцетин у дозі 40 мг.

Мета дослідження – вивчити анальгетичні властивості препарату «Диклокор» шляхом оцінки його впливу на перебіг спонтанної больової реакції в щурів при одноразовому та повторному введенні на фоні розвитку гострого остеоартриту колінного суглоба; порівняти з аналогічними показниками диклофенаку натрію.

Диклокор та препарат порівняння вводили тваринам внутрішньошлунково 1 раз на 1 добу протягом 5 діб у дозах, що відповідають 50 % ефективній дозі за анальгетичною активністю – 12,0 мг/кг для Диклобору (доза диклофенаку натрію в складі Диклобору дорівнювала 4,6 мг/кг) та 5 мг/кг для диклофенаку натрію. Препарати вводили у вигляді суспензій, які виготовляли на фізіологічному розчині при додаванні необхідної кількості стабілізатора. Вимірювання інтенсивності спонтанної больової реакції проводили станом на 1, 3 та 5 добу дослідження за 30 хв та через 2 год після введення дослідних засобів. Вимірювання проводили за допомогою «тестера інвалідності» – Incapacitance Tester MkV («Linton Instrumentation», Великобританія). Далі розраховували індекс інвалідності та анальгетичну активність для обох препаратів та проводили статистичну обробку отриманих даних.

Диклокор проявив виражену анальгетичну активність на всіх етапах дослідження. Станом на 5 добу експерименту Диклокор за анальгетичною активністю вірогідно перевищував диклофенак натрію, хоча доза останнього була на 8 % більшою за вміст диклофенаку натрію в Диклокорі. Ймовірно, підвищення анальгетичної активності, що спостерігали в групі Диклобору, викликане синергетичною дією кверцетину в складі цього лікарського засобу.

Таким чином, отримані дані свідчать, що Диклокор у дозі 12,0 мг/кг як при одноразовому, так і повторному введенні проявив виражений анальгетичний вплив на перебіг спонтанної больової реакції у тварин на тлі розвитку гострого гонартриту, за ступенем якого вірогідно перевершив активність диклофенаку натрію на 5 добу спостереження. Отже, Диклокор є перспективним препаратом для подальшого дослідження.

Ключові слова: Диклокор, диклофенак натрію, кверцетин, остеоартрит, щури, аналгезія

А. С. Попов, С. К. Шебеко, І. А. Зупанець, А. С. Шаламай

Исследование влияния препарата «Диклокор» на спонтанную болевую реакцию в эксперименте

Диклокор – это композиционный нестероидный противовоспалительный препарат, сочетающий в своем составе диклофенак натрия в дозе 25 мг и кверцетин в дозе 40 мг.

Цель исследования – изучение анальгетических свойств препарата «Диклокор» в капсулах путем оценки его влияния на спонтанную болевую реакцию у крыс при однократном и повторном введении на фоне развития острого остеоартрита коленного сустава; сравнение с аналогичными показателями диклофенака натрия.

Диклокор и препарат сравнения вводили животным внутривентрально 1 раз в 1 сутки в течение 5 суток в дозах, соответствующих 50 % эффективной дозе по анальгетической активности – 12,0 мг/кг для Диклобора (доза диклофенака натрия в составе Диклобора равнялась 4,6 мг/кг) и 5 мг/кг для диклофенака натрия. Препараты вводили в виде суспензий, приготовленных на физиологическом растворе при добавлении необходимого количества стабилизатора ТВИН-80. Измерение интенсивности спонтанной болевой реакции проводили на 1, 3 и 5 сутки исследования за 30 мин до и через 2 ч после введения лекарственных препаратов. Измерения проводили с помощью «тестера инвалидности» – Incapacitance Tester MkV («Linton Instrumentation», Великобритания). Далее рассчитывали индекс инвалидности и анальгетическую активность для обоих препаратов с последующей статистической обработкой полученных данных.

Диклокор проявил выраженную анальгетическую активность на всех этапах исследования. По состоянию на 5 сутки эксперимента Диклокор по анальгетической активности достоверно превы-

шал диклофенак натрия, хотя доза последнего была на 8 % больше по содержанию диклофенака натрия, чем в Диклоре. Вероятно, повышение анальгетической активности, которое наблюдалось в группе Диклора, вызвано синергетическим действием кверцетина в составе этого лекарственного средства.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что Диклор в дозе 12,0 мг/кг как при однократном, так и повторном введении проявил выраженный анальгетический эффект при оценке спонтанной болевой реакции у животных на фоне развития острого гонартрита, по степени которого достоверно превзошел активность диклофенака натрия на 5 сутки наблюдения. Итак, Диклор является перспективным препаратом для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: Диклор, диклофенак натрия, кверцетин, остеоартрит, крысы, анальгезия

O. S. Popov, S. K. Shebeko, I. A. Zupanets, A. S. Shalamay

Experimental study of the effect of Dicloror on spontaneous pain reaction

The aim of this study was to explore analgesic properties of the drug «Dicloror» by evaluating its effect on spontaneous pain reaction in rats after a single and repeated administrations on the background of acute knee osteoarthritis; to compare it with effect of diclofenac sodium. Dicloror is a composite NSAID combining 25 mg of diclofenac sodium and 40 mg of quercetin.

Acute gonarthrosis of the right rear paw of the rats was induced by intraarticular administration of 25 ml of 2 % solution of λ -carrageenin. Then, the examined object and reference drug were administered to animals intragastrically one time daily for 5 days in doses corresponding to 50 % of the effective dose by analgesic activity – 12,0 mg/kg for Dicloror (dose of diclofenac sodium in Dicloror equal to 4,6 mg/kg) and 5 mg/kg for diclofenac sodium. Preparations were administered as suspensions, which were prepared by adding the required amount of physiological saline and stabilizer TVIN-80. Measurements of the intensity of spontaneous pain reaction was performed at 1, 3 and 5 study day 30 min before and 2 hours after drug administration. Measurements were carried out using the «disability tester» – Incapacitance Tester MkV («Linton Instrumentation», UK). Then, calculations of the disability index and analgesic activity of both drugs were done.

Dicloror showed pronounced analgesic activity at all stages of the study. By 5th day of the experiment, Dicloror significantly exceed diclofenac sodium by analgesic activity, although the dose of the latter was 8 % higher. Probably, enhancement of analgesic activity in the group of Dicloror is due to synergic effect of quercetin in the composition of the drug.

The data obtained indicate that Dicloror at a dose of 12,0 mg/kg, both in single and repeated administrations, showed a pronounced analgesic effect on the course of spontaneous pain response in animals with acute knee osteoarthritis. Dicloror significantly surpassed diclofenac sodium by 5th day of the experiment. Thus, Dicloror has advantages over diclofenac sodium as analgesic and is a promising drug for further study.

Key words: Dicloror, diclofenac sodium, osteoarthritis, rats, analgesia

Надійшла: 23 жовтня 2015 р.

Контактна особа: Попов О. С., асистент, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний фармацевтичний університет, буд. 27, вул. Пушкінська, м. Харків, 61057.
Електронна пошта: oleksii.s.popov@gmail.com

Є. П. Делян

Амінокислотний склад надземних органів рослин роду *Sonchus*

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: хроматографія,
амінокислоти, трава рослин роду *Sonchus*

Амінокислоти – речовини первинного синтезу, що містяться в надземних і підземних органах майже всіх квіткових рослин, синтезуються з простих неорганічних сполук і беруть участь у синтезі білків, коферментів, флавоноїдів, стероїдних сполук, поліфенолів, складних вуглеводів, жирів, вітамінів і пігментів [1]. Вони містяться в рослинах у легкозасвоюваних для організму людини комплексах і в біологічно доступних концентраціях, а тому мають вищу фізіологічну активність порівняно з синтетичними аналогами. Саме це зумовлює актуальність роботи щодо відбору найцінніших видів рослин, які містять комплекс амінокислот [2–4].

Нині відомо майже 300 рослинних амінокислот, 20 з них входять до складу структурних білків і ферментів. За даними останніх наукових досліджень у рослинах у вільному або зв'язаному стані знаходиться близько 30 % амінокислот від загальної концентрації органічних речовин [5, 6]. Поширеність амінокислот у рослинах та їхня висока біологічна активність сприяють ефективній дії на організм як лікарської сировини, так і препаратів з неї. Рослинні амінокислоти відіграють важливу роль у функціонуванні різноманітних систем і органів людського організму та характеризуються вираженими фармакотерапевтичними властивостями, а також сприяють швидшому засвоєнню та потенціюють дію інших наявних у рослинах біологічно активних сполук [4–7]. Деякі амінокислоти проявляють антиоксидантні властивості [8]. Саме до таких рослин відносяться представники роду *Sonchus*: *Sonchus oleraceus* L. (Осот городній),

Sonchus arvensis L. (Осот польовий) та *Sonchus asper* L. (Осот жорсткий).

Виходячи з вищезазначеного, актуальним є пошук нових джерел легкозасвоюваних амінокислот серед малодосліджених лікарських рослин України, що мають достатню сировинну базу.

Мета дослідження – вивчити якісний склад та кількісний уміст вільних і зв'язаних у складі білка амінокислот у сировині трави представників роду *Sonchus*.

Матеріали та методи. Сировину трави представників роду Осот було заготовлено в Київській області (Києво-Святошинський район) у 2015 році, у період вегетації рослини. Висушування сировини проводили при температурі 25 °C повітряно-тіньовим методом.

Якісне та кількісне визначення амінокислот виконували за методикою, запропонованою Спекманом, Штейном і Муром на автоматичному аналізаторі амінокислот Т 339 (Чехія), обладнаному реєструючим фотоелементом [9, 10].

Для реєстрації амінокислот у елюатах використовували метод детекції нінгідрином. Нінгідрин, взаємодіючи з аміногрупою амінокислоти, утворює сполуку гідриндантин, що дає забарвлення в області 560 нм або 440 нм для сполук з проліном і оксипроліном [11].

Для визначення суми амінокислот на дні пробірки з вогнетривкого скла розміщували ретельно зважений зразок масою близько 60 мг. У пробірку додавали 0,5 мл дистильованої води і 0,5 мл концентрованої хлористоводневої кислоти. Пробірку охолоджували в суміші сухого льоду з диметилкетонем. Після охолодження з пробірки відкачували повітря за допомогою вакуумного насоса для запобігання окиснення амінокислот у результаті гідролізу. Запахану пробірку залишали на 24 год у термостаті з

постійною температурою + 106 °С. Після закінчення гідролізу пробірку розкривали, попередньо охолоджуючи до кімнатної температури. Уміст кількісно переносили у скляний бюкс, який розміщували у вакуум-ексикаторі над гранульованим гідроксидом натрію. Потім з ексикатора видаляли повітря за допомогою вакуумного насоса. Після висушування зразка у бюкс додавали 3–4 мл деіонізованої води і повторювали процедуру висушування. Підготовлений у такий спосіб зразок розчиняли в 0,3 н літій цитратному буфері рН 2,2 і вводили в іонообмінну колонку аналізатора амінокислот. Використовували колонку, заповнену катіонітом марки Ostion LGANB [9–11].

Амінокислоти ідентифікували методом стандартних добавок. Концентрацію визначали, вимірюючи площу відповідних піків.

Результати та їх обговорення. У результаті вивчення досліджуваних об'єктів було ідентифіковано 17 амінокислот, 9 з яких є незамінними. Результати дослідження амінокислотного складу представників роду *Sonchus* наведено в таблиці.

У процесі порівняльного аналізу з'ясовано, що якісний склад амінокислот трьох досліджуваних об'єктів ідентичний. Також з'ясувалося, що домінуючі амінокислоти в об'єктах також ідентичні. Загальний вміст амінокислот у Осоті городньому становить

Таблиця

Уміст амінокислот у траві представників роду Sonchus

Амінокислота	Уміст амінокислот					
	Осот городній		Осот польовий		Осот жорсткий	
	г/100 г сировини	відсоток від загальної кількості амінокислот	г/100 г сировини	відсоток від загальної кількості амінокислот	г/100 г сировини	відсоток від загальної кількості амінокислот
Пролін	4,775	22,81	1,944	23,98	0,843	14,79
Глутамінова кислота	3,237	15,46	1,113	13,73	1,047	18,37
Лейцин	1,772	8,47	0,633	7,8	0,437	7,66
Аспарагінова кислота	1,636	7,82	0,771	9,51	0,634	11,12
Аланін	1,105	5,28	0,367	4,52	0,302	5,3
Валін	1,086	5,19	0,462	5,7	0,336	5,9
Серин	1,021	4,88	0,402	4,96	0,283	4,97
Аргінін	1,013	4,84	0,382	4,71	0,261	4,58
Лізін	0,831	3,97	0,318	3,93	0,246	4,32
Гліцин	0,807	3,86	0,312	3,85	0,283	4,96
Фенілаланін	0,779	3,72	0,322	3,97	0,244	4,29
Треонін	0,762	3,64	0,314	3,87	0,242	4,25
Ізолейцин	0,687	3,28	0,24	2,96	0,197	3,45
Тирозин	0,497	2,37	0,181	2,23	0,12	2,11
Метіонін	0,49	2,34	0,158	1,95	0,1	1,75
Гістидин	0,305	1,46	0,117	1,45	0,084	1,47
Цистин	0,128	0,61	0,071	0,88	0,041	0,71
Усього	20,931	100	8,107	100	5,7	100

20,931 г/100 г, у Осоті польовому – 8,107 г/100 г, у Осоті жорсткому – 5,7 г/100 г.

Ураховуючи отримані дані, можна розташувати мажоритарні амінокислоти у наступній послідовності по зменшенню їхнього вмісту в досліджуваних зразках: Осот городній – пролін > глутамінова кислота > лейцин > аспарагінова кислота > аланін > валін > серин > аргінін; Осот польовий – пролін > глутамінова кислота > аспарагінова кислота > лейцин > валін > серин > аргінін; Осот жорсткий – глутамінова кислота > пролін > аспарагінова кислота > лейцин > валін > аланін > серин > гліцин. Як бачимо, в усіх досліджуваних об'єктах домінуючі амінокислоти однакові.

Найбільший вміст у Осоті городньому становить пролін та глутамін 4,78 г/100 г та 3,24 г/100 г відповідно, у Осоті польовому – пролін та глутамін 1,94 г/100 г та 1,11 г/100 г відповідно, у Осоті жорсткому – глутамін та пролін 1,05 г/100 г та 0,84 г/100 г відповідно.

Уміст лейцину в Осоті городньому становить 1,77 г/100 г, у Осоті польовому – 0,63 г/100 г, у Осоті жорсткому – 0,44 г/100 г. Порівняно з лейцином у Осоті городньому дещо менший вміст аспарагінової кислоти – 1,64 г/100 г. У інших об'єктах дослідження вміст аспарагінової кислоти становить: у Осоті польовому 0,77 г/100 г, у Осоті жорсткому 0,63 г/100 г.

Уміст аланіну в траві Осоту городнього становить 1,11 г/100 г, валіну – 1,09 г/100 г, серину – 1,02 г/100 г, аргініну – 1,01 г/100 г.

Уміст аланіну в траві Осоту польового становить – 0,37 г/100 г, валіну – 0,46 г/100 г, серину – 0,40 г/100 г, аргініну – 0,38 г/100 г.

Уміст аланіну в траві Осоту жорсткого становить – 0,30 г/100 г, валіну – 0,34 г/100 г, серину – 0,28 г/100 г, аргініну – 0,38 г/100 г.

Таким чином, результати проведених досліджень розширюють існуючі відомості щодо амінокислотного складу і кількісного вмісту амінокислот у траві деяких представників роду *Sonchus* і можуть бути використані при розробці методик аналізу лікарських засобів, отриманих з цих рослин.

Висновки

1. Уперше досліджено якісний склад та кількісний вміст амінокислот у траві представників роду *Sonchus* – *Sonchus oleraceus* L., *Sonchus arvensis* L., *Sonchus asper*.
2. У всіх об'єктах ідентифіковано 17 амінокислот, 9 з яких є незамінними.
3. Встановлено що найбільший вміст амінокислот характерний для трави Осоту городнього – 20,93 г/100 г, менший вміст амінокислот знайдено в траві Осоту польового – 8,11 г/100 г, найменший вміст амінокислот визначено в траві Осоту жорсткого – 5,7 г/100 г.
4. Встановлено, що мажоритарними амінокислотами в траві Осоту городнього та Осоту польового є пролін та глутамінова кислота, у траві Осоту жорсткого – глутамінова кислота та пролін.

1. Ісюк М. В. Дослідження амінокислотного складу герані сибірської / М. В. Ісюк, І. Л. Бензель, Л. В. Бензель // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – Т. 10. – № 3. – С. 4–6.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae) / отв. ред. П. Д. Соколов. – Санкт-Петербург : Наука, 1993. – 351 с.
3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / [Відп. ред. Гродзінський А. М.]. – Київ : Головна ред. УРЕ, 1989. – 544 с.
4. Амінокислотний склад трави *Polygonum hydropiper* L. та *Polygonum persicaria* L. флори України / І. А. Лукіна, О. В. Мазулін, Г. П. Смойловська [та ін.] // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – № 1 (17). – С. 56–59.
5. Гонтова Т. М. Амінокислотний склад густих екстрактів з трави та коренів живокосту шорсткого / Т. М. Гонтова // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 4–5.
6. Луценко Ю. О. Дослідження амінокислотного складу листя плюща звичайного / Ю. О. Луценко, Р. Є. Дармограй, М. Р. Сімонов // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 110–112.

7. Одинцова В. М. Амінокислотний вміст у траві гірчака пташиного, непомітного, різнолистого флори України у вегетаційний період / В. М. Одинцова, О. В. Мазулін, О. М. Денисенко // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2006. – Т. 1, № 15. – С. 119–121.
8. Горчакова Н. О. Антиоксидантні засоби – необхідні компоненти комплексної фармакотерапії / Н. О. Горчакова, С. А. Олійник, К. Г. Гаркава // Фітотерапія в Україні. – № 1. – 2000. – С. 7–13.
9. Амінокислотний склад рослинної сировини оману британського у вегетаційний період / О. К. Єренко, О. В. Мазулін, П. А. Логвін, Г. В. Мазулін // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – Т. 9, № 2. – С. 10–12.
10. Смойловская Г. П. Содержание аминокислот в видах рода *Achillea* L. флоры Украины / Г. П. Смойловская, А. В. Мазулин, Е. В. Гречаная // Запорожский медицинский журнал. – 2008. – Т. 2, № 47. – С. 135–136.
11. Использование нингидриновой реакции для количественного определения β -аминокислот в различных объектах : методические рекомендации / А. В. Симонян, А. А. Саламатов, Ю. С. Покровская, А. А. Аванесян. – Волгоград, 2007. – 106 с.
12. Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. – Вінниця : Нова книга, 2007. – 656 с.
13. Гонський Я. І. Біохімія людини / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
14. Гепатопротекторна дія глутаргіну при свинцевій інтоксикації (експериментальне дослідження) / О. Л. Апихтіна, А. В. Коцюрба, Ю. П. Коркач, О. Г. Лампека // Сучасні проблеми токсикології. – 2009. – № 3–4. – С. 63–67.

Є.П. Делян

Амінокислотний склад надземних органів рослин роду *Sonchus*

Мета дослідження – вивчення амінокислотного складу сировини трави трьох представників роду *Sonchus*: Осоту городнього, Осоту польового та Осоту жорсткого. Визначення амінокислотного складу виконували на автоматичному аналізаторі амінокислот Т 339 (Чехія). Якісне та кількісне визначення проводили за методикою Спекмана, Штейна та Мура. Підготовлений зразок розчиняли в 0,3 н літій цитратному буфері рН 2,2 і вводили в іонообмінну колонку аналізатора амінокислот. Використовували колонку, заповнену катіонітом марки Ostion LGANB. Для реєстрації амінокислот у елюатах використовували метод детекції нінгідринном.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що всі об'єкти дослідження містять 17 амінокислот, 9 з яких є незамінними.

Мажоритарними амінокислотами в траві Осоту городнього є пролін, глутамінова кислота, лейцин, аспарагінова кислота, аланін, валін, серин, аргінін з вмістом відповідно 4,77 г/100 г, 3,24 г/100 г, 1,77 г/100 г, 1,64 г/100 г, 1,11 г/100 г, 1,09 г/100 г, 1,02 г/100 г, 1,01 г/100 г; у траві Осоту польового – пролін, глутамінова кислота, аспарагінова кислота, лейцин, валін, серин, аргінін, аланін з вмістом відповідно 1,94 г/100 г, 1,11 г/100 г, 0,77 г/100 г, 0,63 г/100 г, 0,46 г/100 г, 0,40 г/100 г, 0,38 г/100 г, 0,37 г/100 г; у траві Осоту жорсткого – глутамінова кислота, пролін, аспарагінова кислота, лейцин, валін, аланін, серин, аргінін з вмістом відповідно 1,05 г/100 г, 0,84 г/100 г, 0,63 г/100 г, 0,44 г/100 г, 0,34 г/100 г, 0,30 г/100 г, 0,28 г/100 г, 0,26 г/100 г.

Результати проведених досліджень розширюють існуючі відомості щодо амінокислотного складу і кількісного вмісту амінокислот у траві деяких представників роду *Sonchus* і можуть бути використані при розробці методик аналізу лікарських засобів, отриманих з цих рослин.

Ключові слова: хроматографія, амінокислоти, трава рослин роду *Sonchus*

Е. П. Делян

Аминокислотный состав надземных органов растений рода *Sonchus*

Цель исследования – определение аминокислотного состава сырья травы трех представителей рода *Sonchus*: Осота огородного, Осота полевого и Осота жесткого. Определение аминокислотного состава выполняли на автоматическом анализаторе аминокислот Т 339 (Чехия). Качественное и количественное определение выполняли по методике Спекмана, Штейна и Мура. Подготовленный образец растворяли в 0,3 н литий цитратном буфере рН 2,2 и инжестировали в ионообменную колонку анализатора аминокислот. Использовали колонку, заполненную катионитом марки Ostion LGANB. Для регистрации аминокислот в элюатах использовали метод детекции нингидрином.

В результате проведенных исследований установлено, что все объекты исследования содержат 17 аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми.

Мажоритарными аминокислотами в траве Осота огородного являются пролин, глутаминовая кислота, лейцин, аспарагиновая кислота, аланин, валин, серин, аргинин с содержанием соответственно 4,77 г/100 г, 3,24 г/100 г, 1,77 г/100 г, 1,64 г/100 г, 1,11 г/100 г, 1,09 г/100 г, 1,02 г/100 г, 1,01 г/100 г; в траве Осота полевого – пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лейцин, валин, серин, аргинин, аланин с содержанием соответственно 1,94 г/100 г, 1,11 г/100 г, 0,77 г/100 г, 0,63 г/100 г, 0,46 г/100 г, 0,40 г/100 г, 0,37 г/100 г; в траве Осота жесткого – глутаминовая кислота, пролин, аспарагиновая кислота, лейцин, валин, аланин, серин, аргинин,

с содержанием соответственно 1,05 г/100 г, 0,84 г/100 г, 0,63 г/100 г, 0,44 г/100 г, 0,34 г/100 г, 0,30 г/100 г, 0,28 г/100 г, 0,26 г/100 г.

Результаты проведенных исследований расширяют существующие сведения об аминокислотном составе и количественном содержании аминокислот в траве некоторых представителей рода *Sonchus* и могут быть использованы при разработке методик анализа лекарственных средств, полученных из этих растений.

Ключевые слова: хроматография, аминокислоты, трава растений рода Sonchus

E. P. Delyan

Amino acid composition overground organs of the plants sow tristel genus (*Sonchus*)

The aim of the investigation was to determine amino acid composition in raw grass of three species of the plants genus *Sonchus*: sow thistle garden, field sow thistle and rough sow thistle. Determination of the amino acid composition was performed using the amino acids automatic analyzer T339 (the Czech Republic). Qualitative and quantitative determination were performed according to the method Spekmana, Stein and Moore. The prepared sample was dissolved in 0,3H - lithium citrate buffer pH 2,2 and then was injected into the ion exchange column of the amino acid analyzer which was filled with a cation exchange resin by Ostion LGANB TM. It was used ninhydrin detection of amino acids in eluates.

As the result of the investigation, it has been found that the objects of investigation contain 17 amino acids and 9 of them are essential.

The majority amino acids in the sow-thistle garden grass are the follow ones: proline, glutamic acid, leucine, aspartic acid, alanine, valine, serine, arginine with content respectively 4,77 g/100 g, 3,24 g/100 g, 1,77 g/100 g, 1,64 g/100 g, 1,11 g/100 g, 1,09 g/100 g, 1,02 g/100 g, 1,01 g/100 g; the field sow thistle grass contains the follow majority amino acids: proline, glutamic acid, aspartic acid, leucine, valine, serine, arginine, alanine, in amounts respectively 1,94 g/100 g, 1,11 g/100 g, 0,77 g/100 g, 0,63 g/100 g, 0,46 g/100 g, 0,40 g/100 g, 0,38 g/100 g, 0,37 g/100 g; the rough sow thistle grass has the follow majority amino acids: glutamic acid, proline, aspartic acid, leucine, valine, alanine, serine, arginine, with with content respectively 1,05 g/100 g, 0,84 g/100 g, 0,63 g/100 g, 0,44 g/100 g, 0,34 g/100 g, 0,30 g/100 g, 0,28 g/100 g, 0,26 g/100 g.

The results of the investigation enlarge the existing information about the amino acid composition and the quantitative content in the grass of three species of Sow tristel genus (*Sonchus*) and they can be used to develop methods of analysis of the medicinal remedies, that are derived from these plants.

Key words: chromatography, amino acid, grass of plants of the Sow tristel genus (Sonchus)

Надійшла: 9 грудня 2015 р.

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Лукиянчук В. Д., Сейфуллина И. И., Литвиненко Д. Ф.,
Марцинко О. Е. Фармакологические свойства органических
и координационных соединений германия – современные представления.....3
Чекман И. С. Научно-медицинские основы преподавания нанофармакологии 14

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

- Горбачева С. В., Беленичев И. Ф., Кучеренко Л. И. Механизмы эндогенной
нейропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы
в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения..... 24
Носач С. Г., Беленичев И. Ф., Александрова Е. В., Левич С. В.,
Рыженко В. П. Антиоксидантный механизм нейропротективного действия
производного 3-метилксантина (С-3) в условиях внутримозгового
кровоизлияния 31
Холодняк С. В., Бухтиярова Н. В., Шабельник К. П., Берест Г. Г.,
Беленичев И. Ф., Коваленко С. И. Направленный поиск противосудорожных
агентов среди спиропроизводных с 2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]
хиназолиновым фрагментом 39

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

- Белай И. М., Михайлюк Е. О., Цыс А. В., Шабельник К. П., Коваленко С. И.,
Остапенко А. А. Анальгетическая активность производных 1,2,4-триазола
на этапе первичного фармакологического скрининга 48
Головенко Н. Я., Валиводзь И. П., Жукова Н. А., Ларионов В. Б. Участие
фенобарбитал-индуцированных изоформ CYP450 в О-дезалкоксилировании
¹⁴C-этоксазепам 53
Дронова М. Л. Терапевтическая эффективность
1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси]-3-(N-бензилгексаметилениминий)-
2-пропанол хлорида на моделях *in vivo*..... 60
Добреля Н. В., Карацуба Т. А., Гула Н. С., Дуняк Ю. О., Бойцова Л. В.,
Данова И. В., Тишкин С. М., Хромов А. С. Коррекция нарушений гемостаза
при острой массивной кровопотере липосомальными препаратами..... 66
Иванов Л. В., Ляпунов А. Н., Картель Н. Т., Нардид О. А., Черкашина Я. О.,
Деримедведь Л. В. Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических
вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови
человека и крыс методом спиновых зондов 72
Калько Е. А., Дроговоз С. М., Захарко Н. В., Юдкевич Т. К. Влияние
токсических доз парацетамола на циркадианный ритм прооксидантно-
антиоксидантного гомеостаза..... 81
Мешкова Н. О., Мищенко О. В., Олейник В. Л., Олейник Г. М.,
Шарыкина Н. И. Исследование цитотоксического действия
производных хиназолина 87
Мохорт Н. А., Кутовой Ю. М. Исследование защитных эффектов
фармакологического прекондиционирования производными имидазо[1,2-а]
азепиния на функционирование сердца крыс *in vivo* в условиях региональной
ишемии 91
Попов А. С., Шебеко С. К., Зупанец И. А., Шаламай А. С. Исследование
влияния препарата «Диклокор» на спонтанную болевую реакцию
в эксперименте 97

ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА, ФАРМАКОЭКОНОМИКИ

- Делян Е. П. Аминокислотный состав надземных органов растений
рода *Sonchus* 102

CONTENT

REVIEWS

- Lukjanchuk V. D., Seifullina I. J., Litvinenko D. F., Martsynko O. E.*
The pharmacological properties of organic and coordination compounds
of germanium – modern views 3
- Chekman I. S.* Scientific and medical basis in teaching nanopharmacology 14

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

- Gorbacheva S. V., Belenichev I. F., Kucherenko L. I.* Mechanisms of endogenous
neuroprotection when using thiol-disulfide system modulators under experimental
impairment of cerebral circulation 24
- Nosach S. G., Belenichev I. F., Aleksandrova K. V., Levich S. V.,
Ryzhenko V. P.* Antioxidant mechanism of neuroprotective action of 3-methylxanthine
derivative (compound C-3) in conditions of intracerebral hemorrhage..... 31
- Holodniak S. V., Buchtiyarova N. V., Shabel'nik K. P., Berest G. G.,
Belenichev I. F., Kovalenko S. I.* Targeted search of anticonvulsant agents among
a spiro-derivatives with 2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline
fragment 39

WORKING OUT OF THE NEW METHODOICAL WAYS

- Bilay I. M., Mihayluk E. O., Tsys O. V., Shabel'nik K. P., Kovalenko S. I.,
Ostapenko A. O.* Analgesic activity of 1,2,4-triazole derivatives in primary
pharmacological screening..... 48
- Golovenko N. Ya., Valivodz I. P., Zhukova N. O., Larionov V. B.* Participation
of phenobarbital-induced CYP450 isoforms in desalcoxylation of ¹⁴C-ethoxazepam 53
- Dronova M. L.* The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl)
phenoxy]-3-(n-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride under
in vivo models..... 60
- Dobrel'ya N. V., Karazuba T. A., Gula N. S., Dunyak Y. O., Boytsova L. V.,
Danova I. V., Tishkin S. M., Khromov O. S.* The correction of hemostatic
disorders with liposomal drugs in acute massive blood loss..... 66
- Ivanov L. V., Lyapunov A. N., Kartel N. T., Nardid O. A., Cherkashina Ya. O.,
Derimedvid L. V.* Comparative study of the influence of some pharmaceutical
excipients on membrane microviscosity of human and rat blood erythrocytes
by spin probe method 72
- Kalko K. O., Drogovoz S. M., Zakharko N. V., Yudkevich T. K.* The influence
of paracetaminofen toxic dose on circadian rhythm of prooxidant-antioxidant
homeostasis..... 81
- Meshkova N. O., Mishchenko O. V., Oliynyk V. L., Oliynyk G. M.,
Sharykina N. I.* The investigation of cytostatic action of quinazoline derivatives 87
- Mokhort M. A., Kutovyii I. M.* Protective effects of pharmacological
preconditioning by imidazo[1,2-a]azepinium derivatives on rat heart function
in vivo upon regional ischemia..... 91
- Popov O. S., Shebeko S. K., Zupanets I. A., Shalamay A. S.* Experimental
study of the effect of Dicloror on spontaneous pain reaction..... 97

ISSUES OF PHARMACY, PHARMACEUTICAL MARKET, PHARMACOECONOMICS

- Delyan E. P.* Amino acid composition overground organs of the plants sow
tristel genus (*Sonchus*) 102