
СПІВЗАСНОВНИКИ

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

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 3(49)/2016

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Хромов А. С. Общая фармакологическая безопасность и сердечно-сосудистая система.....3

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А., Северіна Г. І. Скринінгове дослідження нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на протисудомну активність 16

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Альчук О. І. Вплив 4-[4-оксо-4н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти на функціональний стан печінки щурів за умов щоденного фізичного навантаження ... 28

Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г. Дослідження шлункової секреції в щурів з ад'ювантним артритом на тлі застосування ібупрофену та його комбінації з вінбороном 34

Іванків Я. І., Олещук О. М. Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу 41

Калько К. О., Дроговоз С. М., Кононенко А. В., Захарко Н. В., Горбач Т. В., Міщенко О. Я., Бездітко Н. В. Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну в щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту 48

Карбовський В. Л., Шевчук І. А., Куркіна О. В., Маковська Т. Є. Дослідження впливу препарату «Хондросат» на перебіг експериментального ад'ювантного артриту в щурів 54

Лукіна І. А., Мазулін О. В., Абрамов А. В., Бухтіярова Н. В. Експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. 60

Марчишин С. М., Савич А. О., Андріїшин О. П. Вплив збору антидіабетичного на гістологічний стан печінки щурів за умов моделювання цукрового діабету II типу.... 66

<i>Паршиков А. В., Петрова Г. В.</i> Цитотоксические эффекты синтетических производных α -токоферола и митомицина С на клетки Сасо 2.....	73
<i>Сініцина О. С., Зайченко Г. В., Риженко І. М., Лар'яновська Ю. Б.</i> Корекція станів, асоційованих з дефіцитом естрогенів, за допомогою комбінованого вагінального гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою	80

події

Розробка інноваційних лікарських засобів у ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Участь ДУ «ІФТ НАМНУ» у 6-й Міжнародній виставці «PHARMATechExpo»: семінар «Цілеспрямовані технологічні, фармакотоксикологічні та фармацевтичні дослідження як основа сучасної платформи розробки інноваційних лікарських засобів»	89
<i>Коваленко В. М.</i> Терапевтичний потенціал та механізми дії фосфоліпідних ліпосом	91
<i>Хавич О. А.</i> Расширение показаний для применения липосомальных средств при опухолевом росте.....	99
<i>Голембівська О. І.</i> Забезпечення контролю якості та стандартизації ліпосомальних засобів	102

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

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

А. С. Хромов

Общая фармакологическая безопасность и сердечно-сосудистая система

Государственное учреждение «Институт фармакологии и токсикологии Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев

Ключевые слова: общая фармакологическая безопасность, лекарственное средство, сердечно-сосудистая система

Общая фармакологическая безопасность (ОФБ) или Safety Pharmacology – это молодая, быстро развивающаяся дисциплина. Используя методы фармакологии в нормативных управляемых процессах, она позволяет получать данные для оценки профиля безопасности потенциального лекарственного средства (ЛС). Целью ОФБ является выявление на стадии доклинического изучения возможных побочных эффектов ЛС. При этом прогнозирование таких эффектов строится на основании результатов оценки соотношения фармакодинамических и фармакокинетических характеристик исследуемого вещества.

В отличие от классической фармакологии, исследования общей фармакологической безопасности позволяют предсказать риск развития серьезных (тяжелых) побочных реакций, включая смертельный исход. Дизайн самого исследования определяется соответствующими нормативными требованиями для проведения таких исследований, что придает ОФБ уникальный характер.

Ключевыми задачами для ОФБ являются обнаружение возможного неблагоприятного эффекта ЛС, определение границ безопасности и, наконец, обоснование безопасности клинических испытаний. Иными словами, ОФБ – это дисциплина, которая стремится предсказать, будет ли безопасным препарат (в самом широком смысле этого слова) при введении его животному или человеку.

Цель исследования – ознакомить с историей возникновения и современны-

ми требованиями к организации исследований, выбору моделей, обработке полученных данных при доклинической оценке общей фармакологической безопасности лекарственных средств для сердечно-сосудистой системы.

До 1990 года фармацевтические компании проводили токсикологические исследования в рамках доклинической разработки лекарственных средств. Вместе с тем, становилось все более очевидным, что редкие побочные эффекты (от незначительных до потенциально смертельных) лекарственного препарата могут выявляться даже во время III и IV фазы клинических испытаний. Для выявления и подтверждения существования редких неблагоприятных эффектов ЛС после утверждения его использования человеком требуется тщательный и длительный контроль со стороны регулирующих органов. Когда неблагоприятное воздействие является очень редким, могут потребоваться миллионы введений ЛС, прежде чем такой эффект будет установлен. В литературе есть множество таких примеров, из которых одним из наиболее показательных является случай, связанный с терфенадином.

О том, что задержка реполяризации желудочков может быть причиной развития синдрома трепетания-мерцания желудочков/torsades de pointes (ТМЖ) было известно давно. Однако до 1996 года «кардиотоксическое» действие терфенадина не связывали с этим явлением [1]. Широкое внимание, в том числе и производителей, к сути этой проблемы привлек М. Rosen, опубликовав анализ представленных в литературе данных [2]. До этого времени существовало мнение, что такой активностью могут обладать только соединения, предназначенные для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Влияние терфенадина на продолжительность интервала QT является незначительным, а сам эффект может проявляться в отдаленные сроки лечения, что и обусловило трудность его обнаружения даже при тщательном клиническом наблюдении [3]. Возможно эта проблема и не возникла, если бы вместо обычного токсикологического исследования проводилась конкретная оценка вероятности возникновения ТМЖ при использовании новых лекарств, но в начале 1990-х годов вопрос о биомаркерах для прогнозирования этого редкого неблагоприятного эффекта ЛС не был актуальным.

Этот и подобные ему случаи послужили толчком к возникновению и развитию того направления в фармакологии, которое сейчас называется общей фармакологической безопасностью. Предсказать риск возникновения вызванного терфенадином ТМЖ обычными методами доклинических испытаний было невозможно, поскольку стандартные доклинические токсикологические исследования проводятся с использованием высоких и очень высоких доз. Характер нежелательных эффектов вещества, в лучшем случае, можно выявить при его введении в максимальной курсовой дозе, что не позволяет предвидеть (спрогнозировать) возможность возникновения редкого смертельного побочного эффекта при использовании ЛС в терапевтических дозах [4].

Эти обстоятельства предопределили в начале нашего века превращение ОФБ в самостоятельную дисциплину, призванную преодолеть разрыв между доклинической токсикологией, доклинической и клинической разработкой ЛС.

В идеале исследование ОФБ должно позволить:

- определить ту фармакологическую активность потенциального ЛС, которая может увеличить риск развития побочных реакций у пациентов;
- охарактеризовать степень безопасности такой фармакологической активности;
- оценить относительную эффективность потенциального ЛС;
- изучить механизм действия.

Основной задачей, которую должны решать исследования ОФБ, является выявление неблагоприятных эффектов потенциального ЛС на доклинической стадии разработки для предотвращения смертельных осложнений. Чем раньше будет принято решение о потенциальной смертельной опасности препарата, тем раньше компания сможет изменить свою стратегию поиска новых ЛС. Безусловно, о реальной безопасности ЛС для человека можно будет судить только после проведения мета-анализа клинических испытаний. Понятно, что компании с ограниченными ресурсами могут работать по принципу «только то, что требуется». Напротив, крупные фармацевтические компании могут и будут вкладывать больше средств в проведение комплексного (всеобъемлющего) изучения вещества, обеспечивающего возможность наиболее достоверного предсказания реакций человека на ЛС. По сути, богатые компании могут быть менее безжалостными в отношении прекращения разработки потенциального ЛС, пытаясь путем расширения исследований извлечь пользу из обнаруженных недостатков. Тщательно изученный профиль безопасности обеспечит снижение вероятности неуместного прекращения разработки того вещества, которое со временем может стать терапевтически полезным лекарством [5].

Можно ожидать, что результаты изучения ОФБ, достаточные для принятия обоснованного решения, будут получаться еще на стадии доклинических испытаний потенциального ЛС. Результаты большинства исследований по оценке фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы не публикуются в научной литературе, хотя некоторые сообщения становятся доступными после утверждения нового препарата.

Отсутствие в настоящее время безупречных количественных прогностических критериев привело к появлению серии производственных и законодательных инициатив (табл. 1). Наиболее важными из них являются руководства, принятые на Международной конференции по гармонизации (ICH). В

работе ICH принимали и продолжают принимать участие представители регуляторных органов США, Европы и Японии, а также эксперты в области фармацевтической промышленности. Такая совместная работа привела к появлению 2 руководств (S7A и S7B), определяющих минимальный объем исследований [6, 7]. Важным примером использования результатов доклинических исследований для прогнозирования эффектов в более поздних клинических исследованиях является их применение для предсказания результатов исследования с тщательной оценкой интервала QT, которое требуется для большинства новых лекарственных препаратов в соответствии с требованиями руководства ICH E14 [8].

Появление этих руководств перевело исследования общей фармакологической безопасности потенциальных ЛС из чисто научной проблемы в область нормативного регулирования с целью всесторонней оценки безопасности потенциального ЛС на основе фармакодинамических конечных точек, в отличие от гистопатологических конечных точек, используемых в традиционных исследованиях для оценки токсичности.

Следует отметить, что тестирование вещества-кандидата в отношении действия на сердечно-сосудистую систему не является новой задачей. Влияние нового агента на артериальное давление и частоту сердечных сокращений регулярно оценивалось в течение мно-

гих десятилетий, задолго до появления руководств ICH. Первая реальная попытка создания сбалансированной системы тестирования была реализована в Японии [9]. Положения этого руководства делали необходимым изучение не только влияния потенциального ЛС на сердечно-сосудистую систему, но и его эффектов, связанных с воздействием на вегетативную нервную систему и гладкие мышцы.

Ключевой частью процесса разработки лекарств является получение убедительных для регуляторного органа данных в отношении безопасности и эффективности препарата. В руководстве ICH S7A определены следующие этапы исследований: 1) основной набор тестов («core battery»); 2) дальнейшие исследования; 3) дополнительные исследования. Второй и третий этапы предназначены для расширенного изучения влияния потенциального ЛС на функциональные системы организма в случае необходимости охарактеризовать конкретные неблагоприятные эффекты, обнаруженные в ходе первоначальных исследований.

Основной набор тестов предполагает оценку влияния потенциального ЛС на *центральную нервную систему* (моторная активность, поведенческие реакции, координация, сенсорные/моторные рефлексы (модифицированный Ирвин-тест), *сердечно-сосудистую систему* (артериальное давление, частота сердечных сокращений, электрокардиограмма) и *систему дыхания* (частота дыхательных

Таблица 1

Важнейшие нормативные документы

№	Наименование
1	Japanese Guidelines for Nonclinical Studies of Drugs Manual 1995. Yakuji Nippo Limited, Tokyo, Japan, 1995
2	Committee for Proprietary Medicinal Product. Points to Consider. The Assessment of QT Interval Prolongation by Noncardiovascular Medicinal Products. CPMP/986/96, 1997
3	ICH S7A Guideline Step 5. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals
4	ICH S7B Guideline Step 2 Revision. The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals
5	ICH E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs

движений и дыхательный объем/минутная вентиляция легких).

Сходство способов проведения исследований (моделирование патологических процессов на животных) рождает проблему, характерную и для общей фармакологии, и для ОФБ, – насколько эти модели позволяют точно и достоверно охарактеризовать действие нового ЛС. Речь идет о выявлении и использовании клинически значимых параметров. Как правило, в этом качестве выступают биомаркеры (суррогатные конечные точки). Например, ингибирование киназ в качестве биомаркера для противоопухолевых препаратов [10] или блокада hERG K^+ -каналов для прогноза развития синдрома трепетания-мерцания желудочков [11, 12].

Как отмечает R. D. Sarazan с соавт. (2011 г.), в настоящее время отсутствуют детальные стандарты для этих конечных показателей фармакологической безопасности в неклинических исследованиях. Неопределенная вероятность обнаружения эффекта заданной величины не позволяет оценить способность даже хорошо спланированных доклинических исследований, проведенных на здоровых животных или животных с моделями патологии, надежно предсказать результат. Кроме того, для каждого такого исследования существуют внешние ограничения и ограничения экспериментального дизайна, которые делают маловероятной возможность их полноценного осуществления в соответствии с требованиями директивных руководств [13].

Новые руководства по общей фармакологической безопасности, несомненно, являются важными, однако их следует учитывать лишь в контексте общего подхода к изучению профиля безопасности ЛС [14]. Было бы ошибочным считать их основополагающим документом, выполняя лишь указанные основные исследования и надеясь на то, что адекватный профиль будет изучен кем-то в будущем. Такие руководства, как ICH S7A, S7B и E14 носят очень общий характер и не могут точно указывать, какие исследования являются целесообразными при разработке того или иного соединения. Движущей

силой при выборе исследований должны являться научные фармакологические знания, а всю ответственность за этот выбор должен нести спонсор таких исследований.

Побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы продолжают оставаться существенной причиной отказа от соединений как в период их разработки, так и уже после поступления готовых лекарственных средств на фармацевтический рынок [15]. Однако в клинических исследованиях в рамках I фазы испытаний серьезные сердечно-сосудистые побочные явления возникают относительно редко. Иными словами, исследования по изучению ОФБ в отношении CCC, хотя и могут позволить обнаружить эффекты, способные привести к неблагоприятным осложнениям в клинических исследованиях I фазы, но не позволяют предсказать или полностью оценить потенциальные эффекты в более широкой популяции пациентов [16]. Понятно, что вопрос об отказе от препарата может возникнуть на всех стадиях разработки ЛС. Выявление ранее неизученных терапевтических мишеней для известного ЛС иногда сопровождается повышенным риском для CCC [17]. Поэтому оценка безопасности потенциального ЛС для сердечно-сосудистой системы является чрезвычайно актуальной.

Для решения этой проблемы требуется хорошо разработанная, устойчивая методическая система с известной чувствительностью. Интерпретация результатов таких исследований в значительной степени зависит от используемых экспериментальных моделей. Вместе с тем, исследования для оценки фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы являются исследованиями, позволяющими с высокой точностью переносить данные с животных на человека при условии использования одинаковых конечных параметров и при измерении у животных и человека нескольких показателей деятельности сердечно-сосудистой системы, а не только интервала QT. В случае небольшого количества тестируемого вещества важная информация может быть получена в условиях *in vitro*, например, на специа-

лизированной культуре для выявления задержки реполяризации желудочков или с использованием изолированных органов (табл. 2) [14].

Моделирование на животных является важным аспектом исследований сердца, в которых могут быть изучены различные процессы и определены терапевтические цели. Несмотря на сохранение в процессе эволюции сходства параметров сердечно-сосудистой системы человека и животных, существуют различия, зависящие от конкретного вида животного. Эти различия могут быть менее или более выраженными, иными словами, не существует идеальной модели для исследования сердечно-сосудистой системы.

Одной из основных проблем в решении вопроса о выборе вида животного

является то, что сердечно-сосудистая система каждого вида развивалась по-разному для того, чтобы удовлетворить потребности этого вида [18]. Сердце маленького животного, такого как мышь, может легко сокращаться до 800 раз в 1 мин [19], а у слона частота сердечных сокращений только 35 ударов в 1 мин [20]. В таблице 3 показана обратная зависимость между массой тела и частотой сердечных сокращений, в то время как давление крови остается относительно постоянным для различных лабораторных животных и людей [21].

На самом деле, отношения между массой тела (МТ) и некоторыми параметрами сердечно-сосудистой системы можно описать с помощью аллометрических уравнений, таких как масса

Таблица 2

*Методы оценки задержки реполяризации желудочков
(исследования потенциал-зависимых K⁺-каналов ex vivo)*

Наименование	Метод
Оценка пропускной способности канала	– Конкурентное связывание – Введение рубидия – Потенциал-зависимое флуоресцентное окрашивание – Автоматизированная patch-clamp система
«Золотой стандарт»	Мануальные patch-clamp исследования с использованием: – ооцитов – гетерологичных клеток – изолированных миоцитов
Определение потенциала действия (аналитические системы)	– Изолированные миоциты – Волокна Пуркинье – Папиллярные мышцы – Изолированное сердце (препарат Лангендорфа для определения монофазного потенциала действия)

Таблица 3

Сравнительная характеристика параметров сердечно-сосудистой системы животных и человека

Вид	Масса тела, кг	Частота сердечных сокращений, уд · мин ⁻¹	Систолическое давление, мм рт. ст.	Диастолическое давление, мм рт. ст.
Мыши	0,020–0,063	310–840	113–160	81–110
Крысы	0,225–0,520	250–493	84–184	58–145
Кролики	1–6	130–300	90–130	60–90
Собаки	7–16	70–160	95–136	43–66
Овцы	20–160	60–120	91–116	102
Свиньи	200–300	50–116	135–150	–
Человек	50–86	72	120	80

сердца (τ) = $6,0 \cdot \text{MT}^{0,98}$ или P-R интервал (мс) = $53 \cdot \text{MT}^{0,24}$, где MT масса тела в килограммах [22, 23].

В условиях *in vivo* и *ex vivo* модели на крупных животных больше похожи на человека, чем на мелких. Вместе с тем, давление, создаваемое в полости левого желудочка, остается относительно постоянным среди видов. Эти различия кинетики давления и силы сокращения представлены на рисунке.

Использование животных любого вида имеет свои собственные преимущества и недостатки. Поэтому исследования по оценке ОФБ для сердечно-сосудистой системы не должны ограничиваться моделированием патологического процесса на одном виде животных для решения всех вопросов. Выбор модели должен зависеть от различных факторов. Важно, но и не ограничивается этим: 1) Какой процесс исследуют и 2) На каком этапе проводится исследование (предварительное или доклиническое).

Само моделирование как на мелких, так и на крупных животных имеет специ-

фические сильные и слабые стороны. Кроме того, использование человеческих тканей, если таковые имеются, может помочь с точностью прогноза для последующего клинического применения.

На ранних этапах разработки ЛС приемлемые данные могут быть получены и с применением мелких лабораторных животных, таких как крысы или морские свинки. Следует сразу оговориться, что наблюдаемая тенденция отказа от крыс при решении вопроса о наличии у вещества эффектов, зависящих от реполяризации миокарда, вовсе не исключает использование этих животных для других целей. В пользу использования крыс следует привести следующие аргументы:

- данные о фармакокинетике ЛС и его влиянии на процессы метаболизма, как правило, получают при использовании крыс;
- использование крыс в токсикологических исследованиях позволяет прицельно (по результатам этих исследований) оценить влияние терапевтических/нетоксических доз ЛС на параметры сердечно-сосудистой системы;
- исследования с использованием не грызунов, а других животных (обычно собак) требуют значительно большего количества тестируемого соединения.

Моделирование патологических процессов у крыс по-прежнему обеспечивает получение полезной информации о влиянии ЛС на системную гемодинамику [24].

Альтернативой крысам являются морские свинки с имплантированным датчиком для регистрации ЭКГ и некоторых параметров центральной гемодинамики [25]. Была показана адекватность использования как бодрствующих, так и наркотизированных животных [26, 27].

Таким образом, с целью оптимизации отбора и подробного фармакологического изучения потенциального ЛС исследования на крысах имеют неопределимое значение с единственным ограничением использования крыс для оценки воздействия ЛС на реполяризацию желудочков за счет блокады hERG-опосредованного тока калия [14].

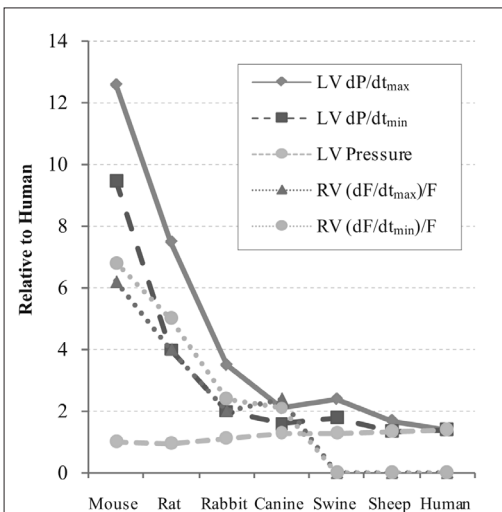


Рисунок. Кинетика сокращения и релаксации сердца в условиях *in vivo* и *ex vivo* (no N. Milani-Nejad, P. M. L. Janssen, 2013) [21]

Примечание. Нет данных *ex vivo* для правого желудочка свиней и овец; LV dP/dt_{max}: максимальная скорость увеличения давления в левом желудочке; LV dP/dt_{min}: максимальная скорость снижения давления в левом желудочке; RV (dF/dt_{max})/F: соотношение максимальной скорости сокращения и силы, развиваемой трабекулами правого желудочка; RV (dF/dt_{min})/F: соотношение максимальной скорости расслабления и силы, развиваемой трабекулами правого желудочка.

Основными параметрами, необходимыми для оценки безопасности потенциальных ЛС в отношении сердечно-сосудистой системы, являются частота сердечных сокращений, артериальное давление и электрокардиографические параметры. В соответствии с руководством ICH S7A наиболее приемлемым считается использование бодрствующих животных, находящихся в физиологических условиях, что позволяет осуществлять продолжительное наблюдение за изменениями ЭКГ и артериального давления. С этой целью используются телеметрические системы наблюдения. Некоторые из них даже позволяют определить давление и скорость его изменения (dP/dt) в полости левого желудочка сердца.

Основной причиной потери ключевой роли экспериментов на наркотизированных животных стало признание влияния средств для наркоза (особенно фенobarбитала) на реполяризацию желудочков [28, 29]. Тем не менее, Tashibu и соавт. (2005 г.) продемонстрировали полезность и высокую чувствительность модели с наркотизированными животными для оценки влияния ЛС на продолжительность интервала QT [30].

Вместе с тем у исследований с применением наркотизированных животных есть свои преимущества. Адекватное анестезиологическое обеспечение (контролируемое поддержание глубины наркоза на хирургическом уровне) обеспечивает стабильность гемодинамики с очень низкой вариабельностью параметров и позволяет с высокой чувствительностью выявить эффекты тестируемых веществ [31]. Инвазивные методы дают возможность углубленного изучения влияния препарата на деятельность сердца и сосудистой системы (например, путем измерения давления в легочной артерии, объемной скорости кровотока в различных сосудах и т. д.). Пероральный путь введения препарата, недоступный у наркотизированных животных, в случае невозможности/нежелательности внутривенного введения имеет разумную альтернативу в виде внутрижелудочного введения.

В исследованиях такого рода возможно определение давления в малом круге кровообращения, конечнодиастолического и конечносистолического давления в полости левого желудочка, сократительной способности сердца, частоты сердечных сокращений, сердечного выброса и объемного кровотока в различных регионах перфузии. Тестируемые соединения могут быть классифицированы с точки зрения фармакологических эффектов на основании их положительного/отрицательного инотропного и хронотропного, аритмогенного, гипо- или гипертензивного действия [14].

Еще одной положительной стороной проведения исследований на наркотизированных животных является возможность непосредственного сопоставления содержания препарата в крови и выраженностью его фармакологического действия [32]. До недавнего времени этот подход был наиболее распространенным при изучении действия ЛС на сердечно-сосудистую систему и упоминается в руководствах по общей фармакологии как стандартный тест [33].

Иными словами, существует значительный положительный опыт проведения исследований такого типа, и накоплено большое количество ценных данных. Поэтому эксперименты на бодрствующих животных с применением телеметрических систем не могут в полной мере заменить эксперименты на наркотизированных животных, которые позволяют провести более глубокое и всестороннее изучение влияния ЛС на деятельность всего организма и сердечно-сосудистой системы в частности.

Говоря о безопасности в отношении ССС потенциального лекарственного средства, нельзя не сказать и о критериях ее оценки. В 2010 году R. Wallis сообщил в краткой форме критерии, с помощью которых можно описать положительный эффект в неклинических и клинических исследованиях и общую чувствительность оценки в условиях *in vivo*, что может увеличить точность прогноза [34]. Недавно также была четко описана чувствительность специфической сердечно-сосудистой модели

[35]. Нижний предел статистической мощности для этих исследований, описанный L. Hanson и др. (2006 г.) [36], был подтвержден и другими исследователями [37–39].

Исследования оценки фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы позволяют с высокой точностью переносить данные с животных на человека при условии использования одинаковых конечных параметров и при измерении у животных и человека далеко не только интервала QT. Поскольку в большинстве опубликованных исследований чувствительность любого исследования остается неопределенной, будет существовать элемент сомнения в отношении вопроса о переносе данных на человека и их прогностической ценности.

На этом фоне Общество фармакологической безопасности (Safety Pharmacology Society) объединило группу из более 50 экспертов, чтобы обсудить наилучшую практику оценки фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы при проведении отдельных исследований и исследований в рамках оценки токсичности.

Ключевым вопросом, рассмотренным этой первой рабочей группой, был вопрос: «Что необходимо сделать, чтобы обратить внимание на эти этапы оценки фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы?» В 2012 году были опубликованы рекомендации этой группы [16].

Конкретные рекомендации рабочей группы по наилучшей практике включали следующее:

- а) экспериментальный протокол необходимо обосновать путем использования контрольных веществ в этой конкретной лаборатории, и включить опубликованные описания влияния этих соединений в сходных исследованиях, проведенных в других лабораториях (если такие описания существуют);
- б) периодически (возможно, ежегодно) и при каждом значительном изменении протокола необходимо подтвердить адекватность протокола путем повторной оценки соответствующих контрольных веществ;

в) необходимо провести оценку статистической мощности исследования, чтобы определить, можно ли определить величину эффектов с такой достоверностью, которая бы позволила надежно и убедительно проверить гипотезу;

г) включение в сообщение об исследовании информации о гипотезе, которая проверяется, описание дизайна эксперимента и его способность проверить гипотезу с точки зрения чувствительности, плане предварительной обработки и анализа данных, оценке согласованности проведенного исследования с поставленной целью в отношении чувствительности позволит провести корректное сравнение разных исследований.

В литературе есть несколько сообщений, которые подтверждают целесообразность этих предложений. Н. Sasaki с соавт. (2005 г.) описали межлабораторную вариабельность параметров ЭКГ и гемодинамики, измеренных у ненаркотизированных собак и приматов в разных лабораториях Японии [40]. Эти исследователи идентифицировали несколько факторов, которые повлияли на расхождение данных в исследовании или оказывали существенное влияние на исходные параметры, включая такие различия, как поставщики животных.

Относительно небольшие изменения дизайна исследования и внешних условий могут оказаться более значимыми, чем ожидалось, и может потребоваться более частое проведение оценки вариаций, статистической мощности и эффекта контрольных веществ, чем это делается в обычной практике [41]. В совокупности такие данные позволяют охарактеризовать тестовую систему, а вместе с накопленной базой данных для контроля и препарата сравнения (включая данные о запатентованном исследуемом соединении при их наличии) формируют основу для последующего изучения исследуемого соединения.

Некоторые примеры способов достижения повышения чувствительности исследования приведены в таблице 4.

Еще одно обстоятельство обуславливает значимость доклинической оценки общей фармакологической безопасности

*Повышение чувствительности и точности оценки данных
(по D. J. Leishman et al., 2012 г. [16])*

Что вы можете сделать, если ваша модель адекватно не работает? Советы для улучшения работы:

Акклиматизация животных и использование адекватной технологии

- Проанализировать, является ли адекватным исследование на животных, ограниченных в движении или наркотизированных, или лучше использовать внешнюю телеметрию.
- Обеспечить достаточное привыкание экспериментальных животных к методике.
- Проанализировать, является ли полностью имплантируемая телеметрия наилучшим методом для соответствия целям исследования.

Окружающая среда

- Минимизировать вмешательства, которые тревожат животных.
- Рассмотреть возможность парного содержания животных.
- Обеспечить наличие звуконепроницаемых дверей или двойных дверей, чтобы погасить внешний шум.
- Рассмотреть возможность создания фоновой звуковой (радио или белый шум, то есть шум с равномерно распределенным спектром) в помещениях, в которых содержатся животные, чтобы действия сотрудников вивария не мешали измерению параметров сердечно-сосудистой системы.
- Старайтесь экономно использовать время в каждом исследовании, чтобы минимизировать вмешательство.

Стратегии анализа данных

- Определите, сколько нужно собрать данных.
- Определите, сколько необходимо данных для анализа.
- Выберите адекватные методы статистического анализа.
- В основном, чем больше данных объединяются в блоки с более продолжительным периодом, тем выше чувствительность, если это позволяет продолжительность лечения и действий.
- Тщательно проанализируйте метод, используемый для коррекции интервала QT по изменению частоты сердечных сокращений. Желательно проводить индивидуальную коррекцию [39].

Использование моделей для оценки фармакокинетики/фармакодинамики

- По возможности проводите моделирование, чтобы связать эффект с системной нагрузкой при использовании прямых или косвенных моделей и чтобы, возможно, больше узнать о механизме и перенесении данных (например, взятие проб плазмы крови в разные дни у одних и тех же животных).
- Знать признаки гистерезиса.
- Понимать возможную степень сигнала, понимая максимальный эффект (Emax), который можно определить.
- Как и при всех других вмешательствах, убедиться в том, что взятие проб плазмы крови не создает значительных помех сбору данных о сердечно-сосудистой системе или не влияет на общие цели исследования.

Виды или породы животных

- Используйте виды животных, для которых фармакология и доступные методы лучше всего позволяют проверить основную гипотезу.
- Необходимо обеспечить научное обоснование выбора вида животных на основе проверяемой гипотезы.

потенциальных лекарственных средств в отношении сердечно-сосудистой системы. В 2012 году Конгресс США сформулировал понятие «breakthrough therapy» («революционная терапия»), чтобы сконцентрировать больше ресурсов FDA на исследовании лекарств, для которых уже имеются клинические доказательства существенного улучшения (по одному и более клинически значимому параметру) по сравнению с существующими способами лечения [42]. Новые препараты могут получить одобрение от FDA на основании результатов испытаний, устанавливающих их безопасность в процессе адекватных и хорошо контролируемых исследований, демонстрирующих «веские доказательства» эффективности [43].

Невозможно составить полное предписание в отношении того, как нужно проводить все исследования по изучению фармакологической безопасности для сердечно-сосудистой системы. Однако наилучшее качество и строгость данных могут быть достигнуты, когда цели каждого исследования по изучению фармакологической безопасности

для сердечно-сосудистой системы четко определены перед проведением исследования с тем, чтобы можно было ретроспективно оценить, насколько хорошо в исследовании поддерживается эта цель. При такой оценке следует учитывать наилучшую практику, поэтому следует активно поддерживать включение этой информации или этого контекста в отчеты. Только с включением такого контекста исследования потребитель (например, клиницисты, представители контролирующих органов и спонсоры) сможет оценить ценность исследования и использовать полученные данные для своих целей.

Таким образом, общую фармакологическую безопасность можно рассматривать как актуальное и весьма перспективное направление фармакологии, которое необходимо развивать в Украине с целью минимизации риска развития потенциально опасных побочных эффектов и оптимизации доклинических испытаний новых лекарственных средств.

1. Roy M-L. HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine / M-L. Roy, R. Dumanine, A. M. Brown // *Circulation*. – 1996. – V. 94. – P. 817–823.
2. Rosen M. R. Of oocytes and runny noses / M. R. Rosen // *Circulation*. – 1996. – V. 94. – P. 607–609.
3. Comparison of the QT interval response during sinus and paced rhythm in conscious and anesthetized beagle dogs / A. Ollerstam, S. A. Visser, G. Duker [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2007. – V. 56. – P. 131–144.
4. Bass A. S. Origins, practices and future of safety pharmacology / A. S. Bass, L. Kinter, P. Williams // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2004. – V. 49. – P. 145–151.
5. Pugsley M. K. Principles of Safety Pharmacology / M. K. Pugsley, S. Authier, M. J. Curtis // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – V. 154. – P. 1382–1399.
6. ICH S7A Note for guidance on safety pharmacology studies for human pharmaceuticals // Federal Register. – 2001. – V. 66, № 135. – P. 36791–36792. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf.
7. ICH S7B The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals // Federal Register. – 2006. – V. 70, № 202. – P. 61133–61134. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf.
8. ICH E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs / Federal Register. – 2005. – V. 70, № 202. – P. 61134–61135. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073153.pdf>.
9. Japanese Guidelines for Nonclinical Studies of Drugs Manual. – Tokyo : Yakuji Nippo Limited, 1995. – 174 p.
10. Garber K. The second wave in kinase cancer drugs / K. Garber // *Nature Biotechnol.* – 2006. – V. 24. – P. 127–130.
11. Sanguinetti M. C. Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome / M. C. Sanguinetti, J. S. Mitcheson // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2005. – V. 26. – P. 119–124.
12. Sugiyama A. Sensitive and reliable proarrhythmia *in vivo* animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts / A. Sugiyama // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – V. 154. – P. 1528–1537.

13. Cardiovascular function in nonclinical drug safety assessment: current issues and opportunities / R. D. Sarazan, S. Mittelstadt, B. Guth [et al.] // *International Journal of Toxicology*. – 2011. – V. 30. – P. 272–286.
14. Guth B. D. Preclinical Cardiovascular Risk Assessment in Modern Drug Development / B. D. Guth // *Toxicol. Sci.* – 2007. – V. 97, № 1. – P. 4–20.
15. Stevens J. L. The future of drug safety testing: Expanding the view and narrowing the focus / J. L. Stevens, T. K. Baker // *Drug Discovery Today*. – 2009. – V. 14. – P. 162–167.
16. Best practice in the conduct of key nonclinical cardiovascular assessments in drug development: Current recommendations from the Safety Pharmacology Society / D. J. Leishman, T. W. Beck, N. Dybdal [et al.] // *J. Pharm. Toxicol. Methods*. – 2012. – V. 65. – P. 93–101.
17. Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer / H. R. Mellor, A. R. Bell, J.-P. Valentin, R. R. A. Roberts // *Toxicological Sciences*. – 2011. – V. 120. – P. 14–32.
18. Meijler F. L. Archetype, adaptation and the mammalian heart / F. L. Meijler, T. D. Meijler // *Neth Heart J.* – 2011. – V. 19. – P. 142–148.
19. Ostergaard G. Physiological, Hematological, and Clinical Chemistry Parameters, Including Conversion Factors / G. Ostergaard, H. Hansen, J. Ottesen // In *Handbook of Laboratory Animal Science* [Eds. J. Hau, S. J. Schapiro], Volume I: Essential Principles and Practices. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. – P. 667–707.
20. Electrocardiography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) / S. L. Bartlett, N. Abou-Madi, M. S. Kraus, [et al.] // *J. Zoo Wildlife Med.* – 2009. – V. 40, № 3. – P. 466–473.
21. Milani-Nejad N. Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages / N. Milani-Nejad, P. M. L. Janssen // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2013. – V. 131, № 3. – P. 235–239. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.007>.
22. Prothero J. Heart weight as a function of body weight in mammals / J. Prothero // *Growth*. – 1979. – V. 43, № 3. – P. 139–150.
23. From mouse to whale: a universal scaling relation for the PR interval of the electrocardiogram of mammals / S. F. Noujaim, E. Lucca, V. Munoz [et al.] // *Circulation*. – 2004. – V. 110. – P. 2802–2808.
24. Methods in Cardiovascular Safety Pharmacology / P. Champeroux, B. D. Guth, M. Markert, G. Rast // *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* [eds. Vogel H. G. [et al.]]. – Berlin: Springer-Verlag, 2013. – P. 73–97.
25. Development of a surgical approach for telemetering guinea pigs as a model for screening QT interval effects / G. Provan, A. Stanton, A. Sutton [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2005. – V. 52. – P. 223–228.
26. QT and RR intervals in conscious and anesthetized guinea pigs with highly varying RR intervals and given QTc-lengthening test articles / R. L. Hamlin, A. Kijawornrat, B. W. Keene, D. M. Hamlin // *Toxicol. Sci.* – 2003. – V. 76. – P. 437–442.
27. Cardiovascular parameters in anaesthetized guinea pigs: a safety pharmacology screening model / D. Hauser, M. Stade, A. Schmidt, G. Hanauer // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2005. – V. 52. – P. 106–114.
28. Weissenburger J. Transmural heterogeneity of ventricular repolarization under baseline and long QT conditions in the canine heart *in vivo*: torsades de pointes develops with halothane but not pentobarbital anesthesia / J. Weissenburger, V. V. Nesterenko, C. Antzelevitch // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2000. – V. 11. – P. 290–304.
29. Inhibition of cardiac potassium currents by pentobarbital / A. Bachmann, S. Mueller, K. Kopp [et al.] // *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* – 2002. – V. 365. – P. 29–37.
30. QT PRODACT: *in vivo* QT assay in anesthetized dog for detecting the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals / H. Tashibu, H. Myazaki, K. Aoki [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2005. – V. 99. – P. 473–486.
31. Modeling and Simulation of Preclinical Cardiac Safety: Towards an Integrative Framework / A. Soubret, G. Helmlinger, B. Dumotier [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – V. 24, № 1. – P. 76–90.
32. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats / S. Pestel, H. J. Martin, G. M. Maier, B. Guth // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2006. – V. 54. – P. 200–214.
33. Basic & Clinical Pharmacology / ed. B. G. Katzung, S. B. Masters, A. J. Trevor. – [12th ed.] // USA: McGraw Hill Professional, 2011. – 1248 p.
34. Wallis R. Integrated risk assessment and predictive value to humans of nonclinical repolarization assays / R. Wallis // *British Journal of Pharmacology*. – 2010. – V. 159. – P. 115–121.
35. Cardiovascular safety assessments in the conscious telemetered dog: Utilisation of super-intervals to enhance statistical power / A. Sivarajah, S. Collins, M. Sutton [et al.] // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2010. – V. 62. – P. 12–19.
36. ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee initiative: Evaluation of three non-clinical models of QT prolongation / L. Hanson, A. Bass, G. Gintant [et al.] // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2006. – V. 54. – P. 116–129.
37. Statistical power analysis for hemodynamic cardiovascular safety pharmacology studies in beagle dogs / A. Chiang, W. Smith, B. Main, R. Sarazan // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2004. – V. 50. – P. 121–130.

38. ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee dataset: An analysis of the statistical properties of QT interval and rate-corrected QT interval (QTc) / A. Chiang, A. Bass, M. Cooper [et al.] // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 2007. – V. 56. – P. 95–102.
39. Calculation of QT shift in non clinical safety pharmacology studies / P. Chamepeux, E. Martel, J. S. L. Fowler [et al.] // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 2009. – V. 59. – P. 73–85.
40. QT PRODACT: Interfacility variability in electrocardiographic and hemodynamic parameters in conscious dogs and monkeys / H. Sasaki, N. Shimizu, H. Suganami, K. Yamamoto // Journal of Pharmacological Sciences. – 2005. – V. 99. – P. 513–522.
41. Optimizing the experimental environment for dog telemetry studies / A. Klumpp, T. Trautmann, M. Markert, B. Guth // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 2006. – V. 54. – P. 141–149.
42. Food and Drug Administration Safety and Innovation Act // Public Law 112–144. — JULY 9, 2012 Stat. 993 // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-112publ144/content-detail.html>.
43. Kesselheim A. S. FDA Designations for Therapeutics and Their Impact on Drug Development and Regulatory Review Outcomes / A. S. Kesselheim, J. J. Darrow // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – V. 97, № 1. – P. 29–36.

А. С. Хромов

Общая фармакологическая безопасность и сердечно-сосудистая система

Общая фармакологическая безопасность (ОФБ) или Safety Pharmacology – это молодая, быстро развивающаяся дисциплина. Используя методы фармакологии в нормативных управляемых процессах, она позволяет получать данные для оценки профиля безопасности потенциального лекарственного средства. Целью ОФБ является выявление на стадии доклинического изучения возможных побочных эффектов лекарственного средства. При этом прогнозирование таких эффектов строится на основании результатов оценки соотношения фармакодинамических и фармакокинетических характеристик исследуемого вещества. В отличие от классической фармакологии, исследования общей фармакологической безопасности позволяют предсказать риск развития серьезных (тяжелых) побочных реакций, включая смертельный исход, а также включают соответствующие нормативные требования для проведения таких исследований, что придает ОФБ уникальный характер.

Ключевыми вопросами для ОФБ являются обнаружение возможного неблагоприятного эффекта лекарственного средства, определение границ безопасности и, наконец, обоснование безопасности клинических испытаний. Иными словами, ОФБ – это дисциплина, которая позволяет предсказать, будет ли безопасным препарат (в самом широком смысле этого слова) при его введении животному или человеку.

В этой обзорной статье представлен краткий исторический очерк становления и развития общей фармакологической безопасности, приводятся основные директивные документы и руководства по оценке ОФБ.

Показаны особенности функционирования сердечно-сосудистой системы мелких и крупных животных по сравнению с человеком.

Обсуждаются преимущества и недостатки проведения исследований на бодрствующих и наркотизированных животных.

Подчеркивается возрастание значимости оценки ОФБ в результате появления законодательно оформленного понятия «breakthrough therapy» («революционная терапия»). Новые препараты могут получить одобрение FDA только на основании результатов испытаний, устанавливающих их безопасность в процессе адекватных и хорошо контролируемых исследований.

Делается вывод об актуальности и перспективности развития исследований по оценке общей фармакологической безопасности в Украине. Целью таких работ должны быть минимизация риска развития потенциально опасных побочных эффектов и оптимизация доклинических испытаний новых лекарственных средств.

Ключевые слова: общая фармакологическая безопасность, лекарственное средство, сердечно-сосудистая система

О. С. Хромов

Загальна фармакологічна безпека та серцево-судинна система

Загальна фармакологічна безпека (ЗФБ) або Safety Pharmacology – це молода дисципліна, що швидко розвивається. Використовуючи методи фармакології в нормативних керованих процесах, вона дозволяє отримувати дані для оцінки профілю безпеки потенційного лікарського засобу. Метою ЗФБ є виявлення на стадії доклінічного вивчення можливих побічних ефектів лікарського засобу. При цьому прогнозування таких ефектів будується на підставі результатів оцінки співвідношення фармакодинамічних і фармакокінетичних характеристик досліджуваної речовини. На відміну

від класичної фармакології, дослідження загальної фармакологічної безпеки дозволяють прогнозувати ризик розвитку серйозних (тяжких) побічних реакцій, включаючи смертельний результат, а також включають відповідні нормативні вимоги для проведення таких досліджень, що надає ЗФБ унікальний характер.

Ключовими питаннями для ЗФБ є виявлення можливого несприятливого ефекту лікарського засобу, визначення меж безпеки і, нарешті, обґрунтування безпеки клінічних випробувань. Іншими словами, ЗФБ – це дисципліна, яка дозволяє передбачити, чи буде безпечним препарат (у найширшому сенсі цього слова) при його введенні тварині або людині.

У цій оглядовій статті надається короткий історичний нарис становлення та розвитку загальної фармакологічної безпеки, наводяться основні директивні документи й керівні положення з оцінки ЗФБ.

Описуються особливості функціонування серцево-судинної системи дрібних і великих тварин порівняно з людиною.

Обговорюються переваги та недоліки проведення досліджень на ненаркотизованих і наркотизованих тваринах.

Підкреслюється зростання значущості оцінки ЗФБ у результаті появи законодавчо оформленого поняття «breakthrough therapy» («революційна терапія»). Нові препарати можуть отримати схвалення FDA тільки на підставі результатів випробувань, що встановлюють їхню безпеку в процесі адекватних і добре контрольованих досліджень.

Робиться висновок про актуальність і перспективність розвитку досліджень з оцінки загальної фармакологічної безпеки в Україні. Метою таких робіт має бути мінімізація ризику розвитку потенційно небезпечних побічних ефектів і оптимізація доклінічних випробувань нових лікарських засобів.

Ключові слова: загальна фармакологічна безпека, лікарський засіб, серцево-судинна система

A. S. Khromov

Safety pharmacology and cardiovascular system

Safety Pharmacology (SF) is a young, rapidly growing discipline. Using pharmacological methods in the regulatory-driven processes, it provides data to assess the safety profile of a potential drug. SF is aimed to identify the potential side effects of drugs at the stage of preclinical studying. A prediction of such effects is based on the pharmacodynamics/pharmacokinetics ratio assessment for the test substance. In contrast to classic pharmacology, safety pharmacology allows predicting risk of serious (severe) adverse effects, including death, as well as includes appropriate regulatory requirements for such research, and this gives SF an unique character.

SF has the key issues such as identification of the potential adverse effects of the drugs, detection of the safety margins, and finally, justification of safety of the clinical trials. In other words, SF is a discipline that permits to predict whether the drug is safe (in the broadest sense of the word) when administered to an animal or human.

The review article gives a brief history of the formation and development of safety pharmacology, cites the main directive documents and guides on SF assessment.

The features of the cardiovascular system functioning in small and large animals compared to human are described.

The advantages and disadvantages of conducting studies on conscious and anesthetized animals are discussed.

An increasing significance of SF assessment as a result of legislative registration of the concept «breakthrough therapy» is emphasized. New drugs can get approval from the FDA only on the basis of the trial establishing a safety of new drug in the adequate and well-controlled studies.

The article concludes on the relevance and prospects of the research for safety pharmacology assessment in Ukraine. The aim of such research should be minimization of risk for potentially hazardous side effects and optimization of preclinical studies for new drugs.

Key words: safety pharmacology, medicine, cardiovascular system

Надійшла: 14 березня 2016 р.

Контактна особа: Хромов Олександр Станіславович, головний науковий співробітник, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: askhromov@ukr.net

Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. А. Георгіянц, Г. І. Северіна

Скринінгове дослідження нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на протисудомну активність

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: фармакологічний скринінг, протисудомна активність, похідні піримідину, PASS-прогноз, коразол-індуковані судоми

Епілепсія за поширеністю є четвертим неврологічним захворюванням – частіше зустрічаються лише мігрень, інсульт і хвороба Альцгеймера [1]. На епілепсію страждає близько 50 мільйонів осіб, що складає до 1 % населення планети, і лише 70 % пацієнтів отримують задовільну терапію. В Україні 75 % з понад 100 тис. хворих на епілепсію не отримують необхідного лікування [2, 3]. У більшості випадків єдиним методом лікування є фармакотерапія [4]. Монотерапію вважають оптимальною, але 30–40 % пацієнтів потребують комбінованої терапії. До 70–80 % хворих при адекватному лікуванні позбавляються епілептичних нападів. Проте 20–30 % пацієнтів залишаються фармакорезистентними навіть при комбінації декількох препаратів. Тому проблема пошуку нових ефективних антиконвульсантів залишається відкритою [5–7].

Піримідинвмісні сполуки [8, 9], зокрема, піразолопіримідини та їхні похідні [10] останнім часом інтенсивно вивчають з метою розробки нових антиконвульсантів. На кафедрі фармацевтичної хімії НФаУ під керівництвом професора В. А. Георгіянц синтезовано 35 оригінальних похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону (рисунок), 33 з яких згідно з PASS-прогнозом мають досить високу ймовірність протисудомного ефекту ($P_a \geq 0,50$) [10, 11] (табл. 1).

Мета дослідження – з'ясувати вплив нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на судомний синдром у скринінговому дослідженні.

Матеріали та методи. Скринінг сполук на протисудомну активність проводили згідно з методичними рекомендаціями [12, 13] на базовій моделі коразолових судом у мишей. Проконвульсивна дія коразолу зумовлена пригнічувальним впливом на ГАМКА-сайт бензодіазепінових рецепторів та зниженням ГАМК-ергічних гальмівних процесів.

Використано 240 білих статевозрілих нелінійних мишей обох статей масою 18–25 г. Тварин утримували в умовах віварію ЦНДЛ НФаУ відповідно до санітарно-гігієнічних норм та принципів Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах.

Мишей розподілили методом випадкового вибору на 37 груп, кожна з яких складала тварини обох статей: 1 група – контроль ($n = 17$) – модель судом, індукованих коразолом (пентилентетразол, «Sigma», США) у дозі 90 мг/кг підшкірно у вигляді водного розчину [2, 4]; 2 – група референс-препарату ($n = 6$) – вальпроат натрію («Депакін», Sanofi-Aventis, Франція) у дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково за 30 хв до введення коразолу; 3–37 групи – піддослідні тварини ($n=5-8$), яким вводили досліджувані сполуки в емпіричних дозах 50–100 мг/кг крізь

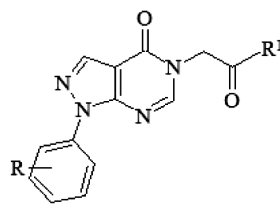
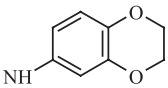
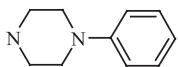
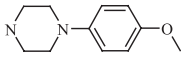
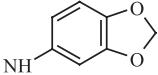
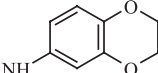
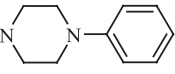
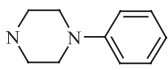
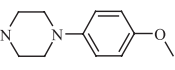
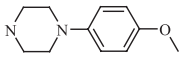
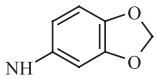


Рисунок. Базова структура похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, використаних у скринінговому дослідженні протисудомної дії

Хімічна структура похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону та PASS-прогноз їхньої протисудомної активності (Pa)

Шифр	R	R1	Назва сполуки	Брутто-формула	Pa
77274	Br	NHPh	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-феніл-ацетамід	C ₁₉ H ₁₄ BrN ₅ O ₂	0,559
78216	Br	NHPh (4-Me)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-метил-феніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₆ BrN ₅ O ₂	0,529
78217	Br	NMePh	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід	C ₂₀ H ₁₆ BrN ₅ O ₂	0,565
78219	Br	NHPh (4-OMe)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-метоксифеніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₆ BrN ₅ O ₃	0,503
78220	Br	NHPh (2,4-diOMe)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2,4-диметоксифеніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₈ BrN ₅ O ₄	0,541
78222	Br		2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксин-6-іл)ацетамід	C ₂₁ H ₁₆ BrN ₅ O ₄	0,588
78223	Br	NHPh (4-Cl)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлоровеніл)ацетамід	C ₁₉ H ₁₃ BrClN ₅ O ₂	0,578
78224	Br	NHPh (3-Cl, 4-MeO)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(3-хлоро-4-метоксифеніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₅ BrClN ₅ O ₃	0,546
78225	Br		1-(4-бромовеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	C ₂₃ H ₂₁ BrN ₆ O ₂	0,589
78226	Br		1-(4-бромовеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	C ₂₄ H ₂₃ BrN ₆ O ₃	0,501
78227	Br	NHBen(4-Cl)	2-[1-(4-бромовеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлоробензил)ацетамід	C ₂₀ H ₁₅ BrClN ₅ O ₂	0,592

Шифр	R	R1	Назва сполуки	Брутто-формула	Р _a
78235	4-OMe	NHPh	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-фенілацетамід	C ₂₀ H ₁₇ N ₅ O ₃	0,535
78236	4-OMe	NHPh (4-OMe)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-метоксифеніл)ацетамід	C ₂₁ H ₁₉ N ₅ O ₄	0,529
78237	2-Cl	NHPh	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-фенілацетамід	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₅ O ₂	0,518
78238	2-Cl	NHPh (4-OMe)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-метоксифеніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₃	0,537
78288	4-OMe	NHPh (2,4-diOMe)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2,4-диметоксифеніл)ацетамід	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₅	0,501
78297	4-OMe	NHPh (4-Me)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-метилфеніл)ацетамід	C ₂₁ H ₁₉ N ₅ O ₃	0,502
78298	4-OMe	NMePh	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід	C ₂₁ H ₁₉ N ₅ O ₃	0,501
78299	4-OMe	NHPh (2-OMe)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2-метоксифеніл)ацетамід	C ₂₁ H ₁₉ N ₅ O ₄	0,517
78300	4-OMe		N-(1,3-бензодіоксол-5-іл)-2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]ацетамід	C ₂₁ H ₁₇ N ₅ O ₅	0,541
78301	4-OMe		2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксин-6-іл)ацетамід	C ₂₂ H ₁₉ N ₅ O ₅	0,531
78302	4-OMe	NHPh (4-Cl)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлорофеніл)ацетамід	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₃	–
78303	4-OMe		1-(4-метоксифеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	C ₂₄ H ₂₄ N ₆ O ₃	0,501

Шифр	R	R1	Назва сполуки	Брутто-формула	Pa
78304	4-OMe	NHBen(4-Cl)	2-[1-(4-метоксифеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлоробензил)ацетамід	$C_{21}H_{18}ClN_5O_3$	0,503
78307	2-Cl	NHPh (4-Cl)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлорофеніл)ацетамід	$C_{19}H_{13}Cl_2N_5O_2$	0,529
78308	2-Cl		1-(2-хлорофеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	$C_{22}H_{21}ClN_6O_2$	0,505
78340	4-Br	NHPh (4-OMe)	2-[1-(4-бромфеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2-метоксифеніл)ацетамід	$C_{20}H_{16}BrN_5O_3$	0,582
78342	2-Cl	NMePh	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід	$C_{20}H_{16}ClN_5O_2$	0,524
78343	2-Cl	NHPh (2-OMe)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2-метоксифеніл)ацетамід	$C_{20}H_{16}ClN_5O_3$	0,527
78346	2-Cl		1-(2-хлорофеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	$C_{24}H_{23}ClN_6O_3$	0,553
78347	2-Cl	NHBen(4-Cl)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(4-хлоробензил)ацетамід	$C_{20}H_{15}Cl_2N_5O_2$	0,544
78512	2-Cl	NHPh (2,4-diOMe)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(2,4-диметоксифеніл)ацетамід	$C_{21}H_{18}ClN_5O_4$	0,504
78513	2-Cl	NHPh (3-Cl, 4-MeO)	2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-(3-хлоро-4-метоксифеніл)ацетамід	$C_{20}H_{15}Cl_2N_5O_3$	–
78553	4-OMe		1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он	$C_{25}H_{26}N_6O_4$	0,530
78603	4-Br		N-(1,3-бензодіоксол-5-іл)-2-[1-(4-бромфеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]ацетамід	$C_{20}H_{14}BrN_5O_4$	0,540

зонд у шлунок у вигляді суспензії у твіні-80 за 30 хв перед ін'єкцією коразолу.

Ефект сполук оцінювали за латентним періодом клонічних або тонічних судом, кількістю клоніко-тонічних пароксизмів на 1 мишу, кількістю тварин з клонічними та тонічними нападами, тяжкістю нападів, тривалістю судомного періоду, часом загибелі та летальністю. Якщо судом не наставали протягом 1 год, латентний період приймали за 60 хв. Тяжкість судом визначали в балах: 1 – здригання, 2 – маневний біг, 3 – клонічні напади, 4 – клоніко-тонічні судоми з боковим положенням, 5 – тонічна екстензія, 6 – тонічна екстензія, що призводить до загибелі тварин [14]. Статистичну значущість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента або за критерієм Уайта залежно від характеру розподілу, а при обліку в альтернативній формі – за кутовим перетворенням Фішера. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. За результатами скринінгу похідні піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону розподілили на 4 категорії: 3 сполуки з виразною протисудомною дією – за критерієм значного зниження летальності та/або зменшення низки ключових показників тяжкості судом (табл. 2); 16 сполук, що виявили тенденцію до антиконвульсивної дії – за критерієм зменшення 1–3 показників тяжкості судомного синдрому без вірогідного зниження летальності (табл. 3); 9 сполук без суттєвого впливу на перебіг судом – за критерієм відсутності впливу на жоден показник або наявності різноспрямованого впливу на 1–2 показники тяжкості або тривалості судом без вірогідного впливу на летальність (табл. 4); 7 сполук-проконвульсантів – за критерієм зростання тяжкості судом (перш за все за рахунок 100 % виявлення найнебезпечнішої тонічної екстензії) та збільшення летальності (табл. 5).

Сполука-лідер 78303 у дозі 100 мг/кг достовірно (на 42,1 %) зменшувала летальність відносно контролю, майже в 5 разів – тривалість судомного періоду, у 2,6 разу – кількість нападів на

Таблиця 2
Вплив похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону – лідерів за антиконвульсивною активністю – на коразолові судоми у мишей

Група тварин, сполука	n	Доза, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	Кількість мишей з судомами, %		Тяжкість судом, бал	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічними	тонічними				
Контроль	17	–	5,24 ± 1,74	3,06 ± 0,34	100	76,5	5,00 ± 0,20	9,74 ± 1,84	11,95 ± 1,39	58,8
Вальпроат натрію	6	300	7,62 ± 0,98	1,67 ± 0,65	100	66,7	3,67 ± 0,16*	2,43 ± 2,02*	–	0**
78303	6	100	24,71 ± 8,90*	1,17 ± 0,32*	83,3**	33,3**	3,17 ± 0,97	1,98 ± 1,19*	12,17	16,7**
78342	6	100	5,06 ± 1,09	1,80 ± 0,48*	100	66,7	4,00 ± 0,48	8,40 ± 3,95	5,73*	16,7**
78553	6	50	14,13 ± 9,12	1,00 ± 0,32*	83,3**	50,0	3,67 ± 0,97	1,80 ± 1,49*	10,42 ± 8,03	33,3

Примітка. Тут і в табл. 3–5: статистично значущі відмінності відносно контролю ($p \leq 0,05$): *за t-критерієм Стьюдента; **за кутовим перетворенням Фішера.

мишу за рахунок клонічних (на 16,7 %) і тонічних пароксизмів (більш ніж у 2 рази), збільшувала латентний період судом у 4,7 разу та виявляла тенденцію до зменшення їхньої тяжкості (табл. 2). Це свідчить про виразний протисудомний ефект сполуки 78303, за яким вона наближається до вальпроату натрію. Останній повністю запобіг летальності та значуще зменшив тяжкість і тривалість судом (табл. 2).

Ще одна сполука-лідер 78342 у дозі 100 мг/кг чинила дещо слабший антиконвульсивний ефект, статистично значуще зменшуючи летальність на 42,1 % і кількість клоніко-тонічних нападів (у 1,7 разу) при незмінному латентному періоді. Мала місце тенденція до зниження тяжкості судом у 1,25 разу та кількості мишей із тонічними пароксизмами на 10 %.

У тварин, яким вводили сполуку 78553 у дозі 50 мг/кг, спостерігали достовірне зменшення кількості клоніко-тонічних нападів на 1 мишу в 3 рази, а тривалості судомного періоду – у 5,4 разу. Кількість мишей з клонічними судомами достовірно зменшувалась на 16,7 %, спостерігалася тенденція до збільшення латентного періоду в 2,7 разу та зменшення тяжкості судом у 1,4 разу, кількості мишей з тонічними судомами – на 26,5 %. Летальність на тлі сполуки 78553 знижувалась на 25,5 %.

Похідні під шифрами 782107, 78219, 78220, 78223, 78224, 78225, 78226, 78237, 78298, 78302, 78304, 78307, 78340, 78347, 78512, 78603 виявили тенденцію до антиконвульсивної дії, критерії якої в окремих сполук відрізнялися (табл. 3). Без достовірного впливу на латентний період судом і летальність більшість з них за виключенням 78347 статистично значуще зменшувала кількість клоніко-тонічних пароксизмів у діапазоні від 1,5 до 2,3 разу та/або кількість тварин з клонічними нападами на 12,5–16,7 %, а сполуки 78223, 78298 та 78302 вірогідно зменшували тривалість судомного періоду відповідно в 2,8; 2,5 і 4,8 разу. Сполука 78340 достовірно зменшувала тяжкість судом у 1,2 разу. Похідна під шифром 78217 – єдина сполука цієї категорії, що вірогідно (удвічі) збільшила латентний період

судом, а також у 2,3 разу зменшила кількість нападів на 1 тварину, у 4,6 разу – тривалість судомного періоду, хоча й не зменшила летальність. На тлі сполуки 78603 кількість тварин з смертельно небезпечними тонічними пароксизмами зростала до 100 %, проте 4 з 6 мишей пережили ці найтяжчі напади, і летальність знизилася до 33,3 %. Під впливом сполуки 78347 статистично значущого зменшення жодного показника тяжкості судом не спостерігали, проте 6 з 8 показників мали тенденцію до поліпшення, летальність скоротилася на 21,4 %, що дало підставу розглядати зазначену речовину як носія помірних протисудомних властивостей.

Сполуки з шифрами 77274, 78227, 78235, 78238, 78297, 78299, 78300, 78308, 78513 суттєво не вплинули на коразолові судоми (табл. 4).

Інтегральний показник – летальність – на тлі їхнього застосування або невірогідно зменшився (у випадку сполуки 78308 – на 8,8 %), або збільшився (на 7,9–24,5 % під впливом решти сполук). Сполуки 78308, 78513 і 78300 не спричинили значущого впливу на жоден з показників, решта достовірно змінювала один з кількісних параметрів модельних судом, але не впливала ані на час загибелі, ані на летальність.

Виявлено 7 проконвульсантів: сполуки 78216, 78222, 78236, 78288, 78301, 78343 та 78346 (табл. 5). Усі миші на тлі цих сполук мали тонічні судоми, що достовірно вище, ніж у контролі. Речовини 78288, 78301, 78343 та 78346 виявили найсильнішу проконвульсивну дію, достовірно збільшуючи тяжкість судом у 1,2 разу, а летальність – до 100 %. Три сполуки (78301, 78343 та 78288) зменшували кількість клоніко-тонічних нападів у 1,8 разу, причому сполуки 78301 та 78288 значуще зменшували тривалість судомного періоду відповідно в 4,4 і 7,0 разу, але це пояснюється швидким прогресуванням тяжкості нападів з загибеллю мишей після перших судом. Час загибелі тварин на тлі сполуки 78288 достовірно зменшився в 1,8 разу.

Привертає увагу відсутність протисудомної дії в 16 похідних (45,7 % досліджених сполук), у тому числі прокон-

Вплив похідних піразолол[3,4-d]піримідин-4-ону, які продемонстрували тенденцію до антиконвульсивної дії, на перебіг корозолових судом у мишей

Група тварин, сполука	n	Доза, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	Кількість мишей з судомами, %		Тяжкість судом, бал	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічні	тонічні				
Контроль	17	–	5,24 ± 1,74	3,06 ± 0,34	100	76,5	5,00 ± 0,20	9,74 ± 1,84	11,95 ± 1,39	58,8
Вальпроат натрію	6	300	7,62 ± 0,98	1,67 ± 0,65	100	66,7	3,67 ± 0,16*	2,43 ± 2,02*	–	0**
78217	6	100	10,87 ± 2,08*	1,33 ± 0,32*	100	83,3	5,50 ± 0,48	2,10 ± 1,49*	14,44 ± 2,50	83,3
78219	6	100	14,54 ± 9,35	1,67 ± 0,48*	83,3**	66,7	4,50 ± 0,97	6,02 ± 2,42	15,00 ± 1,37	66,7
78220	6	100	5,00 ± 0,51	1,83 ± 0,32*	100	83,3	5,17 ± 0,48	6,11 ± 1,67	14,30 ± 0,97	66,7
78223	8	100	15,75 ± 6,96	1,63 ± 0,62*	87,5**	50,0	3,88 ± 0,74	3,47 ± 1,56*	14,01 ± 2,39	37,5
78224	8	100	10,91 ± 7,13	2,25 ± 0,50	87,5**	75,0	4,38 ± 0,74	12,10 ± 3,75	21,13 ± 4,29	50,0
78225	6	100	16,03 ± 8,98	1,50 ± 0,32*	83,3**	83,3	5,00 ± 0,97	5,49 ± 1,55	13,81 ± 1,33	83,3
78226	6	100	5,96 ± 2,46	2,00 ± 0,32*	100	83,3	5,17 ± 0,48	8,46 ± 2,54	13,87 ± 3,83	66,7
78237	6	100	5,00 ± 1,17	1,83 ± 0,32*	100	66,7	4,83 ± 0,48	6,73 ± 1,82	12,68 ± 1,94	66,7
78298	6	100	3,32 ± 0,66	1,83 ± 0,32*	100	66,7	5,00 ± 0,48	3,97 ± 1,63*	5,95 ± 3,17	66,7
78302	6	100	5,86 ± 1,47	1,50 ± 0,16*	100	66,7	4,67 ± 0,48	2,05 ± 1,12*	9,63 ± 1,95	50,0
78304	6	100	14,60 ± 9,37	1,33 ± 0,65*	83,3**	66,7	4,50 ± 0,97	3,16 ± 2,77	10,62 ± 5,08	66,7
78307	6	100	13,65 ± 9,30	1,67 ± 0,32*	83,3**	83,3	4,67 ± 0,97	9,73 ± 3,97	15,54 ± 5,75	66,7
78340	8	100	6,09 ± 1,71	1,75 ± 0,25*	100	62,5	4,13 ± 0,37*	9,75 ± 2,63	17,72 ± 7,48	37,5
78347	8	100	4,56 ± 0,98	2,38 ± 0,37	100	87,7	4,63 ± 0,37	8,66 ± 2,37	15,73 ± 5,86	37,5
78512	6	100	14,93 ± 9,15	2,50 ± 0,64	83,3**	83,3	4,67 ± 0,96	10,48 ± 3,40	17,41 ± 4,70	66,7
78603	6	100	3,59 ± 0,78	2,00 ± 0,32*	100	100**	4,83 ± 0,32	7,75 ± 2,52	11,00 ± 3,65	33,3

вульсивна дія в 7 з них (20 % від загальної кількості похідних) усупереч результатам PASS-прогнозу, згідно з якими ймовірність антиконвульсивного ефекту для всіх сполук перевищує 0,500. Саме такий порядок прогностичних значень імовірності досліджуваного виду активності зумовлює перспективність виявлення сполук з високим рівнем новизни (New Chemical Entity, NCE) [11]. Проте дисонанс очікуваних і отриманих результатів не є дивним, оскільки PASS-прогноз описує реальну ситуацію приблизно. Використовувані у вибірці, що навчає, оригінальні MNA дескриптори (Multilevel Neighbourhoods of Atoms), вочевидь, дозволяють не охарактеризувати точну модальність ефекту, характер впливу досліджуваної сполуки на судомний синдром (анти- чи, навпаки, проконвульсивний), а лише прогнозувати факт впливу певних фармакофорів на структури мозку, які беруть участь у судомній активності.

Зокрема, PASS-прогноз не враховує особливості просторової структури молекули, яка має значення як для афінітету останньої до біологічних мішеней, так і для прояву їхніх стимулюючих або інгібуючих властивостей.

Крім того, відсутня кореляція між прогнозованою імовірністю протисудомної дії та її наявністю за результатами експерименту. Наприклад, для лідерів за протисудомною дією сполук 78303, 78342, 78553 Ра становить відповідно 0,501, 0,524 і 0,530, а для сполук з найвиразнішими проконвульсивними властивостями, які зумовили загибель 100 % тварин (78288, 78301, 78343 та 78346), Ра складає відповідно 0,501, 0,531, 0,524, 0,533. Найвища й майже однакова ймо-

Таблиця 4
Вплив похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, які не виявили суттєвої дії на перебіг коразол-індукованих пароксизмів у мишей, на кількісні показники модельних судом

Група тварин, сполука	n	Доза, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	Кількість мишей з судомами, %		Тяжкість судом, бал	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічні	тонічні				
Контроль	17	–	5,24 ± 1,74	3,06 ± 0,34	100	76,5	5,00 ± 0,20	9,74 ± 1,84	11,95 ± 1,39	58,8
Вальпроат натрію	6	300	7,62 ± 0,98	1,67 ± 0,65	100	66,7	3,67 ± 0,16*	2,43 ± 2,02*	–	0**
78227	6	100	4,47 ± 0,92	2,83 ± 0,32	100	83,3	5,17 ± 0,48	15,93 ± 2,25*	18,66 ± 3,29	66,7
78235	6	100	4,50 ± 0,48	3,17 ± 0,81	100	100**	5,33 ± 0,48	13,63 ± 3,74	14,44 ± 5,21	66,7
78238	6	100	3,39 ± 0,86	1,83 ± 0,32*	100	83,3	5,17 ± 0,48	7,29 ± 2,48	14,83 ± 1,29	66,7
77274	6	100	10,77 ± 3,24	1,17 ± 0,16*	100	83,3	5,50 ± 0,48	1,94 ± 1,46*	11,62 ± 3,90	83,3
78297	5	100	14,74 ± 11,21	3,40 ± 0,81	80,0**	80,0	4,80 ± 0,97	7,84 ± 3,01	13,22 ± 4,34	80,0
78299	6	100	3,38 ± 3,38	2,00 ± 0,32*	100	83,3	5,50 ± 0,48	4,46 ± 1,59*	7,03 ± 2,02	83,3
78300	6	100	5,08 ± 1,47	2,17 ± 0,48	100	83,3	5,17 ± 0,48	7,37 ± 2,23	14,41 ± 4,49	66,7
78308	6	100	3,91 ± 0,77	2,17 ± 0,32	100	83,3	4,83 ± 0,48	9,23 ± 2,59	8,77 ± 1,36	50,0
78513	6	100	4,54 ± 0,72	2,17 ± 0,32	100	83,3	5,17 ± 0,42	7,95 ± 3,28	10,40 ± 3,44	66,7

вірність протисудомної дії прогнозувалася для сполук 78227 ($P_a = 0,592$), 78225 ($P_a = 0,589$) і 78222 ($P_a = 0,588$). Проте перша з них суттєво не вплинула на модельні судоми (лише вірогідно подовжила тривалість судомного періоду), друга виявила властивості антиконвульсанта помірної активності (лише зменшила кількість судом та частоту клонічних нападів), а третя – проконвульсанта з помірною активністю (збільшила частоту найтяжчих тонічних пароксизмів до 100 %).

Слід відзначити, що за даними комп'ютерної програми PASS для сполук 78302 та 78513 не було прогнозовано протисудомну активність. За результатами скринінгу сполука 78513 дійсно не вплинула на жоден прояв судомного синдрому, а сполука 78302 зменшувала кількість нападів і тривалість судомного періоду.

Результати фармакологічного скринінгу похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону дають підставу для аналізу закономірності зв'язку «структура – протисудомна активність». Дві сполуки-лідери за протисудомною дією (78303 та 78553) містять у своєму складі, крім спільних для всієї групи речовин піразолопіримідинового циклу, карбонільної групи в 4 положенні та ацетамідного фрагмента, залишок феніл- або 4-метоксифеніл-піперазину та 4-метоксифенільний радикал у 1 положенні. Ці сполуки перевершують навіть препарат порівняння вальпроат натрію за тривалістю латентного періоду в 3,20 та 1,85 рази відповідно, а також достовірно зменшують кількість тварин з клонічними судомами. Заміна 4-метоксифенільного радикала на 4-бромфенільний у 1 положенні (сполуки 78225, 78226) дещо зменшує тривалість латентного періоду та підвищує летальність, а введення 2-хлорофенільного радикала в 1 положення призводить до зникнення протисудомного ефекту (78308) та навіть обумовлює проконвульсивний ефект з 100 % летальністю піддослідних тварин (78346). Отже, можна стверджувати, що для прояву протисудомної активності доцільним є поєднання двох фармакофорів: 4-метокси-

Таблиця 5

Вплив похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, які виявляють проконвульсивні властивості, на перебіг корозолових судом у мишей										
Група тварин, сполука	n	Доза, мг/кг	Латентний період, хв	Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	Кількість мишей з судомами, %		Тяжкість судом, бал	Тривалість судомного періоду, хв	Час загибелі, хв	Летальність, %
					клонічними	тонічними				
Контроль	17	–	5,24 ± 1,74	3,06 ± 0,34	100	76,5	5,00 ± 0,20	9,74 ± 1,84	11,95 ± 1,39	58,8
Вальпроат натрію	6	300	7,62 ± 0,98	1,67 ± 0,65	100	66,7	3,67 ± 0,16*	2,43 ± 2,02*	–	0**
78216	6	100	3,51 ± 0,63	2,00 ± 0,32*	100	100**	5,50 ± 0,32	9,05 ± 3,85	14,62 ± 4,63	83,3
78222	6	100	4,88 ± 1,25	1,83 ± 0,32*	100	100**	5,67 ± 0,32	4,57 ± 1,65*	10,01 ± 2,09	83,3
78236	6	100	5,84 ± 1,31	2,67 ± 0,65	100	100**	5,67 ± 0,32	9,59 ± 3,17	15,80 ± 4,15	83,3
78288	6	100	5,29 ± 0,93	1,67 ± 0,48*	100	100**	6,00 ± 0*	1,39 ± 0,85*	6,68 ± 0,67*	100**
78301	6	100	5,70 ± 1,61	1,67 ± 0,48*	100	100**	6,00 ± 0*	2,21 ± 1,60*	7,92 ± 1,85	100**
78343	6	100	7,36 ± 1,61	1,83 ± 0,16*	100	100**	6,00 ± 0*	6,75 ± 1,46	14,10 ± 2,67	100**
78346	6	100	4,13 ± 2,07	2,67 ± 0,64	100	100**	6,00 ± 0*	7,20 ± 2,70	11,33 ± 3,17	100**

фенільного та фенілпіперазинового радикала.

Чітка закономірність зв'язку «структура-дія» простежується й для третьої сполуки-лідера 78342, яка містить 2-хлорофенільний замісник у 1 положенні та N-метилфенілацетамідний фрагмент. Введення метильного радикала в амідний залишок сприяє зменшенню кількості судомних нападів (сполуки 78342 та 78237) і навіть зменшенню летальності піддослідних тварин (сполука 78342). Прояви протисудомної дії спостерігаються й в інших структурних аналогів – N-метилзаміщених та незаміщених амідах (78217 та 78274; 78298). Це можна пояснити збільшенням ліпофільності молекули при введенні алкільного радикала, що сприяє проникненню речовини крізь гематоенцефалічний бар'єр. Зважаючи на вищезазначене, слід вважати доцільним введення N-метилфенілацетаміду для посилення протисудомної дії похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону.

Для прояву антиконвульсивної активності важливим фармакофором є бензольний фрагмент: бензилзаміщені похідні піразолопіримідину продемонстрували тенденцію до антиконвульсивної дії (сполуки 78304, 78347), проте сполука 78227 не виявила впливу на судомний синдром. Протисудомна дія залежить і від замісника в арильного залишку в першому положенні: активність зменшується в порядку 4-OMe > 2-Cl > Br.

Введення оксовмісних гетероциклів до структури піразолопіримідинів є недоцільним. Сполуки 78300 та 78603, які містять залишок 1,3-бензодіоксолу, не виявили суттєвої протисудомної дії (остання хоча й зменшувала кількість нападів на 1 тварину, проте сприяла почастішанню найтяжчих тонічних судом), а сполуки 78222 та 78301 з залишком 2,3-дигідро-1,4-бензодіоксину мають проконвульсивні властивості.

Отже, результати дослідження свідчать про доцільність поглибленого вивчення протисудомної активності субстанцій-лідерів: дослідження механізму та спектра антиконвульсивної дії на моделях судом з різним патогенезом, супутніх видів фармакологічної активності, дозозалежності протисудомного ефекту, безпечності тощо. Результати також висвітлюють перспективні напрями цілеспрямованого створення оригінальних антиконвульсантів – похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону.

Висновки

1. На моделі коразолових судом у мишей проведено скринінгове дослідження впливу на судомний синдром 35 нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, для яких згідно з результатами PASS-прогнозу передбачалась антиконвульсивна активність з імовірністю 0,501–0,592. Виявлено 3 сполуки-лідери з виразною протисудомною дією, 16 сполук з помірними антиконвульсивними властивостями, 9 сполук, індиферентних щодо модельних судом, і 7 сполук з властивостями проконвульсантів.
2. Лідерами за протисудомною активністю є сполуки під шифрами 78303 (1-(4-метоксифеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он), 78342 (2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід) у дозі 100 мг/кг та 78553 (1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піридин-4-он) у дозі 50 мг/кг.
3. Результати скринінгу дозволяють виявити закономірності впливу структури синтезованих речовин на їхню протисудомну активність та підтверджують доцільність поглибленого вивчення протисудомної активності субстанцій-лідерів.

1. England M. J. Epilepsy Across the Spectrum: Promoting Health and Understanding / M. J. England, C. T. Liverman, A. M. Schultz. – The National Academies Press, 2012. – 537 p.
2. Всемирная организация здравоохранения 2015 [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/ru/>
3. Харчук С. М. Эпилепсия в Украине. Значимые даты и события / С. М. Харчук. – Здоров'я України, 2012. – 58 с.

4. The Epilepsies. Clinical Guidelines and Evidence Review for the Epilepsies: diagnosis and management in adults and children in primary and secondary care / T. Stokes, E. J. Shaw, A. Juarez-Garcia [et al.]. – London : Royal College of General Practitioners, 2004. – 347 p.
5. Mattson R. H. Drug treatment of partial epilepsy / R. H. Mattson // Adv. Neurol. – 1992. – V. 57. – P. 643–650.
6. Meador K. J. Newer anticonvulsants: Dosing strategies and cognition in treating patients with mood disorders and epilepsy / K. J. Meador // Clin. Psychiatry J. – 2003. – V. 64. – P. 30–34.
7. Stefan H. Novel anticonvulsant drugs / H. Stefan, T. Feuerstein // Pharmacol Ther. J. – 2007. – V. 113, № 1. – P. 165–183.
8. Synthesis of 5-Alkoxythieno[2,3-e][1,2,4]triazolo[4,3-c]pyrimidine. Derivatives and Evaluation of Their Anticonvulsant Activities / W. Shi-Ben, P. Guang-Chun, Zh. Hong-Jian, Q. Zhe-Shan // Molecules J. – 2015. – V. 22, № 1. – P. 6827–6843.
9. Synthesis and evaluation of anticonvulsant and antidepressant activities of 5-alkoxytetrazolo[1,5-c]thieno[2,3-e]pyrimidine derivatives / S. B. Wang, X. Q. Deng, Y. S. Zheng [et al.] // Eur. Med. Chem. J. – 2012. – V. 56, № 1. – P. 139–144.
10. Synthesis and alkylation of 1-aryl-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ones as possible anticonvulsant agents / A. I. Severina, V. A. Georgiyants, S. Yu. Shtrygol, D. P. Kavraiskiy // Der Pharma Chemica J. – 2015. – V. 7, № 11. – P. 43–48.
11. Порошков В. В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ / В. В. Порошков [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ibmn.msk.ru/PASS>
12. Головенко М. Я. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів : метод. рекомендації / М. Я. Головенко, Л. О. Громов. – Київ : ВД «Авіцена», 2003. – 26 с.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая ; Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева [и др.]. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
14. Штрыголь С. Ю. Модуляция фармакологических эффектов при различных солевых режимах : монография / С. Ю. Штрыголь. – Харьков : Авеста-ВЛТ, 2007. – 360 с.

Д. П. Каврайський, С. Ю. Штрыголь, В. А. Георгіянц, Г. І. Северіна
Скринінгове дослідження нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону на протисудомну активність

Мета дослідження – з'ясувати вплив на судомний синдром 35 оригінальних похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4-ону, які згідно з PASS-прогнозом характеризуються високою ймовірністю антиконвульсивної дії. Використано базову скринінгову модель коразолових судом у мишей. Сполуки (50–100 мг/кг) та референс-препарат вальпроат натрію (300 мг/кг) вводили внутрішньошлунково за 30 хв до підшкірного введення коразолу.

Виявлено 3 сполуки-лідери з виразною протисудомною дією, 16 сполук з помірними антиконвульсивними властивостями, 9 сполук, індивідуальних щодо модельних судом, і 7 сполук з властивостями проконвульсантів. Лідерами за протисудомною активністю є сполуки під шифрами 78303 (1-(4-метоксифеніл)-5-[2-оксо-2-(4-фенілпіперазин-1-іл)етил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-он), 78342 (2-[1-(2-хлорофеніл)-4-оксо-1,4-дигідро-5Н-піразоло[3,4-d]піримідин-5-іл]-N-метил-N-фенілацетамід) та 78553 (1-(4-метоксифеніл)-5-[2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил]-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-он). Вони значно зменшували летальність, кількість та/або тяжкість судомних нападів та збільшували їхній латентний період. Шістнадцять сполук з тенденцією до антиконвульсивної дії достовірно поліпшували від 1 до 3 параметрів модельних судом, але не впливали на летальність. Результати скринінгу дозволили виявити закономірності впливу структури синтезованих речовин на протисудомну активність. Виразному антиконвульсивному ефекту сприяють карбонільна група в 4 положенні та ацетамідний фрагмент, залишок феніл- або 4-метоксифеніл-піперазину та 4-метоксифенільний радикал у 1 положенні (сполуки 78303, 78553), а також 2-хлорофенільний замісник у 1 положенні та N-метилфенілацетамідний фрагмент (сполука 78342). Введення оксовмісних гетероциклів до структури піразолопіримідинів є недоцільним, оскільки послаблює протисудомний ефект та навіть зумовлює проконвульсивні властивості.

Ключові слова: фармакологічний скринінг, протисудомна активність, похідні піразолопіримідину, PASS-прогноз, коразол-індуковані судоми

Д. П. Каврайский, С. Ю. Штрыголь, В. А. Георгианц, А. И. Северина
Скрининговое исследование новых производных пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-она на противосудорожную активность

Цель исследования – выяснить влияние на судорожный синдром 35 оригинальных производных пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-она, которые в соответствии с PASS-прогнозом характеризуются высокой вероятностью антиконвульсивного действия. Использована базовая скрининговая модель коразоловых судорог у мышей. Вещества (50–100 мг/кг) и референс-препарат вальпроат натрия (300 мг/кг) вводили внутривенно за 30 мин до подкожного введения коразола.

Выявлены 3 соединения-лидеры с выраженным противосудорожным действием, 16 веществ с умеренными антиконвульсивными свойствами, 9 веществ, индифферентных относительно модельных судорог, и 7 соединений со свойствами проконвульсантов. Лидерами по противосудорожной активности являются вещества под шифрами 78303 (1-(4-метоксифенил)-5-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-д]пиридин-4-он), 78342 (2-[1-(2-хлорофенил)-4-оксо-1,4-дигидро-5Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-5-ил]-N-метил-N-фенилацетамид) и 78553 (1-(4-метоксифенил)-5-{2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксоэтил}-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-д]пиридин-4-он). Они значительно уменьшали летальность, количество и/или тяжесть судорожных приступов и увеличивали их латентный период. Шестнадцать веществ с тенденцией к антиконвульсивному действию достоверно улучшали от 1 до 3 параметров модельных судорог, но не влияли на летальность. Результаты скрининга позволили выявить закономерности влияния структуры синтезированных веществ на противосудорожную активность. Выраженному антиконвульсивному эффекту способствуют карбонильная группа в 4 положении и ацетамидный фрагмент, остаток фенил- или 4-метоксифенил-пиперазина и 4-метоксифенильный радикал в 1 положении (соединения 78303, 78553), а также 2-хлорофенильный заместитель в 1 положении и N-метилфенилацетамидный фрагмент (вещество 78342). Введение оксосодержащих гетероциклов в структуру пиразолопиримидинов нецелесообразно, поскольку ослабляет противосудорожный эффект и даже обуславливает проконвульсивные свойства.

Ключевые слова: фармакологический скрининг, противосудорожная активность, производные пиразолопиримидина, PASS-прогноз, коразол-индуцированные судороги

D. P. Kavraiskiy, S. Yu. Shtrygol', V. A. Georgiyants, A. I. Severina
Screening study of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-one derivatives
for anticonvulsant activity

The aim of the research is to establish the efficacy of 35 novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-one derivatives on experimental models of seizures. In accordance with the PASS program prediction, these substances are characterized by high probability of anticonvulsant action. A basic screening model of pentylenetetrazol-induced seizures in mice was used in the study. The investigated compounds (50–100 mg/kg) and a reference drug sodium valproate (300 mg/kg) were administered intragastrically 30 min before subcutaneous injection of convulsant agent.

The results have allowed to identify 3 leaders with a clear anticonvulsant effect, 16 compounds with moderate anticonvulsive properties, 9 indifferent compounds, and 7 compounds with proconvulsive properties. According to anticonvulsant activity, the leaders were defined, namely the compounds under the codes 78303 (1-(4-methoxyphenyl)-5-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyridine-4-one), 78342 (2-[1-(2-chlorophenyl)-4-oxo-1,4-dihydro-5H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-5-yl]-N-methyl-N-phenylacetamide) and 78553 (1-(4-methoxyphenyl)-5-{2-[4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-yl]-2-oxoethyl}-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyridine-4-one). They significantly reduced mortality, the number of seizures and/or their severity and prolonged the latency period. 16 compounds with a tendency to anticonvulsive action significantly improved from 1 to 3 parameters of pentylenetetrazol-induced seizures but had no effect on lethality rate. The results of screening revealed the relationship between the structure of compounds and their anticonvulsant activity. Carbonyl group at position 4 and acetamide group, phenyl- or 4-methoxyphenyl-piperazine functional group, 4-methoxyphenyl radical at position 1 (compounds 78303, 78553), and 2-chlorophenyl substituent at position 1 with N-methylphenyl acetamide residue (compound 78342) contributed to pronounced anticonvulsant activity. Incorporation of heterocyclic substituents containing oxy-group into pyrazolopyrimidine structures is not expedient, because it causes the decrease in anticonvulsant effect and even the appearance of proconvulsive action.

Key words: pharmacological screening, anticonvulsant activity, pyrazolopyrimidine derivatives, PASS, pentylenetetrazol-induced seizures

Надійшла: 1 квітня 2016 р.

Контактна особа: Каврайський Дмитро Павлович, аспірант, кафедра фармакології та лікарської токсикології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: kavraiskiy@gmail.com

О. І. Альчук

Вплив 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти на функціональний стан печінки щурів за умов щоденного фізичного навантаження

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Ключові слова: актопротектори, функціональний стан печінки, фізичне навантаження, 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойна кислота, 2-етилтіобензімідазолу гідробромід

Високий темп життя сучасної людини незмінно призводить до зниження, а іноді й до виснаження фізичних та психічних сил [1]. Незбалансована рухова активність, під якою розуміють як надмірні м'язові навантаження, так і їхнє тривале обмеження, запускає каскад метаболічних реакцій, дія яких характеризується не тільки підвищенням функціональної активності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, а й зривом різноманітних функцій печінки, що забезпечують та підтримують високу працездатність [2–4]. Доцільність використання актопротекторів для корекції оксидативного стресу та гіпоксії, як основних патогенетичних ланок розвитку втоми, не викликає сумніву, адже вони підвищують працездатність та фізичну витривалість, розширюють функціональні можливості здорової людини не тільки в нормальних умовах, а й ситуаціях, обумовлених напругою та зривом адаптаційних процесів [1, 5, 6]. З числа лікарських засобів, що характеризуються потужною актопротекторною дією, на фармацевтичному ринку представлений 2-етилтіобензімідазолу гідробромід (бемітил, метапрот), який, на жаль, не зареєстрований в Україні, а лише сертифікований як харчова добавка під торговою назвою «Антихот» [6, 7]. Тому науковцями ведуться розробки нових безпечних, нетоксичних лікарських засобів з властивостями актопротекторів.

У цьому плані привертають увагу нові похідні 4-оксо(аміно-) хіназоліну,

яким за даними літератури притаманна антистресорна, церебропротекторна, антиоксидантна дії [8, 9], що добре узгоджується з патогенезом розвитку фізичної та розумової втоми.

У попередніх дослідженнях нами встановлено, що серед похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну найактивнішим виявилось похідне 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти (сполука ПК-66), яка подібно до 2-етилтіобензімідазолу гідроброміду (2-ЕТБІ) здатна підвищувати фізичну працездатність щурів як за нормальних, так ускладнених умов перебування (гіпотермія, гіпоксія, гіпокінезія) [10, 11]. Ураховуючи те, що сприятлива дія референс-препарату на метаболічні зміни при фізичному навантаженні опосередкована й здійснюється за рахунок неспецифічного посилення синтезу протеїну та активації геному клітин [7], становило інтерес дослідити вплив сполуки ПК-66 порівняно з 2-ЕТБІ на функціональний стан печінки, яка бере участь у реалізації факторів довгострокової адаптації, що є одним з головних шляхів оптимізації працездатності як за нормальних, так і несприятливих умов зовнішнього середовища [3, 10].

Мета дослідження – охарактеризувати вплив 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти (сполуки ПК-66) та 2-ЕТБІ на метаболічні процеси в печінці щурів за умов щоденного фізичного навантаження.

Матеріали та методи. Дослідження виконано на 56 самцях щурів масою 180–200 г, яких було розподілено на 4 групи. I група – інтактні щури; II – контрольні щури, яким створювали умови щоденного фізичного навантаження, без корекції; тварини III групи

щоденно (15 днів) отримували сполуку ПК-66 у дозі 3,0 мг/кг внутрішньо-шлунково, що становить його ЕД₅₀ за плавальним тестом [12]; щури IV групи отримували впродовж 15 діб субстанцію 2-ЕТБІ у дозі 31,0 мг/кг внутрішньоочеревинно, що становить його ЕД₅₀ за плавальним тестом [12]. Речовини вводили тваринам за 60 хв до фізичного навантаження.

Для вивчення метаболічних процесів у печінці щурів за умов динамічної рухової активності було обрано модель бігу в третбані. Саме таке навантаження відображає метаболічні зміни та адаптаційні процеси, що відбуваються в організмі при фізичній активності як низької, так і високої інтенсивності [13].

Щурів II, III та IV груп протягом 14 днів тренували бігом у третбані (по 10 хв, зі швидкістю руху бігової доріжки 30 м/хв та кутом нахилу – 10°). На 15 добу експерименту в половини тварин проводили забір біологічного матеріалу, у решти – реєстрували тривалість бігу до повної втоми (швидкість руху бігової доріжки становила 42 м/хв) [14].

Тварин інтактної, контрольної та досліджуваних груп виводили з досліду цервікальною дислокацією під легким ефірним наркозом на 15 добу експерименту, через 6–8 год після останнього введення досліджуваних речовин. У гомогенаті печінки визначали концентрацію глікогену [15], уміст РНК та ДНК [16], малонового діальдегіду (МДА) [17] та відновленого глутатіону (ВГ) [18].

Усі експерименти на тваринах проводили відповідно до Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах. Обробку цифрових даних виконували за допомогою стандартних пакетів статистичного аналізу MicrosoftExcel 2000 та Original (one-way ANOVA Test) з обчисленням середньої величини $\bar{M}$, помилки середньої арифметичної m , критерію вірогідності t . Розходження між порівнюваними показниками визнавали достовірними, якщо значення ймовірності було більше, або дорівнювало 95 % ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення. Зміни метаболічних показників у печінці під впливом сполуки ПК-66 та 2-ЕТБІ надано в таблиці.

Із даних, наведених у таблиці, видно, що щоденне навантаження щурів бігом протягом 15 днів експерименту викликало значні зрушення метаболічних процесів, які спостерігали в печінці контрольних тварин. Оцінюючи протеїн-синтезуючу функцію печінки, як одного з механізмів формування адаптаційних змін, у контрольних щурів на тлі тренування бігом мала місце тенденція ($p > 0,05$) до підвищення вмісту ДНК та РНК у печінці. Це може бути, як і певне зростання рівня глікогену, свідченням формування адаптаційних процесів в організмі у відповідь на тривале фізичне навантаження. Під впливом ПК-66 та 2-ЕТБІ рівень РНК у печінці тренуваних тварин вірогідно збільшився відповідно на 28 та 31 %, а ДНК

Таблиця

Показники метаболічних процесів у гомогенаті печінки щурів на фоні щоденного тренування бігом та впливу сполуки ПК-66 та 2-ЕТБІ, $M \pm m$, $n = 7$

Показник	Інтактні тварини	Щури після фізичного навантаження		
		Без корекції (контроль)	ПК-66 (3 мг/кг)	2-ЕТБІ (31 мг/кг)
РНК, мкг/мл	14,2 ± 1,2	16,1 ± 1,4	20,6 ± 1,8**	21,1 ± 1,7**
ДНК, мкг/мл	64,4 ± 2,3	72,3 ± 3,6	86,6 ± 5,1**	89,3 ± 5,4**
Глікоген, мг/г тканини	52,3 ± 3,1	64,4 ± 6,2	118,2 ± 8,6**	109,4 ± 9,3**
Малоновий діальдегід, ммоль/г тканини	79,6 ± 4,4	116,3 ± 8,5#	94,5 ± 4,7**	89,8 ± 6,2*
Відновлений глутатіон, ммоль/г тканини	6,94 ± 0,54	4,12 ± 0,36#	5,92 ± 0,46*	6,43 ± 0,51*

Примітка. * $p \leq 0,05$ відносно інтактних тварин, ** $p \leq 0,05$ відносно контрольних тварин.

відповідно на 18,6 та 23,5 % відносно контролю. При цьому рівень обох показників протеїнсинтезу на фоні досліджуваних сполук вірогідно перевершував показники інтактних тварин. Такі зміни дають змогу припустити, що можливий механізм дії сполуки ПК-66 аналогічний такому еталонного актопротектора і полягає в посиленні синтезу білків – ферментів, які забезпечують позитивні метаболічні зміни при інтенсивних фізичних навантаженнях.

Інтенсифікація метаболічних процесів під впливом досліджуваних сполук сприяла досить значному збільшенню вмісту глікогену в печінці. Так рівень глікогену на тлі введення сполуки ПК-66 та 2-ЕТБІ вірогідно зріс на 83 та 69 % відповідно порівняно з контролем. За даними літератури, такі зміни метаболічних процесів можуть бути ознакою підвищення ефективності тренувального процесу, для якого характерні зростання вуглеводних запасів в органах та посилення притаманних для адаптації змін [19, 20].

Характеризуючи процеси ПОЛ та антиоксидантного захисту в зазначених умовах експерименту, слід відмітити вірогідне збільшення в печінці контрольних тварин умісту вторинних продуктів ПОЛ – МДА на 45,7 % відносно показника інтактної групи. На цьому фоні рівень ВГ як однієї з найактивніших складових системи антиоксидантного захисту в печінці знижувався на 40,6 % порівняно з інтактною групою. Такі зміни підтверджують дані літератури, які свідчать, що фізична діяльність, незалежно від інтенсивності, супроводжується активацією ПОЛ, що є універсальним механізмом реагування організму на стресові фактори [4]. Як показало наше дослідження, сполука ПК-66 подібно до референс-препарату вірогідно знижувала в печінці щурів рівень МДА на 19 та 23 % відповідно порівняно з контролем. Рівень ВГ, який відіграє важливу роль у захисті організму від ушкоджуючої дії ПОЛ, навпаки зріс на тлі вказаних речовин на 44 та 56 % відповідно. Зазначені зміни рівнів МДА та ВГ під впливом досліджуваних сполук на фоні фізичного наванта-

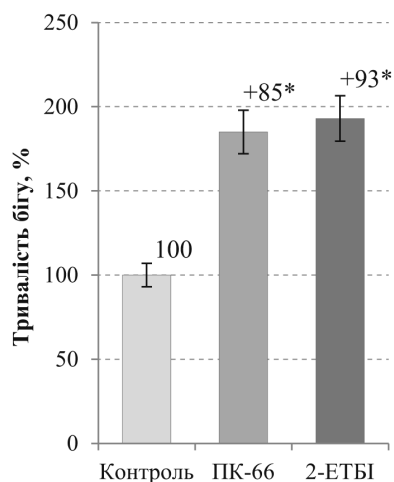


Рис. 1. Вплив ПК-66 та 2-ЕТБІ на тривалість бігу щурів у третбані до повної втоми на 15 добу експерименту
Примітка. * $p \leq 0,05$ відносно контролю.

ження можна розцінити як їхню здатність блокувати посилення ліпопероксидації, як одного з лімітуючих факторів фізичної активності [21, 22], та підвищувати адаптаційні можливості організму за умов виснажуючих фізичних навантажень.

Позитивна перебудова метаболічних процесів у печінці щурів у разі щоденного інтенсивного фізичного навантаження на тлі введення ПК-66 та 2-ЕТБІ корелювала з підвищенням фізичної працездатності щурів під впливом зазначених сполук на 15 добу тренувань (рисунок).

Про це свідчило вірогідне зростання тривалості бігу щурів у третбані наприкінці експерименту на 85 та 93 % відповідно відносно контролю (рис. 1). При цьому за ефективністю сполука ПК-66 співставлялася з референс-препаратом, але викликала аналогічний за величиною ефект у дозі, в 10 разів меншій.

Висновки

Таким чином, результати проведеного дослідження показали, що курсове введення в організм щурів 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (3,0 мг/кг, в/ш), як і 2-ЕТБІ (31,0 мг/кг, в/о), на тлі щоденного тренування бігом сприяє оптимізації метаболічних

процесів та прискоренню адаптативних змін у печінці, про що свідчить вірогідне збільшення тривалості бігу тварин у третбані на 15 добу експерименту.

Посилення неспецифічного протеїнсинтезу, накопичення глікогену в печінці та стабілізація прооксидантно-антиоксидантного балансу, що відбулися на фоні введення досліджуваної сполуки, є важливими ланками механізмів реалізації факторів довгострокової адаптації як одного з головних шляхів підвищення працездатності організму за нормальних і

несприятливих умов зовнішнього середовища.

Позитивні зміни функціонального стану печінки під впливом сполуки ПК-66, виявлені в цьому дослідженні, а також наявні в неї фармакологічні ефекти (антиамнестичний, церебропротекторний, стреспротекторний) є основою для подальшого вивчення впливу зазначеної сполуки на функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, діяльність якої зумовлює пристосування організму до екстремальних факторів навколишнього середовища.

1. Малахов В. А. Актопротекторы / В. А. Малахов, Е. С. Ромелашвили // Неврология. – 2011. – № 4 (360). – С. 39–42.
2. Стельникова И. Г. Надпочечники при адаптации организма к двигательным нагрузкам и гипокинезии (экспериментально-морфологическое исследование) / И. Г. Стельникова // Международный эндокринологический журнал. – 2010. – № 5 (29). – С. 39–43.
3. Дрель В. Ф. Гістоструктура печінки на 30 добу після щоденного фізичного навантаження на тлі токсичного гепатиту / В. Ф. Дрель, О. А. Виноградов // Український морфологічний альманах. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 49–51.
4. Гунина Л. М. Окислительный стресс и адаптация: метаболические аспекты влияния физических нагрузок / Л. М. Гунина // Наука в олимпийском спорте. – 2013. – № 4. – С. 19–25.
5. Петунов С. Г. Оценка физической работоспособности при интенсивной физической нагрузке в моделях на лабораторных животных / С. Г. Петунов, Д. В. Бобков // Медико-биологические аспекты обеспечения химической безопасности Российской Федерации. Сб. тр. Всеросс. симпозиума, посвященного 50-летию со дня основания ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России: тез. док. – Москва, 2012. – С. 101–102.
6. Сімонова І. В. Актопротектори: фармакологія та фармакотерапія / І. В. Сімонова, В. Д. Лук'яничук // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 2 (43). – С. 14–26.
7. Oliynyk S. Impact of the dietary supplement «Antihot» on the parameters of general endurance and antioxidant status of athlete's body / S. Oliynyk, I. Koval, N. Vdovenko // Sportomokslas. – 2009. – V. 55. – P. 28–33.
8. Скринінг церебропротекторної дії серед нових похідних хіназолону-4 при експериментальній ішемії головного мозку / Г. І. Степанюк, О. А. Ходаківський, І. Ф. Беленічев [та ін.] // Вестн. неотложной и восстановительной медицины. – 2008. – № 1. – С. 115–117.
9. Степанюк Г. І. Скринінг (АГ) активності у похідних хіназолону-4 в умовах гіпоксії замкнутого простору (ГЗП) / Г. І. Степанюк, О. А. Ходаківський // Досягнення та перспективи клінічної фармакології : V Укр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю з клініч. фармакології, 12–13 травня 2008 р.: тези доп. – Вінниця, 2008. – С. 252–253.
10. Альчук О. І. Вплив 4-[оксо-3(4Н)-хіназолін] бензойної кислоти на фізичну витривалість в умовах гіпокінезії / О. І. Альчук, І. Г. Степанюк // Вісн. Вінниц. мед. ун-ту. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 395–398.
11. Степанюк Г. І. Динаміка фізичної витривалості в умовах гіпоксії під впливом 4-[оксо-3(4Н)-хіназолін] бензойної кислоти в порівнянні з бемітилом / Г. І. Степанюк, О. І. Альчук // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1–2 (14–15). – С. 70–74.
12. Скринінг актопротекторної активності серед похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну / Г. І. Степанюк, О. І. Альчук, О. К. Шевчук [та ін.] // Здобутки клініч. та експериментальної медицини. – 2009. – № 1. – С. 85–88.
13. Фармакологическая коррекция утомления / Ю. Г. Бобков, В. М. Виноградов, В. Ф. Катков [и др.]. – Москва : Медицина, 1984. – 208 с.
14. Експериментальне вивчення впливу нового адаптивного засобу капсул «Поллентар» на витривалість щурів / Л. В. Яковлева, О. Я. Міщенко, М. В. Лелека // Медична хімія. – 2002. – № 4. – С. 48–51.
15. Лабораторные методы исследования в клинике; под. ред. В. В. Меншикова. – Москва : Медицина, 1987. – 253 с.
16. Посібник до лабораторних та семінарських занять з біологічної хімії : навч.-метод. посіб. для вузів / Л. М. Воронина, В. Ф. Денесенко, В. М. Кравченко, Т. С. Сахарова. – Харків : Основа, 1996. – 432 с.

17. Самойлов Н. Н. Изучение термопротекторной активности новых физиологически совместимых антиоксидантов / Н. Н. Самойлов, И. В. Ильина // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 12. – С. 82–84.
18. Круглікова Г. О. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки після введення селеніту натрію / Г. О. Круглікова, І. М. Штурман // Укр. біохіміч. журн. – 1976. – Т. 48, № 2. – С. 223–228.
19. Кургалюк Н. Зміни процесів переамінування, окислення та медіаторного балансу у печінці тварин з різною резистентністю до гіпоксії у процесі виконання динамічної роботи за умов введення альфа-кетоглутарату натрію / Н. Кургалюк, О. Вернюк, М. Гальків // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біологія – 2000. – Вип. 25. – С.94–101.
20. Мохан Р. Биохимия мышечной деятельности и физической тренировки / Р. Мохан, М. Глессон, П. Л. Гринхафф. – Киев : Олимпийская л-ра, 2001. – 29 с.
21. Львовская Е. И. Уровень тревожности и показатели липидной пероксидации у спортсменов, специализирующихся в циклических и ациклических видах / Е. И. Львовская, М. В. Тренева // Спортивная медицина. – 2009. – № 1/2. – С. 65–68.
22. Сейфулла Р. Д. Фармакологическая коррекция факторов, лимитирующих работоспособность человека / Р. Д. Сейфулла // Экспериментальная и клинич. фармакология. – 1998. – Т. 61, № 1. – С. 3–12.

О. І. Альчук

Вплив 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти на функціональний стан печінки щурів за умов щоденного фізичного навантаження

Розробка нових безпечних лікарських засобів, що мають властивості актопротекторів, є актуальним завданням сучасної фармакології. Серед нових похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну найбільшу актопротекторну дію виявлено в похідного 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти (сполуки ПК-66), яка подібно 2-етилтіобензімідазолу гідроброміду (2-ЕТБІ) здатна підвищувати фізичну працездатність щурів як за нормальних, так і ускладнених умов перебування (гіпо- та гіпертермія, гіпоксія, гіпокінезія).

Мета дослідження – охарактеризувати вплив 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойної кислоти (сполуки ПК-66) та 2-ЕТБІ на метаболічні процеси в печінці щурів за умов щоденного фізичного навантаження.

Встановлено, що курсове 15-денне введення сполуки ПК-66 (3,0 мг/кг, внутрішньошлунково) подібно до 2-ЕТБІ (31,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно) щурам зі щоденним фізичним навантаженням сприяє оптимізації метаболічних процесів у печінці та вірогідному збільшенню тривалості бігу тварин наприкінці експерименту. На це вказувало вірогідне підвищення рівня РНК та ДНК у печінці тренуваних бігом щурів порівняно з контролем, при цьому рівень обох показників протеїнсинтезу на фоні досліджуваних сполук вірогідно перевершував показники інтактних тварин. Інтенсифікація метаболічних процесів під впливом досліджуваних сполук сприяла значному збільшенню вмісту глікогену та відновленню балансу прооксидантно-антиоксидантної системи в печінці стресованих щурів.

Позитивна перебудова метаболічних процесів у печінці щурів при щоденному інтенсивному фізичному навантаженні на тлі введення ПК-66 та 2-ЕТБІ обумовила вірогідне підвищення фізичної працездатності щурів: під впливом зазначених сполук – на 15 добу тренувань тривалість бігу зросла на 85 та 93 % відповідно.

Проведене дослідження свідчить, що сполука ПК-66 у такій самій мірі, як і еталонний актопротектор, здатна розширювати функціональні можливості та прискорювати адаптативні процеси в печінці, які лежать в основі розвитку довгострокової адаптації організму і є одним з головних шляхів оптимізації працездатності як за нормальних, так і несприятливих умов зовнішнього середовища.

Ключові слова: актопротектори, функціональний стан печінки, фізичне навантаження, 4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл]бензойна кислота, 2-етилтіобензімідазолу гідробромід

А. И. Альчук

Влияние 4-[4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил]бензойной кислоты на функциональное состояние печени крыс в условиях ежедневной физической нагрузки

Разработка новых безопасных лекарственных средств, имеющих свойства актопротекторов, является актуальным заданием современной фармакологии. Среди новых производных 4-оксо(амино-) хиназолина наибольшее актопротекторное действие выявлено у 4-[4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил]бензойной кислоты (соединения ПК-66), которое аналогично 2-этилтиобензимидазолу гидробромиду (2-ЭТБИ) способно повышать физическую работоспособность крыс как в нормальных, так и экстремальных условиях пребывания (гипо- и гипертермия, гипоксия, гипокинезия).

Цель исследования – охарактеризовать влияние соединения ПК-66 и 2-этилтиобензимидазола гидробромид на метаболические процессы в печени крыс в условиях ежедневной физической нагрузки.

Установлено, что курсовое 15-дневное введение ПК-66 (3,0 мг/кг, внутривенно) подобно 2-ЭТБИ (31,0 мг/кг, внутривенно) стрессированным крысам способствует оптимизации метаболических процессов в печени и достоверному увеличению длительности бега животных в тротбане. На это указывает достоверное повышение уровня РНК и ДНК в печени тренированных бегом крыс по сравнению с контролем. При этом уровень показателей протеинсинтеза на фоне исследуемых веществ превосходил показатели интактных крыс. Интенсификация метаболических процессов под влиянием исследуемых веществ способствовала увеличению содержания гликогена и восстановлению баланса прооксидантно-антиоксидантной системы в печени стрессированных крыс.

Положительная перестройка метаболических процессов в печени крыс при ежедневной интенсивной физической нагрузке на фоне введения ПК-66 и 2-ЭТБИ обусловила достоверное повышение физической работоспособности животных: под влиянием исследуемых соединений на 15 день тренировок длительность бега увеличилась на 85 и 93 % соответственно.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что соединение ПК-66 в такой же степени, как и эталонный актопротектор, способно расширять функциональные возможности и ускорять адаптационные процессы в печени. Это лежит в основе развития длительной адаптации организма и является одним из главных путей оптимизации работоспособности как при нормальных, так и неблагоприятных условиях внешней среды.

Ключевые слова: актопротекторы, функциональное состояние печени, физическая нагрузка, 4-[4-оксо-4Н-хинозолин-3-ил]бензойная кислота, 2-этилтиобензимидазола гидробромид

O. I. Alchuk

The effect of 4-[4-oxo-4N-quinazoline-3-il] benzoic acid on the functional condition of the rats' liver under daily physical strain

The aim of the research was to define the influence of 4-[4-oxo-4N-quinazoline-3-il] benzoic acid (compound PK-66) and 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide (2-ETBI) on the metabolite processes in the rats' liver under the conditions of the daily physical strain.

It was ascertained, that course administration (15 days) to the stressed rats of the compound PK-66 during 15 days similar to 2-ETBI contributed to the optimization of the metabolite processes in the liver and to significant increase the duration of animals running in treadmill at the end of research. It was pointed by the valid increase of the RNA and DNA levels in the liver of the trained rats as to the control animals, and both these indicators of protein synthesis level against the background of the researched compounds were superior to those of intact animals.

The intensification of metabolite processes under the influence of the researched compounds contributed to an increase in glycogen content and restoring the balance of prooxidant and antioxidant system in the liver of the stressed rats.

The positive reconstitution of the metabolic processes in the rats' liver under the conditions of the intensive physical strain and course administration of the compound PK-66 and 2-ETBI have caused an increasing of the rats' physical efficiency: the duration of animals running in treadmill at the end of experiment (15 days) increased by 85 % and by 93 % relatively.

The results obtained show that the compound PK-66 as well as standard actoprotector 2-ETBI is capable to expand the functional abilities and boost adaptive processes in the liver, which underlie the development of the long timed adaptation of the organism and is one of the main ways of optimization the work capacity in both normal and unfavourable environmental conditions.

Key words: actoprotector, functional condition of the liver, physical strain, 4-[4-oxo-4N-quinazoline-3-il] benzoic acid, 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide

Надійшла: 16 лютого 2016 р.

Контактна особа: Альчук Олександра Іванівна, кандидат медичних наук, доцент, кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: + 38 0 50 461 08 16.
Електронна пошта: alchuk080481@gmail.com

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Дослідження шлункової секреції в щурів з ад'ювантним артритом на тлі застосування ібупрофену та його комбінації з вінбороном

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Ключові слова: ібупрофен, вінборон, шлункова секреція, кислотність

Останнім часом увагу дослідників все більше привертає проблема пошуку нових шляхів профілактики та лікування побічних ефектів нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ). Це зумовлено, перш за все, тим, що багатогранність патогенезу ушкодження слизової оболонки шлунка (СОШ) при застосуванні НПЗЗ дає можливість корекції різних ланок патогенезу НПЗЗ-індукованої гастропатії та слугує підґрунтям для проведення комплексної терапії або застосування препаратів з політропними фармакологічними ефектами [1–4].

Проблема ульцерогенезу тісно пов'язана зі станом секреторної функції шлунка. Важливе значення при цьому багатьма дослідниками надається оцінці впливу НПЗЗ на секреторні процеси в шлунку, нейрогормональної регуляції та дослідженню активності кислотно-пептичного фактора на тлі зниження захисного бар'єра СОШ [5].

Провідне місце в розвитку гастропатій, індукованих НПЗЗ, відіграє інгібування синтезу простагландинів (ПГ). За фізіологічних умов ПГ притаманний антисекреторний та цитопротективний ефекти, які забезпечують резистентність СОШ до дії подразнюючих і пошкоджуючих факторів, належний рівень мікроциркуляції та, за потреби, репаративні процеси. Антисекреторний ефект ПГ реалізується гальмуванням нічної та стимульованої секреції (зменшення об'єму секрету, кислотності, пептичної активності) [6]. Цитопротективний ефект реалізується дією екзогенного ПГЕ2: гальмування секреції соляної

кислоти, підвищення утворення слизу та збільшення товщини слизового гелю, стимуляція секреції бікарбонатних іонів за рахунок активації натрієвого насосу. Блокування НПЗЗ циклооксигенази першого типу (ЦОГ-1) веде до зменшення утворення слизу та бікарбонатних іонів і збільшення зворотної дифузії іонів водню. Крім того, порушення синтезу простагландину I₂ призводить до порушення капілярного кровообігу та адгезії тромбоцитів, що посилює апоптоз [1, 7, 8]. Все це спричинює послаблення слизово-бікарбонатного бар'єра, зниження клітинної проліферації та фізіологічної регенерації епітелію, погіршення мікроциркуляції та регіонарного кровообігу. Внаслідок вищевказаних процесів вражаються одночасно всі рівні захисту СОШ, відповідно – передепітеліальний, епітеліальний і постепітеліальний [1, 4, 9].

З літературних джерел відомо, що застосування індометацину у хворих на ревматоїдний артрит (РА) призводить до посилення кислотоутворюючої функції шлунка протягом однієї доби, що відповідає зростанню кислотності [5, 6]. Аналогічні дані опубліковані S. Santhosh та співавт., які встановили, що моделювання ібупрофен-індукованої гастропатії в щурів супроводжувалося збільшенням об'єму шлункового соку та його кислотності [10]. Натомість, застосування диклофенаку натрію в середньотерапевтичних дозах (100–150 мг/добу) протягом одного місяця у хворих на РА та остеоартроз (ОА) супроводжується протилежними змінами, а саме зниженням інтрагастральної кислотності [1, 11]. Найявніші суперечливі літературні дані та відсутність загальноприйнятої думки стосовно впливу НПЗЗ на стан секре-

торної функції шлунка, зокрема на рН шлункового соку, стало підставою для проведення дослідження стану шлункової секреції на тлі фармакотерапії ад'ювантного артриту (АА) у щурів.

Серед існуючих НПЗЗ нами було обрано похідне пропіонової кислоти – ібупрофен. Незважаючи на найменшу токсичність препарату серед інших НПЗЗ та мінімальну кількість побічних реакцій при тривалому застосуванні (понад 7–14 днів), навіть ібупрофен у низьких дозах (800 мг/добу) може призвести до ураження шлунково-кишкового тракту, що зумовлено системним пригніченням синтезу ПГ [1, 12].

На жаль, відомі сьогодні шляхи послаблення гастротоксичності НПЗЗ (застосування інгібіторів протонної помпи, H₂-гістаміноблокаторів, синтетичних аналогів ПГ Е1) не здатні задовільнити потреби клініцистів повною мірою.

З метою профілактики розвитку ібупрофен-індукованої гастропатії привертає увагу новий вітчизняний лікарський засіб вінборон, який вигідно поєднує широкий спектр фармакологічних властивостей, високу біологічну активність та низьку токсичність (його LD₅₀ для щурів у разі перорального введення в організм становить 800 мг/кг, у разі внутрішньом'язового – 180 мг/кг) [13, 14].

Вінборону притаманні наступні фармакологічні властивості: спазмолітична, протизапальна, знеболююча (місцева та центральна), протиішемічна, антиоксидантна, антиагрегантна, імуномодуюча, протимікробна, токолітична, кардіопротекторна, церебропротекторна, стимулюючий вплив на мікроциркуляцію. При одночасному застосуванні вінборон здатен посилювати дію спазмолітиків, антиангінальних, гіпотензивних та антиагрегантних препаратів [13–15]. Препарат можна призначати також хворим із порушенням функціонального стану печінки, оскільки йому притаманна гепатопротекторна дія [16].

Мета дослідження – оцінити вплив монотерапії АА ібупрофеном (73 та 218 мг/кг) та його комбінації з вінбороном (11 мг/кг) на шлункову секрецію в щурів. Дати характеристику впливу

зазначених препаратів на рН, загальну кислотність та об'єм шлункового соку, отриманого за методикою Н. Shay [17].

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 42 статевозрілих нелінійних щурах самцях з масою тіла 180–220 г, яких утримували у віварії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова в умовах природної зміни дня та ночі, на стандартному водно-харчовому раціоні (їжа та вода *ad libitum*). Тварини отримували стандартне харчування у вигляді збалансованого гранульованого корму за встановленими нормами [18].

Усі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами проводили в атестованій Головною організацією метрологічної служби Міністерства охорони здоров'я України лабораторії кафедри фармакології ВНМУ ім. М. І. Пирогова (свідоцтво про атестацію від 5 березня 2013 р. № 023/13) з урахуванням вимог належної лабораторної практики (GLP) і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу МОЗ України від 14 грудня 2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», та Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Піддослідні тварини були розподілені на 6 груп: I – інтактні щури (n = 7), II – щури з моделлю АА без лікування (контроль), III (n = 7) та IV (n = 7) – щури з АА, які отримували ібупрофен (73 мг/кг, внутрішньошлунково (в/ш) та 218 мг/кг, в/ш відповідно), V (n = 7) та VI – щури (n = 7), ліковані ібупрофеном (73 мг/кг, в/ш та 218 мг/кг, в/ш відповідно) у комбінації з вінбороном (11 мг/кг, в/ш).

Ібупрофен (ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) вводили

в/ш у вигляді суспензії на 3 % крохмальному слизу в дозі 73 мг/кг, що відповідає дозі для людини 800 мг/добу, яка є оптимальною для досягнення анальгетичного ефекту [1]. Суспензію ібупрофену в дозі 218 мг/кг, що еквівалентно дозі для людини 2400 мг/добу, яка має достатню протизапальну активність та рекомендована для лікування РА [1], вводили двічі на одну добу (109 мг/кг на один прийом). Перерахунок препаратів з дози людини на щурів здійснювали з використанням коефіцієнта видової чутливості за Ю. Р. Риболовлевим [19]. Вінборон (ЗАТ НВЦ «Борщівський ХФЗ», Україна), розчинений у воді *pro injectionibus* (ПАТ «Галичфарм», Україна), вводили за 60 хв до введення ібупрофену, двічі на одну добу.

АА моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванта Фрейнда (Sigma, США; склад: 1 частина ланоліну, 2 частини вазелінової олії та вбита вакцина БЦЖ з розрахунку 5 мг/мл) у задню праву лапу з розрахунку 0,1 мл на одного щура [8]. День введення ад'юванта вважали як «0» день експерименту. Лікування АА проводили з 14 по 28 день шляхом в/ш введення досліджуваних препаратів. Початок введення лікарських засобів відповідав максимальній запальній реакції [18].

Шлункову секрецію досліджували за методикою Shay H. A. на 28 добу експерименту [10, 17, 18, 20]. Протягом 24 год щури були позбавлені доступу до їжі та знаходилися в клітках із ґратчастим дном для усунення явища копрофагії. Після лапаротомії по білій лінії живота (під тіопенталовим наркозом, 35 мг/кг, внутрішньоочеревинно) накладали лігатуру на пілоричний сфінктер шлунка, після чого щурам через орogaстральний зонд одразу вводили останню дозу ібупрофену та пошарово ушивали операційну рану. Контрольні тварини отримували еквівалентну кількість 3 % крохмального слизу. Тварини III–IV груп за 60 хв до введення ібупрофену отримували в/ш еквівалентну кількість води *pro injectionibus*. Вінборон вводили до проведення оперативного втручання.

Через 4 год тварин повторно наркотизували та накладали лігатуру на кардіальний сфінктер. Після евтаназії тварин шляхом цервікальної дислокації проводили екстирпацію шлунка та збір його вмісту в градуйовані конічні пробірки [17].

Інтенсивність шлункової секреції оцінювали за об'ємом шлункового соку в мл/100 г маси тіла тварини та загальною кислотністю. Кислотність (концентрацію вільної HCl) визначали титруванням за методикою Міхаеліса та виражали в титрувальних одиницях (1 ТО = 1 мл 0,1N (0,1 моль) розчину гідроксиду натрію (NaOH), необхідного для нейтралізації шлункового соку, у присутності індикаторів фенолфталеїну та бромтимолового синього) [21].

Визначення величини рН (від'ємний логарифм молярної концентрації в воді іонів водню) шлункового соку здійснювали потенціометричним методом за допомогою чутливих скляних електродів [21].

Цифрові дані наведені у вигляді « $M \pm m$ », де M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка. Гіпотезу про нормальність розподілу показників перевіряли за допомогою W -критерію Шапіро-Уїлка ($W = S^2 / \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})$), рівність дисперсій – за значенням критерію Левіна.

Після підтвердження нормальності розподілу величин визначали вірогідність розбіжностей шляхом дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням параметричного F -критерію Фішера:

$$F = \frac{MS_R}{MS_{\text{ост}}} = \frac{\sum (\bar{y} - \bar{y})^2 / 1}{\sum (y - \bar{y})^2 / (n - 2)}$$

Розрахунки здійснювали за допомогою електронних таблиць Excel програмного забезпечення Microsoft Office-2010. Статистично достовірними вважали зміни при рівні вірогідності вище 95 % ($p < 0,05$) [22].

Результати та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що на 28 добу експерименту в щурів з АА, які не отримували лікування, відмічали статистично вірідне зниження рівня рН до ($1,74 \pm 0,08$) (таблиця) на 18,3 % відносно інтактних тварин ($2,13 \pm 0,12$).

Монотерапія ібупрофеном призвела

Показники шлункової секреції в щурів на 28 добу після моделювання ад'ювантного артриту під впливом ібупрофену та його комбінації з вінбороном, $M \pm m$, $n = 7$

№ групи	Умова досліджу	pH	Загальна кислотність, ТО	Об'єм шлункового соку, мл/100 г маси тварини
I	Інтактні тварини	$2,13 \pm 0,12$	$55,86 \pm 1,53$	$1,94 \pm 0,09$
II	Ад'ювантний артрит без лікування (контроль)	$1,74 \pm 0,08^*$	$58,71 \pm 0,81$	$2,04 \pm 0,07$
III	Ад'ювантний артрит + Ібупрофен (73 мг/кг)	$1,34 \pm 0,18^*$	$63,14 \pm 3,27$	$2,56 \pm 0,14^*$
IV	Ад'ювантний артрит + Ібупрофен (218 мг/кг)	$1,07 \pm 0,04$	$70,29 \pm 5,33^{*#}$	$2,63 \pm 0,13^{*#}$
V	Ад'ювантний артрит + Ібупрофен (73 мг/кг) + Вінборон (11 мг/кг)	$1,96 \pm 0,09^\diamond$	$57,86 \pm 3,84$	$2,04 \pm 0,15^\diamond$
VI	Ад'ювантний артрит + Ібупрофен (218 мг/кг) + Вінборон (11 мг/кг)	$1,83 \pm 0,09^*$	$58,57 \pm 1,67$	$2,13 \pm 0,07^\diamond$

Примітка. $*p < 0,05$ відносно інтактних тварин; $^{*}p < 0,05$ відносно контрольних тварин;

$^\diamond p < 0,05$ відносно групи монотерапії ібупрофеном у дозі 73 мг/кг або 218 мг/кг.

до ще більшого зниження значення pH шлункового соку відносно контрольних тварин та становило ($1,34 \pm 0,18$) при застосуванні вказаного антифлогістика в дозі 73 мг/кг та ($1,07 \pm 0,04$) при застосуванні ібупрофену в дозі 218 мг/кг. Крім того, у щурів з АА на 28 добу показник загальної кислотності підвищився на 5 % відносно інтактних тварин та становив ($58,71 \pm 0,81$) ТО. Монотерапія ібупрофеном у дозах 73 та 218 мг/кг призвела до зростання кислотності на 13 % та 26 % відносно інтактних тварин та становила ($63,14 \pm 3,27$) та ($70,29 \pm 5,33$) ТО відповідно.

Також нами було встановлено, що лікування щурів одним ібупрофеном призвело до статистично вірогідного збільшення об'єму шлункового соку, що співставлялося з даними літератури про гіперсекрецію шлункового соку на тлі застосування НПЗЗ [23]. Застосування ібупрофену в дозі 73 мг/кг призвело до зростання об'ємного показника шлункової секреції на 32 %, а в дозі 218 мг/кг – на 36 % відносно групи інтактних тварин, що становило ($2,56 \pm 0,14$) та ($2,63 \pm 0,13$) мл/100 г маси тіла тварин відповідно.

Слід зазначити, що встановлені зрушення секреторної активності шлунка в щурів з АА узгоджувалися з даними літератури щодо зростання кислотності шлункового соку у хворих на РА, обумовленою розвитком активного запального процесу, що призводить до зростання продукції опасистими клітинами СОШ гістаміну, який є безпосередньо причиною підвищення рівня кислотопродукції [1, 24].

Таким чином, найвиразніші зміни з боку шлункової секреції відмічалися при застосуванні ібупрофену в дозі 218 мг/кг, що співставляється з даними літератури про дозозалежність як фармакотерапевтичної активності, так і гастротоксичності ібупрофену [1, 24].

Комбінована терапія АА ібупрофеном та вінбороном призвела до нормалізації показників pH і кислотності, які становили ($1,96 \pm 0,09$) і 57,9 ТО відповідно при застосуванні ібупрофену в дозі 73 мг/кг та ($1,83 \pm 0,09$) і 58,6 ТО при застосуванні ібупрофену в дозі 218 мг/кг, що практично співставлялося з показниками інтактних тварин.

Порівняно з монотерапією кислотності шлункового соку знизилася за комбінованого застосування ібупрофену з вінбороном в дозах 73 і 218 мг/кг відповідно на 8,4 та 16,7 %. Отримані результати узгоджуються з даними літератури про здатність вінборону знижувати продукцію НСІ у шлунку, що призводить до підвищення рН та зниження загальної кислотності [25]. Крім того, було встановлено, що в щурів у разі комбінованого лікування ібупрофеном та вінбороном об'єм шлункового соку статистично вірогідно зменшився відносно груп монотерапії ібупрофеном на 20,3 % у групі ібупрофену в дозі 73 мг/кг та на 19,0 % у групі ібупрофену в дозі 218 мг/кг відповідно. Різниця об'єму шлункового соку між групами комбінованого застосування ібупрофену та вінборону та показниками інтактних тварин становила 4,9 % при застосу-

ванні ібупрофену в дозі 73 мг/кг, та 9,8 % при застосуванні ібупрофену в дозі 218 мг/кг, що вказує на здатність вінборону нормалізувати об'ємні показники секреції шлункового соку в щурів з АА на 28 добу експерименту.

Висновки

1. Застосування ібупрофену в терапії АА у щурів призводить до збільшення об'єму шлункової секреції, зниження рН та підвищення загальної кислотності шлункового соку.
2. Уведення в організм щурів з АА ібупрофену та вінборону супроводжується нівелюванням ознак гастротоксичності вказаного НПЗЗ за рахунок ослаблення факторів агресії шлункового соку шляхом підвищення рН та зниження загальної кислотності, що вказує на гастропротекторні властивості вітчизняного спазмолітика.

1. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации / А. Е. Каратеев, Н. Н. Яхно, Л. Б. Лазебник [и др.]. – Москва : ИМА-ПРЕСС. – 2009. – 168 с.
2. Муравьев Ю. В. Всегда ли терапия «безопасными» НПВП безопасна для слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта? / Ю. В. Муравьев, А. В. Алексеева // Российский гастроэнтерологический журнал. – 2000. – № 2. – С. 84–89.
3. Неклюдова В. В. Патологические аспекты повреждения слизистой оболочки желудка при длительном использовании нестероидных противовоспалительных препаратов : автореф. дисс. на соискание научной степени канд. мед. наук : 14.03.03. «Патологическая физиология» / Виктория Валентиновна Неклюдова; ГБОУ ВПО РГМУ им. Н. И. Пирогова. – Челябинск, 2012. – 23 с.
4. Циммерман Я. С. Гастроэнтерология (Библиотека врача-специалиста : гастроэнтерология, терапия) : руководство / Я. С. Циммерман. – Москва : ГЭОТАР-МЕДИА, 2012. – 800 с.
5. Алексеева А. В. Влияние диклофенака натрия и индометацина на показатели суточного мониторирования желудочной секреции у больных ревматоидным артритом : автореф. дисс. на соискание научной степени канд. мед. наук. – Москва, 1999. – 22 с. – Режим доступа: <http://medical-diss.com/medicina/vliyanie-diklofenaka-natriya-i-indometatsina-na-pokazateli-sutochnogo-monitorirovaniya-zheludochnoy-sekretsii-u-bolnyh-re>
6. Effect of one-month treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on gastric pH of rheumatoid arthritis patients / V. Savarino, G. Sandro, M. P. Zentilin [et al.] // Digestive Diseases and Sciences. – 1998. – V. 43, Issue 3. – P. 459–463.
7. Белянская Н. Э. Клинико-патогенетические особенности НПВП-индуцированной гастропатии у больных ревматоидным артритом и остеоартрозом : автореф. дисс. на соискание научной степени канд. мед. наук. – Казань, 2010. – 23 с. – Режим доступа: <http://medical-diss.com/medicina/kliniko-patogeneticheskie-osobennosti-npvp-indutsirovannoy-gastropatii-u-bolnyh-rhevmatoidnym-artritom-i-osteoartrozom>
8. Вязникова О. А. Синдром диспепсии и патология верхних отделов желудочно-кишечного тракта у больных ревматоидным артритом : автореф. дисс. на соискание научной степени канд. мед. наук. – Нижний Новгород, 2008. – 28 с. – Режим доступа: <http://www.gastroscan.ru/disser/vyaznikova.pdf>
9. Bloom S. Oxford Handbook of Gastroenterology and Hepatology (Oxford Medical Handbooks) / Stuart Bloom and George Webster. – Oxford – New York : Oxford University Press, 2006. – 726 p.
10. Santhosh S. Studies on the Antiulcerogenic and Antihepatotoxic Potential of Chitosan and Glucosamine in Experimental Rats. PhD dissertation. Cochin University of Science and Technology. Cochin. – 2006.
11. Абдулганиева Д. И. Внутриведочная рН-метрия в оценке моторных нарушений у больных ревматоидным артритом и остеоартрозом на фоне приема диклофенака натрия / Д. И. Абдулганиева, Н. Э. Белянская // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 13–15.

12. Rainsford K. D. Fifty years since the discovery of ibuprofen / K. D. Rainsford // *Inflammopharmacol.* – 2011. – № 19. – Р. 293–297.
13. Матеріали науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю від дня народження професора О. О. Столярчука «Фенікаберан (Вінборон) і бензофуракаїн : нові підходи до фармакотерапії запальних та ішемічних процесів», (29 вересня 2000 р.) / Вінницький ДМУ ім. М. І. Пирогова ; ред. Г. І. Степанюк. – Вінниця : ТЕЗИС, 2000. – 148 с.
14. Степанюк Г. І. Вінборон – лікарський засіб з політропними фармакологічними властивостями : монографія / Г. І. Степанюк, О. О. Пентюк, Р. П. Піскун. – Вінниця : Издат. «Континент-Прим», 2007. – 243 с.
15. Гладких Ф. В. Сучасні шляхи послаблення ульцерогенності нестероїдних протизапальних засобів : досягнення, невирішені питання та шляхи оптимізації / Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк // *Запорожский медицинский журнал.* – 2014. – № 2. – С. 82–86.
16. Сергеев С. В. Фармакотерапевтична ефективність вінборону при експериментальних гепатитах : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : 14.03.05. «Фармакологія» / Сергій Вікторович Сергеев. – Київ, 2002. – 19 с.
17. Simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat / H. A. Shay, S. Komarov [et al.] // *Gastroenterology.* – 1945. – № 5. – Р. 43–61.
18. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 527 с.
19. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // *Доклады АН СССР.* – 1979. – № 6. – С. 1513–1516.
20. Вплив корвітину на секреторні процеси та кровотік у слизовій оболонці шлунка щура / Т. В. Вовкун, П. І. Янчук, Л. Я. Штанова [та ін.] // *Фізіологічний журнал.* – 2013. – Т. 59, № 1. – С. 40–46.
21. Долгов В. В. Клиническая лабораторная диагностика : национальное руководство в 2 т. / В. В. Долгов, В. В. Меньшиков. – Москва : ГОЭТАР-Медиа, 2012. – 1 том – 928 с., 2 том – 808 с.
22. Воронов И. А. Эксперимент и методы обработки многомерных данных в исследованиях человека с применением SPSS: медико-биологические исследования, психология, физическая культура и спорт : учебное пособие. 200401 / И. А. Воронов; ГОУВПО СПбГУТ. – Санкт-Петербург, 2008. – 100 с.
23. Склярів Є. Я. Особливості механізму дії інгібіторів протонної помпи у лікуванні НПЗЗ-гастропатій / Є. Я. Склярів, Махер Мбаркі // *Буковинський медичний вісник.* – 2015. – Т. 19, № 3 (75). – С. 158–161.
24. Dose-response relationships between individual nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NNSAIDs) and serious upper gastrointestinal bleeding: a meta-analysis based on individual patient data / S. C. Lewis, M. J. Langman, J. R. Laporte [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2002. – V. 54, № 3. – Р. 320–326.
25. Степанюк Г. І. Вінборон : новий підхід до корекції диклофенак-індукованої гастропатії / Г. І. Степанюк, Н. Г. Черноіван, А. С. Шаламай // Матеріали Національного конгресу «Клінічна фармація : 20 років в Україні» (21–22 березня 2013 р.) : тези доп. – Харків : НФаУ, 2013. – С. 215–216.

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Дослідження шлункової секреції в щурів з ад'ювантним артритом на тлі застосування ібупрофену та його комбінації з вінбороном

Мета дослідження – оцінити вплив монотерапії ад'ювантного артриту (АА) ібупрофеном та його комбінацією з вінбороном на шлункову секрецію в щурів. Дати характеристику впливу зазначених препаратів на рН, загальну кислотність та об'єм шлункового соку, отриманого за методикою Н. Shay.

Ад'ювантний артрит моделювали на щурах шляхом субплантарного введення повного ад'юванта Фрейнда (0,1 мл на одну тварину). Лікування АА проводили щоденним внутрішньошлунковим введенням ібупрофену (73 та 218 мг/кг) або ібупрофену з вінбороном (11 мг/кг) з 14 до 28 доби від початку моделювання патологічного стану. Дослідження шлункової секреції проводили на 28 добу експерименту.

Встановлено, що застосування ібупрофену для лікування АА у щурів призводить до збільшення об'єму шлункової секреції, зниження рН та підвищення кислотності шлункового соку. Уведення в організм щурів з АА ібупрофену та вінборону супроводжується нівелюванням ознак гастротоксичності вказаного НПЗЗ за рахунок ослаблення факторів агресії шлункового соку – підвищення рН та зниження загальної кислотності.

У результаті проведеного дослідження були виявлені гастропротекторні властивості вінборону за умов ібупрофен-індукованої гастропатії в щурів з АА.

Ключові слова: ібупрофен, вінборон, шлункова секреція, кислотність, ад'ювантний артрит

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Исследование желудочной секреции у крыс с адьювантным артритом на фоне применения ибупрофена и его комбинации с винборомом

Цель исследования – оценить влияние монотерапии адьювантного артрита (АА) ибупрофеном и его комбинацией с винборомом на желудочную секрецию у крыс. Дать характеристику влияния указанных препаратов на pH, общую кислотность и объем желудочного сока, полученного по методике Н. Шай.

Адьювантный артрит моделировали на крысах путем субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда (0,1 мл на животное). Лечение АА проводили ежедневным внутрижелудочным введением ибупрофена (73 та 218 мг/кг) или ибупрофена с винборомом (11 мг/кг) с 14 до 28 суток от начала моделирования патологического состояния. Исследование желудочной секреции проводили на 28 сутки эксперимента.

Установлено, что применение ибупрофена для лечения АА у крыс приводит к увеличению объема желудочной секреции, снижению величины pH и повышению кислотности желудочного сока. Введение в организм крыс с АА ибупрофена и винборона сопровождается нивелированием признаков гастротоксичности указанного НПВС за счет ослабления факторов агрессии желудочного сока – повышения pH и снижения общей кислотности.

В результате проведенного исследования были выявлены гастропротекторные свойства винборона в условиях ибупрофен-индуцированной гастропатии у крыс с АА.

Ключевые слова: ибупрофен, винборон, желудочная секреция, кислотность, адьювантный артрит

F. V. Hladkykh, N. H. Stepaniuk

The study of the gastric secretion in rats with adjuvant arthritis against the application of ibuprofen and its combination with vinboron

Aim of the study was to assess the impact of monotherapy of adjuvant arthritis (AA) by ibuprofen and its combination with vinboron on gastric secretion in rats, to characterize the impact of these drugs on the pH, total acidity and volume of gastric juice, obtained by the method of H. Shay.

Adjuvant arthritis was modeled on rats by subplantar injection of Freund's complete adjuvant (0,1 ml per rat). Treatment was performed by daily intragastric administration of ibuprofen (73 and 218 mg/kg) or its combination with vinboron (11 mg/kg) since 14 to 28 days from the beginning of pathological process. Study of gastric secretion was carried out on 28 day of experiment.

It was found that ibuprofen application for the treatment of AA in rats leads to an increase in the volume of gastric secretion, decrease pH value and increase an acidity of gastric juice. The treatment of rats with AA by ibuprofen and vinboron accompanied by signs of leveling NSAID gastric toxicity due to weakening of gastric juice aggression factors – an increase of the gastric juice pH value and decrease of total acidity.

As a result of the study it was found vinboron gastroprotective properties under ibuprofen-induced gastropathy in rats with AA.

Key words: ibuprofen, vinboron, gastric secretion, adjuvant arthritis, acidity

Надійшла: 10 березня 2016 р.

Контактна особа: Гладких Федір Володимирович, лікар-інтерн, кафедра хірургії № 1, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: +38 0 97 707 25 50. Електронна пошта: fedir.hladkykh@gmail.com

Я. І. Іванків, О. М. Олещук

Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу

Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України»

Ключові слова: експериментальний діабет, мелатонін, прооксидантно-антиоксидантна система, печінка

Цукровий діабет (ЦД), незважаючи на досягнуті успіхи в діагностиці та лікуванні, залишається актуальною проблемою сучасної ендокринології. Кожні 10–15 років кількість хворих на ЦД подвоюється. Ураховуючи значний ріст захворюваності та частоту ускладнень, можна стверджувати, що не всі ланки патогенезу цього захворювання є достатньо вивченими. Важливим є те, що при ЦД порушується більшість метаболічних процесів та зростає ризик ураження внутрішніх органів, що в кінцевому результаті призводить до появи серйозних ускладнень, які є причиною інвалідності та смертності хворих. Саме тому пошук нових засобів фармакокорекції, які впливали б на різні ланки патогенезу та зменшували прояви ЦД і ускладнень, є актуальним [1].

Уперше гормон шишкоподібної залози – мелатонін – був описаний групою науковців на чолі з Ароном Лернером ще в 1958 році. З того часу накопичується інформація щодо біосинтезу, метаболізму, фізіологічних і патофізіологічних функцій, а також його взаємодії з іншими ендокринними або нейро-ендокринними органами та тканинами. Останніми роками значний прогрес був досягнутий у розумінні механізму його дії як на клітинному, так і на молекулярному рівнях [2].

Одразу після синтезу чи екзогенного введення мелатонін за короткий період часу досягає всіх тканин організму. Він метаболізується в основному в печінці цитохромом Р-450, однак певна кількість гормону нейтралізується в позапечінкових тканинах [3]. Оскільки мелатонін легко проникає крізь біоло-

гічні мембрани, то його ефекти проявляються майже в кожній клітині організму. Він має широкий спектр фізіологічних функцій, регулює цикл сон – неспання, циркадний ритм, артеріальний тиск, проявляє імуностимулюючу, детоксикаційну, антипухлинну дію, знешкоджує вільні радикали. [4].

Дія мелатоніну опосередковується через специфічні мембранні (MT1 (MTNR1A) і MT2 (MTNR1B)) (що належать до суперсімейства G-білкових) та ядерні (RZR α , ROR α , ROR α 2 і RZR β) рецептори сімейства ретиноєвої кислоти [5]. MT1 і MT2 рецептори наявні в периферичних органах і клітинах, при цьому MT1 в основному викликає вазоконстрикцію, у той час як MT2 – розширення кровоносних судин [6].

Здатність мелатоніну стимулювати детоксикаційні та антиоксидантні механізми здійснюється завдяки поглинанню гідроксильних радикалів, підвищенню активності таких антиоксидантних ферментів, як глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, каталаза, супероксиддисмутаза та інгібуванню прооксидантних ферментів, а саме індукції NO синтази [4, 7, 8].

Існують дані, що мелатонін бере участь у регуляції функції підшлункової залози, взаємодіючи зі специфічними рецепторами двох основних типів, представлених, зокрема, на мембранах α - і β -клітин панкреатичних острівців, підтримці гомеостазу в цілому організмі, а тому й у патогенезі ЦД [9]. Також він має здатність підсилювати поглинання глюкози та депонування глікогену тканинами, підвищувати концентрацію АТФ і креатинфосфату [10].

Оскільки ЦД супроводжується порушенням усіх видів обміну речовин, ураженням різних органів і тканин, у тому числі й печінки, виснаженням

систем антиоксидантного захисту, тому більш детальне вивчення протекторних властивостей мелатоніну за умов ЦД становить значний науковий інтерес.

Мета дослідження – з'ясувати особливості впливу мелатоніну на показники вуглеводного обміну, функціонального стану печінки, процеси перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи захисту за експериментального ЦД I типу.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 21 білому щурі самці масою тіла 180–200 г. Усіх тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти виконували відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [11] та узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.). ЦД I типу моделювали шляхом одноразового інтраперитонеального введення стрептозотоцину (STZ, «Sigma», США), розведеного на цитратному буфері рН 4,5 у дозі 50 мг/кг маси тіла тварини [12]. Тварини були розділені на три групи: 1 – контрольна група (контроль), 2 – щури з цукровим діабетом (ЦД), 3 – щури з цукровим діабетом, яким з 14 доби від початку експерименту вводили мелатонін («Sigma», США) протягом 10 днів, інтраперитонеально в дозі 10 мг/кг (ЦД + М). Тваринам першої та другої груп вводили відповідний об'єм ізотонічного розчину. Щурів декапітували під тіопенталовим наркозом на наступний день після останнього введення препарату.

Про ступінь порушення вуглеводного обміну робили висновки за змінами вмісту глюкози [13], про функціональний стан печінки – за активністю маркерних ферментів цитолізу, аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) за методом Райтмана-Френкеля в сироватці крові, холестази – за активністю гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП) та вмістом лужної фосфатази (ЛФ), визначали вміст компонентів жовчі в сироватці

крові за рівнем загального білірубину, холестерину, використовуючи стандартні набори реактивів ТОВ «Філісіт-Діагностика». Про стан системи антиоксидантного захисту судили за активністю супероксиддисмутази (СОД) [14], каталази (КАТ) [15] та вмістом відновленого глутатіону (GSH) [16] і церулоплазміну (ЦП) [17]. Активність процесів вільнорадикального окиснення ліпідів аналізували за вмістом ТВК-активних продуктів (ТВП) [18] та гідроперекисів ліпідів ГПЛ [19].

Обробку цифрових даних здійснювали методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Origin pro 7.5 з використанням *t* критерію Стьюдента, оцінюючи достовірність при рівні значимості не менше 95 % ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення. Стрептозотоцинова модель (50 мг/кг) є адекватним відтворенням цукрового діабету I типу [20]. Цей антибіотик широкого спектра дії за рахунок своєї хімічної структури вибірково впливає на клітини підшлункової залози, викликає інсулінозалежний діабет, пригнічуючи секрецію інсуліну. Як гідрофільна речовина він не проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр та плазматичну мембрану багатьох клітин. Разом з тим, глюкозна частина молекули здатна зв'язуватися з переносником глюкози GLUT2, проникати та накопичуватися в β -клітинах панкреатичних островців, викликаючи їхній специфічний некроз, зумовлений алкілуванням ДНК з наступною активацією полі-АДФ рибозосинтетази та виснаженням клітинного пулу. Руйнування β -клітин цією сполукою викликає зниження синтезу та секреції в кров інсуліну, у результаті чого в тварин розвиваються гіперглікемія та діабетичний синдром, аналогічний інсулінозалежному ЦД I типу [21, 22].

Відомо, що основним діагностичним критерієм розвитку ЦД є визначення рівня глюкози в крові натще. Згідно з отриманими результатами, рівень глікемії в піддослідних тварин 2 групи за введення стрептозотоцину зріс на 365,1 % порівняно з показниками контрольної

групи (рисунок), що може бути результатом зниження утилізації глюкози інсулінзалежними тканинами, а також зниженого синтезу та посиленого розпаду глікогену в печінці на тлі дефіциту секреції інсуліну, що призводить до накопичення глюкози в міжклітинному просторі та крові. Також були відмічені основні симптоми, характерні для ЦД I типу, такі як поліурія, полідипсія та поліфагія, такі результати можна прослідкувати в роботах інших дослідників [23].

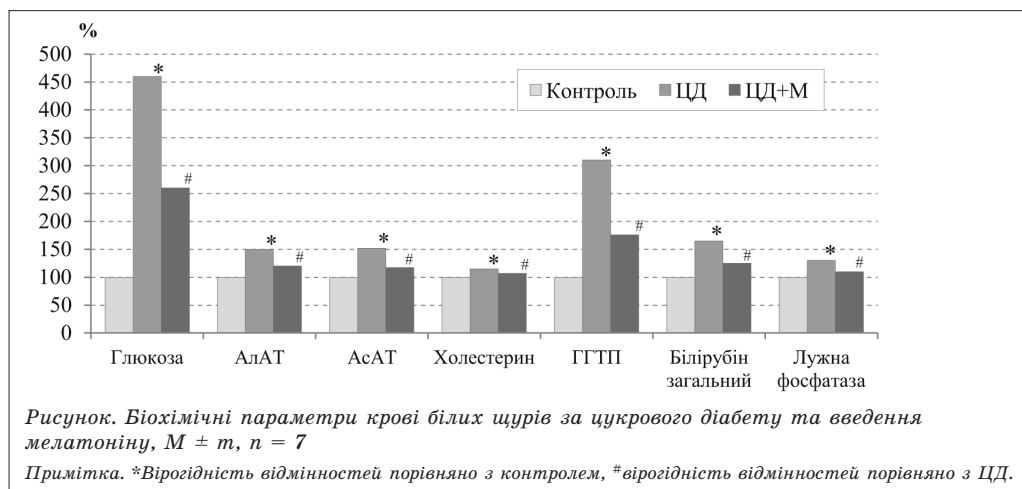
Окрім порушення вуглеводного обміну спостерігали порушення ліпідного обміну, а саме підвищення рівня холестерину на 16,4 %. Такі зміни, на нашу думку, пов'язані з розвитком дисбалансу між ліпогенезом та ліполізмом на фоні гіперглікемії та інсулінової недостатності.

Було встановлено зростання концентрації загального білірубину на 68,4 %, значне підвищення активності ГГТП у 2,7 разу та вмісту ЛФ на 32,8 %. Ці дані свідчать про ймовірний розвиток холестатичного синдрому за умов порушення функціональної здатності печінки щодо екскреції компонентів жовчі. Про стан мембран гепатоцитів судили за активністю маркерних ферментів АЛАТ та АсАТ, відмітили їхнє зростання на 55,1 та 57,6 % відповідно, що свідчить про пошкодження мембран гепатоцитів та розвиток печінково-клітинної недостатності. Зміни біохімічних показників у крові тварин вказують про виражені порушення функціо-

нальної діяльності та метаболічних процесів у печінці, що розвинулися за експериментального ЦД (рисунок). Ці дані узгоджуються з результатами інших науковців [24].

Після десятиденного застосування мелатоніну відмітили достовірне зниження глікемії у тварин з експериментальним діабетом на 42,9 %, активності маркерних ферментів цитолізу гепатоцитів АЛАТ та АсАТ на 19,7 та 23,3 %, концентрації загального білірубину та холестерину на 26,5 та 10,3 % відповідно порівняно з групою тварин без корекції, а також зниження активності ГГТП на 33,1 % та ЛФ на 14,1 %.

Виходячи з аналізу наукової літератури, можна припустити, що механізм гіпоглікемічної дії мелатоніну при стрептозотоциновому діабеті пов'язаний зі стимуляцією проліферації β -клітин і утворенням нових острівців з епітелію підшлункової залози, що пригнічувало апоптоз цих клітин і водночас підвищувало рівень інсуліну [25]. Також науковцями експериментально було показано, що мелатонін при ураженні печінки знижує прояви цитолітичного та холестатичного синдромів завдяки відновленню активності мітохондріальних і мікросомальних цитохромів Р-450 і процесів мітохондріального дихання. Позитивний вплив мелатоніна на функціональний стан та метаболічні процеси в печінці здійснюється також завдяки його антиоксидантним властивостям та здатності зменшувати ступінь пероксидації білків і ліпідів [26, 27].



За результатами досліджень, наведеними у таблиці, у тварин зі стрептозотциновим діабетом вміст ТВП у сироватці крові та печінці підвищився на 75 і 34,8 % відповідно порівняно з показниками контрольної групи тварин. Також відмітили достовірне зростання концентрації одного з кінцевих продуктів ліпопероксидації – ГПЛ у печінці на 30,7 %. Ці дані вказують на те, що за умов досліджуваної патології в піддослідних тварин відбувається виражене посилення вільнорадикальних процесів. У відповідь на процеси надмірної ліпопероксидації компенсаторно підвищується активність СОД у крові на 35,5 % та печінці на 40,9 % та КАТ на 37,1 % у крові, а в печінці каталазна активність знижується на 22,6 %. За умов STZ-діабету було відмічено значне зниження активності як у крові, так і в печінці глутатіон-залежної ланки антиоксидантної систе-

ми, вміст GSH знизився на 10,5 та 29,3 % відповідно порівняно з контрольними показниками. У тварин з ЦД у крові зросла концентрація антиоксидантного білка ЦП на 25,6 %. Слід зазначити, що особливістю даного білка є його висока стійкість та збереження активності щодо токсичної дії активних форм кисню [28]. Отже, можемо стверджувати про розвиток дисбалансу ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту на тлі моделюваної патології.

Наступним етапом дослідження було вивчення впливу десятиденного введення мелатоніну на стан системи про-оксиданти-антиоксиданти при STZ-діабеті. Відповідно до результатів, наданих у таблиці, порівняно з 2 групою тварин з моделлю ЦД вміст ТВП достовірно знизився на 28 % у крові та на 24 % у печінці, а рівень ГПЛ у печінці – на 12,7 %, тобто активність

Таблиця

Показники інтенсивності ліпопероксидації та антиоксидантної системи за цукрового діабету та введення мелатоніну, $M \pm m$, $n = 7$

Показник	Група тварин		
	контроль	цукровий діабет	цукровий діабет + Мелатонін
ГПЛ (печінка), ум. од./кг	$4,34 \pm 0,05$	$5,68 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$4,64 \pm 0,04$ $p_1 < 0,05$
ТВП (печінка), мкмоль/кг	$4,91 \pm 0,10$	$6,62 \pm 0,26$ $p < 0,001$	$5,04 \pm 0,11$ $p_1 < 0,01$
ТВП (кров), мкмоль/л	$3,76 \pm 0,17$	$6,57 \pm 0,40$ $p < 0,001$	$4,73 \pm 0,31$ $p_1 < 0,01$
Каталаза (печінка), кат/кг	$4,24 \pm 0,10$	$3,29 \pm 0,17$ $p < 0,01$	$3,99 \pm 0,08$ $p_1 < 0,01$
Каталаза (кров), кат/л	$12,55 \pm 0,24$	$17,21 \pm 0,31$ $p < 0,001$	$13,85 \pm 0,32$ $p_1 < 0,001$
СОД (печінка), ум.од./кг	$4,52 \pm 0,23$	$6,36 \pm 0,48$ $p < 0,05$	$4,94 \pm 0,31$ $p_1 < 0,05$
СОД (кров), ум.од./л	$5,11 \pm 0,25$	$6,92 \pm 0,42$ $p < 0,01$	$5,53 \pm 0,3$ $p_1 < 0,05$
GSH (печінка), ммоль/кг	$4,26 \pm 0,11$	$3,02 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$3,67 \pm 0,10$ $p_1 < 0,01$
GSH (кров), ммоль/л	$72,26 \pm 1,38$	$64,65 \pm 0,92$ $p < 0,01$	$70,66 \pm 1,96$ $p_1 < 0,05$
Церулоплазмін (кров), мг/л	$264,14 \pm 8,25$	$331,86 \pm 6,45$ $p < 0,001$	$298,29 \pm 2,60$ $p_1 < 0,001$

Примітка. p – вірогідність відмінностей порівняно з контролем,
 p_1 – вірогідність відмінностей порівняно з ЦД.

процесів ліпопероксидації за введення досліджуваного коригуючого чинника суттєво зменшувалася. Каталазна активність печінки за введення мелатоніну зросла на 21,7 %, а у крові активність цього ензиму вірогідно знизилася на 19,5 %. Активність іншого антиоксидантного ферменту СОД зменшилася як у крові – на 20,2 %, так і в печінці – на 22,4 %, а вміст GSH збільшився відповідно на 9,7 та 21,6 % порівняно з нелікованими тваринами. Концентрація церулоплазміну в сироватці крові достовірно знизилася на 10,1 %. Такі виражені антиоксидантні властивості мелатоніну за умов експериментального діабету можна пояснити його властивістю перехоплювати та безпосередньо нейтралізувати вільні радикали, а також активувати ферменти, що посилюють утворення природних антиоксидантів, зокрема, глутатіону [9, 29].

Таким чином, доцільність застосування мелатоніну при цукровому діабеті ґрунтується, щонайменше, на таких можливих механізмах:

- гіпоглікемічній дії (за рахунок регуляції функції підшлункової залози, так і покращання біодоступності та метаболізму вуглеводів);
- антиоксидантній дії (як прямій, так і опосередкованій);

– гепатопротекторній дії (зниження проявів цитолізу та холестазу).

Поза сумнівом, наведені результати не є вичерпними щодо протективного впливу екзогенного мелатоніну за умов цукрового діабету I типу, і ці питання потребують подальшого вивчення.

Висновки

1. Стрептозотоцинова модель цукрового діабету характеризувалася достовірним зростанням вмісту глюкози в крові тварин, змінами функціонального стану та метаболічних процесів у печінці, розвитком оксидативного стресу.
2. Десятиденне введення мелатоніну тваринам з експериментальним діабетом I типу з метою корекції даних показників сприяло зниженню рівня глікемії, процесів цитолізу та холестазу в печінці тварин.
3. У відповідь на розвиток оксидативного стресу, мелатонін сприяв підвищенню активності ферментативних та неферментативних механізмів антиоксидантного захисту, що, у свою чергу, зменшувало деструктивний вплив надмірної ліпопероксидації та покращувало баланс систем прооксиданти-антиоксиданти.

1. Воспроизведение стрептозотоцин-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс / А. И. Маяков, М. В. Покровский, Т. Г. Покровская [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 12, № 22. – С. 56–63.
2. Chowdhury I. Melatonin: fifty years of scientific journey from the discovery in bovine pineal gland to delineation of functions in human / I. Chowdhury, A. Sengupta, S. K. Maitra // Indian J. Biochem Biophys. – 2008. – № 45 (5). – P. 289–304.
3. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450 / X. Ma, J. R. Idle, K.W. Krausz, F. J. Gonzalez // Drug Metab Dispos. – 2005. – № 33. – P. 489–494.
4. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? / S. R. Pandi-Perumal, V. Srinivasan, G. J. M. Maestroni [et al.] // Febs Journal. – 2006. – № 273 (13). – P. 2813–2838.
5. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions / R. M. Slominski, R. J. Reiter, N. Schlambitz–Loutsevitch [et al.] // MolCellEndocrinol. – 2012. – № 351 (2). – P. 152–166.
6. MT2 Melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery / M. I. Masana, S. Doolen, C. Ersahin [et al.] // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 2002. – V. 302, № 3. – P. 1295–1302.
7. Левин Я. И. Мелатонин и неврология / Левин Я. И. // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15, № 24. – С. 1851–1855.
8. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors / E. Camacho, M. D. Carrion, M. C. Lopez-Cara [et al.] // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2012. – V. 12, № 7. – P. 600–617.
9. Арушанян Э. Б. Мелатонин и сахарный диабет (обзор современных экспериментальных данных) / Э. Б. Арушанян // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 2. – С. 35–40.
10. Труфакин В. А. Проблемы центральной регуляции биоритмов иммунной системы. Роль мелатонина / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина // Вестник Российской АМН. – 2006. – № 9–10. – С. 121–127.
11. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.

12. Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 568 с.
13. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / Камышников В. С. – Москва : МЕДпресс-информ. – 2004. – 920 с.
14. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
16. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – Р. 70–77.
17. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
18. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
19. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
20. Wilson R. D. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes / R. D. Wilson, M. S. Islam // Pharmacological Reports. – 2012. – № 64. – С. 129–139.
21. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin / M. Elsner, B. Guldbacke, M. Tiedge [et al.] // Diabetologia. – 2000. – V. 43. – Р. 1528–1533.
22. Szkudelski T. The Mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Ibid. – 2001. – № 50 (6). – Р. 536–546.
23. Коновалова О. О. Ремоделивання жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті / О. О. Коновалова, О. М. Камишний // Запорожский медицинский журнал. – 2013. – № 4 (79). – С. 95–98.
24. Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозотоциновой моделей экспериментального диабета / Н. А. Пальчикова, Н. В. Кузнецова, О. И. Кузьминова [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 33, № 6. – С. 18–24.
25. The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus) / E. Peschke, K. Hofmann, I. B hr [et al.] // Diabetologia. – 2011. – № 54 (7). – Р. 1831–1840.
26. Кузнецова Е. И. Использование мелатонина в качестве гепатопротектора при внепеченочном холестазе / Е. И. Кузнецова, И. В. Семак // Биология – наука XXI века : 16 Междунар. Пуш. шк.-конф. молодых ученых (Пушино, 16–21 апр. 2012 г.): сб. тез. / Пуш. науч. центр Росс. акад. наук. – Пушино, 2012. – С. 180–181.
27. Олещук О. М. Роль системи оксиду азоту в патогенезі уражень печінки різного ґенезу: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня докт. мед. наук. – Тернопіль, 2013. – 38 с.
28. Пашковська Н. В. Особливості показників про- та антиоксидантної систем плазми крові хворих на діабетичну енцефалопатію залежно від її стадії / Н. В. Пашковська // Медична хімія. – 2007. – № 3 (9). – С. 22–26.
29. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и надфн-генерирующих ферментов в сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2-го типа и воздействии препаратов, корригирующих уровень мелатонина / А. А. Агарков, Т. Н. Попова, А. Н. Веревкин, Л. В. Матасова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 2. – С. 158–162.

Я. І. Іванків, О. М. Олещук

Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу

Цукровий діабет (ЦД) залишається актуальною проблемою сучасної ендокринології. Мелатонін – гормон шишкоподібної залози, фізіологічні ефекти якого опосередковуються через специфічні мембранні та ядерні рецептори, бере участь у регуляції функції підшлункової залози та має виражені антиоксидантні та протекторні властивості. Тому його екзогенне введення може сприяти підтримці гомеостазу в цілому організмі, а також зменшувати негативні прояви ЦД.

Мета дослідження – з'ясувати особливості впливу мелатоніну на показники вуглеводного обміну, функціонального стану печінки, процесів перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи захисту за умов експериментального цукрового діабету I типу.

В експерименті на 21 білому самці щурів відтворено стрептозотоксин-індуковану модель цукрового діабету I типу, яка характеризувалася зміною показників вуглеводного та ліпідного обміну речовин, активацією процесів ліпопероксидації. Було встановлено, що застосування мелатоніну протягом 10 днів, інтраперитонеально в дозі 10 мг/кг знижувало рівень глікемії, пригнічувало процеси ліпопероксидації, цитолізу та холестазу в печінці, а також активувало антиоксидантну систему захисту організму.

Ключові слова: експериментальний діабет, мелатонін, прооксидантно-антиоксидантна система, печінка

Применение мелатонина при экспериментальном сахарном диабете I типа

Сахарный диабет (СД) остается актуальной проблемой современной эндокринологии. Мелатонин – гормон шишковидной железы, действие которого опосредуется через специфические G-белковые мембранные и ядерные рецепторы. Он, взаимодействуя со специфическими рецепторами, участвует в регуляции функции поджелудочной железы и оказывает антиоксидантное и протекторное действие. Поэтому его экзогенное введение может способствовать поддержанию гомеостаза в целом организме, а также уменьшать негативные проявления СД.

Цель исследования – выяснить особенности влияния мелатонина на показатели углеводного обмена, функционального состояния печени, процессов перекисного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы защиты в условиях экспериментального сахарного диабета I типа.

В эксперименте на 21 белом самце крыс воспроизведена стрептозотоцин-индуцированная модель сахарного диабета I типа, которая сопровождалась изменением показателей углеводного и липидного обмена веществ, активацией процессов липопероксидации. Установлено, что применение мелатонина в течение 10 дней интраперитонеально в дозе 10 мг / кг снижало уровень гликемии, подавляло процессы липопероксидации, цитолиза и холестаза в печени, а также активировало антиоксидантную систему защиты организма.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, мелатонин, прооксидантно-антиоксидантная система, печень

Ya. I. Ivankiv, O. M. Oleshchuk

Application of melatonin in experimental type I diabetes

Despite the achievements in the diagnosis and treatment diabetes mellitus is relevant problem of modern endocrinology. Melatonin is a hormone of the pineal gland, which actions are mediated through specific membrane, belonging to G protein-coupled and nuclear retinoic acid family receptors, has evidence antioxidant and protective properties. Introduction of exogenic melatonin may supports the homeostasis of the body and elimination of diabetes.

Aim of the study – to find out features of the melatonin effect on indicators of carbohydrate metabolism, hepatic function state, lipid peroxidation and antioxidant protection in experimental type I diabetes mellitus.

Streptozotocin-induced type 1 diabetes experimentally modeling on 21 white male rats is characterized by changing parameters of carbohydrate and lipid metabolism, activation of lipid peroxidation. It was established that introduction of melatonin during 10 days intraperitoneally at 10 mg / kg reduced the glucose level, depressed lipid peroxidation processes, cytolysis and cholestasis in the liver and also triggered antioxidant defense system of the body.

Key words: experimental diabetes, melatonin, prooxidant-antioxidant system, liver

Надійшла: 10 березня 2016 р.

Контактна особа: Іванків Яна, аспірант, кафедра фармакології з клінічною фармакологією, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», буд. 1, майдан Волі, м. Тернопіль, 46001. Електронна пошта: ivankivya@tdmu.edu.ua

К. О. Калько¹, С. М. Дроговоз¹, А. В. Кононенко¹, Н. В. Захарко²,
Т. В. Горбач³, О. Я. Міщенко¹, Н. В. Бездітко¹

Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну в щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²Рівненський державний базовий медичний коледж

³Харківський національний медичний університет

Ключові слова: печінка, парацетамол,
вуглеводний обмін, циркадіанний ритм

Циркадіанна залежність виразності фармакологічного та побічного ефектів препаратів неодноразово підтверджувалася результатами хронофармакологічних доклінічних та клінічних досліджень [1]. А врахування хроноефективності та хронотоксичності лікарських засобів у клінічній практиці удосконалює терапію будь-якого захворювання [2]. З метою такого хронодетермінованого прийому препаратів слід враховувати особливості «хронопортрета» кожного лікарського засобу. На жаль, натеper дані такого характеру обмежені та існують тільки для окремих препаратів.

Гепатопротектори – лікарські засоби, що часто призначаються для лікування захворювань гепатобіліарної системи, циркадіанна залежність гепатопротекторної активності яких не встановлена. Модель гострого парацетамолового гепатиту використовують при доклінічному дослідженні гепатопротекторів. Сьогодні відома циркадіанна залежність токсичності парацетамолу, яку оцінювали за ступенем зміни активності маркерів цитолізу на тлі гострого парацетамолового гепатиту [3]. Однак циркадіанні особливості порушень біоритмів вуглеводного обміну, як важливого показника функціонального стану печінки, на тлі цієї моделі патології невідомі, тоді як властивість гепатопротектора підтримувати (регулювати) вуглеводний баланс, важлива складова прояву гепатопротекторної дії препарату [4].

Мета дослідження – встановлення циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за фізіологічних умов та їхній десинхроноз за умов гострого парацетамолового гепатиту в щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах обох статей на моделі гострого парацетамолового гепатиту (березень 2015 року). Тварин утримували в розпліднику ЦНДЛ НФаУ м. Харкова за стандартного температурного режиму, вологості повітря та світлового режиму, що відповідав природним умовам (тривалість світлового дня 12–13 год). Контрольну патологію моделювали одноразовим введенням парацетамолу в дозі 1000 мг/кг у вигляді суспензії на 2 % розчині крохмального гелю в такі години доби: 03.00; 09.00; 15.00; 21.00 [5]. Евтаназію тварин, забір крові та печінки проводили через 24 год після введення парацетамолу. З цільної крові отримували сироватку за загальноприйнятими методиками, в якій визначали вміст глюкози та кортикостерону; з тканини печінки отримували гомогенати для визначення вмісту глікогену. Уміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою набору виробництва НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна); уміст глікогену – антроновим методом, кортикостерону – за допомогою набору Corticosterone EIA Kit – Enabling Discovery in Life Sciences (Японія) методом імуоферментного аналізу [6]. Глюкоза та глікоген є маркерами вуглеводного обміну, у регуляції рівня яких суттєву роль відіграє кортикостерон. Вибір обох статей щурів для експерименту зумовлений прагненням

встановити особливості змін циркадіанних ритмів вуглеводного обміну з урахуванням статевієї приналежності тварин.

В експерименті було використано 128 щурів, а в кожній часовій групі було по 8 самиць та 8 самців масою 170–220 г. Проведення дослідів у вечірній та нічний періоди під інфрачервоною лампою дозволило нівелювати вплив світлового фактора на синтез мелатоніну [7]. Дані підлягали статистичному опрацюванню за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP та пакета статистичних програм «Statistica 8,0». Використовували непараметричний критерій Манна-Вітні. При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ [5, 8].

Під час аналізу отриманих даних визначали акрофазу (момент доби, коли реєструється максимальне значення досліджуваного показника) та батифазу (момент доби, коли значення досліджуваного показника мінімальне), мезор (середнє значення досліджуваного показника протягом доби) та амплітуду (найбільше відхилення від мезора в обидві сторони) показників біоритмів вуглеводного обміну [1]. Останні два показника вираховували за допомогою програми Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP [9].

Усі маніпуляції та евтаназію тварин проводили відповідно до біоетичних норм поводження з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986 р.) та рекомендацій Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001 р.) [9]. Протокол дослідження схвалено локальним етичним комітетом (протокол від 18 березня 2015 р. № 3).

Результати та їх обговорення. За умов розвитку гострого парацетамолового гепатиту вміст глюкози в сироватці крові тварин обох статей не зазнавав достовірно значущих змін порівняно з інтактними тваринами, що підтверджується несуттєвими змінами величини мезора з $(7,69 \pm 0,23)$ до $(7,44 \pm 0,26)$ мкмоль/л у самиць та з $(5,97 \pm 0,14)$ до $(6,77 \pm 0,11)$ мкмоль/л у самців і амплітуди ритму з $(0,91 \pm 0,36)$ до $(0,80 \pm 0,21)$ мкмоль/л у самиць та з

$(1,57 \pm 0,30)$ до $(1,09 \pm 0,39)$ мкмоль/л у самців (табл. 1, 2). Проте спостерігали десинхроноз циркадіанного ритму вмісту глюкози, який характеризувався зміщенням періоду акрофази ритму у тварин обох статей з 03.00 на 21.00, тоді як батифазу спостерігали о 09.00 у самиць та самців, як і в інтактних тварин (табл. 1).

Одночасно відбувалося зменшення вмісту глікогену в умовах парацетамолового гепатиту в усіх циркадіанних групах самиць та самців. Зокрема, моделювання патології о 03.00 характеризувалося достовірним зменшенням вмісту глікогену на 39 % у самиць та на 53 % у самців порівняно з інтактними тваринами, тоді як у часовій групі 09.00 уміст глікогену в аналогічних умовах достовірно знижувався на 44 та 48 % відповідно. Найменш виразне зменшення вмісту даного показника спостерігалося о 15.00 – на 6 % у самиць та на 15 % у самців, тоді як о 21.00 – на 33 % та 20 % відповідно (табл. 1). Суттєве зменшення вмісту глікогену в печінці щурів з патологією підтверджується достовірним зниженням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців, тоді як амплітуда ритму зменшувалася в 2 рази в самиць та була практично незмінною в самців (табл. 2). Акрофаза вмісту глікогену в самиць та самців зміщувалася з 03.00 на 15.00 зі збереженням батифази (09.00), характерної для інтактних тварин обох статей (табл. 1).

Уміст кортикостерону, як і глюкози, не мав достовірно значущих відмінностей у тварин з гепатитом та інтактних, що підтверджується несуттєвими змінами величини мезора з $(89,85 \pm 2,07)$ до $(83,83 \pm 1,60)$ пкг/мл у самиць та з $(97,94 \pm 2,46)$ до $(104,68 \pm 2,37)$ пкг/мл у самців і амплітуди ритму з $(49,64 \pm 3,62)$ до $(39,17 \pm 1,17)$ пкг/мл у самиць та з $(51,09 \pm 2,31)$ до $(48,49 \pm 5,85)$ пкг/мл у самців. Періоди акрофази (03.00 – самиці та самці) та батифази (15.00 – самиці; 09.00 – самці) ритму вмісту кортикостерону тварин з гепатитом синфазні таким у інтактних щурів (табл. 1, 2).

Таким чином, результати досліджень свідчать про циркадіанну селективність

**Циркадіанні ритми вуглеводного обміну
за умов гострого парацетамолового гепатиту (n = 8)**

Показник	Група тварин	03.00	09.00	15.00	21.00
Самиці					
Глюкоза, мкмоль/л	Інтактний контроль	8,49 ± 0,50	7,04 ± 0,59	7,06 ± 0,49	8,16 ± 0,79
	Гепатит	7,04 ± 0,49	6,79 ± 0,19	7,65 ± 0,37	8,27 ± 0,51
Глікоген, мг/г	Інтактний контроль	3,04 ± 0,20 [#]	1,85 ± 0,18	2,25 ± 0,21	1,96 ± 0,19
	Гепатит	1,85 ± 0,18 ^{*/&}	1,03 ± 0,10 [*]	2,12 ± 0,16 ^{&}	1,32 ± 0,19 [*]
Зміна показника відносно контролю		↓39 %	↓44 %	↓6 %	↓33 %
Кортикостерон, пкг/мл	Інтактний контроль	139,97 ± 6,35 [#]	60,52 ± 1,03 [#]	52,12 ± 0,81	106,80 ± 4,90 [#]
	Гепатит	121,48 ± 1,58 ^{&}	67,12 ± 11,23 ^{&}	50,35 ± 1,12 ^{&}	98,17 ± 2,00 ^{&}
Самці					
Глюкоза, мкмоль/л	Інтактний контроль	7,07 ± 0,43 [#]	4,34 ± 0,18	5,46 ± 0,35 [#]	7,01 ± 0,70
	Гепатит	6,42 ± 0,60	5,64 ± 0,34	7,46 ± 0,49 ^{&}	7,56 ± 0,24 ^{&}
Глікоген, мг/г	Інтактний контроль	3,02 ± 0,10 [#]	1,92 ± 0,15	2,40 ± 0,11 [#]	1,76 ± 0,06
	Гепатит	1,43 ± 0,16 [*]	0,99 ± 0,10 [*]	2,04 ± 0,06 ^{*/&}	1,41 ± 0,19
Зміна показника відносно контролю		↓53 %	↓48 %	↓15 %	↓20 %
Кортикостерон, пкг/мл	Інтактний контроль	146,12 ± 4,67 [#]	57,17 ± 2,32	66,84 ± 6,80	121,65 ± 4,63 [#]
	Гепатит	131,94 ± 4,90 ^{&}	65,33 ± 12,22	74,68 ± 9,40	124,85 ± 5,10 ^{&}

Примітка. Тут і в табл. 2: ^{*}Відхилення показника достовірно значуще відрізняється від показника інтактних тварин ($p < 0,05$), [#]відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі інтактних тварин ($p < 0,05$), [&]відхилення показника достовірно значуще відрізняється від мінімального показника в групі тварин з гепатитом ($p < 0,05$), n – кількість тварин у групі.

прояву гепатотоксичних властивостей парацетамолу щодо вуглеводного обміну, зокрема, у нічний та ранковий період введення парацетамолу спричинює найвиразніше зниження вмісту глікогену в гепатоцитах, тоді як при денному введенні зменшення вмісту глікогену під впливом парацетамолу характеризується мінімальними змінами, а при вечірньому – проміжним зниженням протягом доби. Вищенаведена циркадіанно детермінована властивість парацетамолу знижувати вміст глікогену в гепатоцитах за гострого парацетамолового гепатиту може бути пов'язаною з добовою залежністю токсичної дії ксенобіо-

тика на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Відомо, що парацетамол у терапевтичних дозах метаболізується за участю системи глутатіону, але у випадку передозування (що й спостерігалось при моделюванні гострого гепатиту) концентрація токсичних метаболітів парацетамолу перевищує компенсаторні можливості організму. Токсичні метаболіти, що утворюються в результаті біотрансформації парацетамолу системою цитохрому P450 (зокрема, N-ацетилбензохінонімін), здатні до взаємодії з цитолемою та клітинними мембранами органел гепатоцитів, внаслідок чого активуються процеси ВРО

Хронобіологічна характеристика вуглеводного обміну в інтактних тварин та за умов гострого парацетамолового гепатиту (циркадіанний ритм)

Показник	Інтактний контроль		Гепатит	
	Мезор	Амплітуда	Мезор	Амплітуда
Самиці				
Глюкоза, мкмоль/л	7,69 ± 0,23	0,91 ± 0,36	7,44 ± 0,26	0,80 ± 0,21
Глікоген, мг/г	2,27 ± 0,09	0,40 ± 0,13	1,58 ± 0,03*	0,20 ± 0,09*
Кортикостерон, пкг/мл	89,85 ± 2,07	49,64 ± 3,62	83,83 ± 1,60	39,17 ± 1,17
Самці				
Глюкоза, мкмоль/л	5,97 ± 0,14	1,57 ± 0,30	6,77 ± 0,11	1,09 ± 0,39
Глікоген, мг/г	2,27 ± 0,07	0,32 ± 0,05	1,47 ± 0,07*	0,37 ± 0,11
Кортикостерон, пкг/мл	97,94 ± 2,46	51,09 ± 2,31	104,68 ± 2,37	48,49 ± 5,85

фосфоліпідів біологічних мембран, що призводить до інактивації і солюбілізації зв'язаних з мембраною ферментів, розладу процесів тканинного дихання, пластичного обміну, окиснювального фосфорилування та енергопродукції клітини, що й призводить до зниження вмісту глікогену [11]. Оскільки виразність десинхронотичної дії парацетамолу на систему ПОЛ-АОЗ не однакова залежно від часу моделювання патології, то й відповідно по різному протягом доби буде проявлятися десинхроноз діяльності гепатоцитів і зменшення вмісту глікогену в них. Щодо зміни рівня глюкози на тлі парацетамолового гепатиту, то десинхроноз ритму даного показника характеризувався зміщенням періодів акрофази та батифази, тоді як для рівня кортикостерону зберігалася архітектоніка циркадіанного ритму, характерна для інтактних тварин.

Висновки

1. За умов гострого парацетамолового гепатиту порушується циркадіанний ритм вмісту глюкози в сироватці крові, а саме: зміщується період акрофази з 03.00 на 21.00 у самиць та самців порівняно з інтактними тваринами, тоді як величина мезора ритму вмісту глюкози та амплітуда ритму змінюються несуттєво.

2. Зниження вмісту глікогену в печінці за умов патології підтверджується достовірним зменшенням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців порівняно з інтактними тваринами. Найвиразніше зменшення вмісту глікогену спостерігали о 09.00 у самиць (на 44 %) та о 03.00 у самців (на 53 %), а мінімальні зміни даного показника в щурів обох статей реєстрували о 15.00 (на 6 % у самиць та на 15 % у самців).
3. Моделювання гострого парацетамолового гепатиту не супроводжувалося змінами циркадіанного ритму вмісту кортикостерону, про що свідчить збереження архітектоніки ритму, характерної для інтактних щурів.
4. Аналіз отриманих результатів щодо токсичного впливу парацетамолу на циркадіанні ритми показників вуглеводного обміну свідчить про відсутність суттєвих статевих відмінностей у порушенні біоритмів під впливом даного ксенобіотика.
5. Встановлені хроноособливості змін вуглеводного обміну за умов гострого парацетамолового гепатиту слід враховувати при аналізі результатів хронофармакологічних доклінічних досліджень гепатопротекторів.

1. Хронофармакологія наглядно (Хронофармакологія в таблицях и рисунках): Справочник – учебное пособие / С. М. Дроговоз [и др.]. – Харьков : Титул, 2014. – 128 с.
2. Cugini P. Chronobiology: Principles and Methods / P. Cugini // Annali Istituto Superiore di Sanità – 1993. – V. 29. – P. 483–500.

3. Дроговоз С. М. Оптимізація режиму прийому пара-ацетамінофенолу з врахуванням біоритмів печінки: інфор. Лист Укрмедпатентінформу МОЗ України № 276-2015 / С. М. Дроговоз, К. О. Калько, Н. В. Захарко. – Київ, 2015. – 4 с.
4. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам группы лекарств для печени / А. В. Матвеев. – Симферополь : ИТ «Ариал», 2013. – 384 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ; Под. ред. докт. мед. наук. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
6. Мешкова Н. П. Практикум по биохимии. Определение гликогена с антроном / Н. П. Мешкова, С. Е. Северин. – Москва : Издательство Московского университета, 1979. – С. 41–43.
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. Карп В. П. Вычислительные методы анализа в хронобиологии и хрономедицине / В. П. Карп, Г. С. Катинас. – С. : СПб, 1997. – 115 с.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
11. Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу / К. О. Калько, С. М. Дроговоз, Н. В. Захарко, Т. К. Юдкевич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 1 (47) – С. 81–86.

**К. О. Калько, С. М. Дроговоз, А. В. Кононенко, Н. В. Захарко,
Т. В. Горбач, О. Я. Мищенко, Н. В. Бездітко**

Циркадіанні біоритми вуглеводного обміну в щурів за умов гострого парацетамолового гепатиту

Мета дослідження – встановлення циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за фізіологічних умов та їхній десинхроноз за умов гострого парацетамолового гепатиту в щурів.

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. Дослідження проводили через 24 год після введення ксенобіотика. Циркадіанні ритми вуглеводного обміну оцінювали за вмістом глюкози, глікогену та кортикостерону.

Встановлено, що десинхроноз циркадіанних ритмів вуглеводного обміну за умов гострого парацетамолового гепатиту характеризується зміщенням періоду акрофази циркадіанного ритму вмісту глюкози в тварин обох статей з 03.00 на 21.00, тоді як порушення циркадіанного ритму вмісту глікогену відзначається достовірним зменшенням мезора ритму даного показника на 31 % у самиць та на 35 % у самців відносно інтактних тварин. Найвиразніше зменшення вмісту глікогену спостерігали о 09.00 у самиць (на 44 %) та о 03.00 у самців (на 53 %), а мінімальні зміни даного показника в щурів обох статей реєстрували о 15.00 (на 6 % у самиць та на 15 % у самців). За умов парацетамолового гепатиту циркадіанний ритм вмісту кортикостерону не зазнавав змін та характеризувався аналогічною інтактним тваринам архітектонікою. Отриманні результати слід враховувати з метою адекватної оцінки результатів експериментів при вивченні традиційних і перспективних гепатопротекторів.

Ключові слова: печінка, парацетамол, вуглеводний обмін, циркадіанний ритм

**Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, А. В. Кононенко, Н. В. Захарко,
Т. В. Горбач, О. Я. Мищенко, Н. В. Бездетко**

Циркадианные биоритмы углеводного обмена у крыс в условиях острого парацетамолового гепатита

Цель исследования – установление циркадианных ритмов углеводного обмена в физиологических условиях и их десинхроноз при остром парацетамоловом гепатите.

Исследования проводили на крысах обоего пола на модели острого парацетамолового гепатита, который моделировали однократным введением парацетамола в дозе 1000 мг/кг в следующие периоды суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00). Исследование проводили через 24 ч после введения ксенобиотика. Циркадианные ритмы углеводного обмена оценивали по содержанию глюкозы, гликогена и кортикостерона.

Установлено, что десинхроноз циркадианных ритмов углеводного обмена в условиях острого парацетамолового гепатита характеризуется смещением периода акрофаза циркадианного ритма содержания глюкозы у животных обоего пола с 03.00 на 21.00, тогда как нарушение циркадианного ритма содержания гликогена проявляется достоверным уменьшением мезора ритма данного показателя на 31 % у самок и на 35 % у самцов относительно интактных животных. Наиболее выраженное уменьшение содержания гликогена наблюдали в 09.00 у самок (на 44 %) и в 03.00 у самцов (на

53 %), а минимальное изменение данного показателя у крыс двух полов регистрировали в 15.00 (на 6 % у самок и на 15 % у самцов). В условиях парацетамолового гепатита циркадианный ритм содержания кортикостерона не изменялся и характеризовался аналогичной интактным животным архитектоникой. Полученные данные следует учитывать с целью адекватной оценки результатов экспериментов при изучении традиционных и перспективных гепатопротекторов.

Ключевые слова: печень, парацетамол, углеводный обмен, циркадианный ритм

**E. A. Kalko, S. M. Drogovoz, A. V. Kononenko, N. V. Zacharko,
T. V. Gorbach, O. Ya. Mischenko, N. V. Bezdetko**

**Circadian biorhythms of carbohydrate metabolism in rats under acute
paracetamol hepatitis**

The aim of the study was to establish the circadian rhythms of carbohydrate metabolism under physiological conditions and their desynchronization under acute hepatitis caused by paracetamol.

Investigations were carried out on rats of the two sexes in the model of acute hepatitis that was modeled by paracetamol in the following periods of the day: morning (09.00), day (15.00), evening (21.00) and night (03.00) by a single administration of paracetamol at a dose of 1000 mg/kg of body weight. The animals were decapitated in 24 h after administration of the xenobiotic. Circadian rhythms of carbohydrate metabolism was evaluated by glucose, glycogen and corticosterone levels.

It was found that desynchronization of circadian rhythms of carbohydrate metabolism in acute hepatitis caused by paracetamol is characterized by a shift period of acrophase of circadian rhythm of glucose in animals of both sexes from 03.00 to 21.00, while the violation of the circadian rhythm of glycogen manifested by significant reduction of mezo rate of this index by 31 % in females and 35 % in males as to intact animals. The most pronounced decrease in glycogen content occurs at 09.00 in females (44 %) and 03.00 in males (53 %) and minimal changes in this index in rats of both sexes were recorded at 15.00 (6 % in females and 15 % males). In terms of paracetamol hepatitis circadian rhythm of corticosterone content did not change and was characterized by a similar to intact animals architectonic. The data obtained should be taken into account for the purpose of adequate evaluation of the experimental results in studying both traditional and perspective hepatoprotectors.

Key words: liver, paracetamol, carbohydrate metabolism, circadian rhythm

Надійшла: 23 лютого 2016 р.

Контактна особа: Калько Катерина Олександрівна, аспірант, кафедра фармакології та лікарської токсикології, Національний фармацевтичний університет, м. Харків.
Електронна пошта: kalko_sonkina@mail.ru

В. Л. Карбовський¹, І. А. Шевчук¹, О. В. Куркіна¹, Т. Є. Маковська²

Дослідження впливу препарату «Хондросат» на перебіг експериментального ад'ювантного артриту в щурів

¹ТОВ «Фармацевтичний завод «Біофарма»», м. Біла Церква²Головний військовий медичний госпіталь, м. Київ

Ключові слова: ревматоїдний артрит, хондроїтину сульфат, хондропротектори, хондросат

Ревматоїдний артрит – це системне автоімунне захворювання, яке характеризується запаленням і деструкцією суглобів, а також розвитком синовіту, який погано піддається лікуванню [1]. З метою поліпшення якості життя, усунення больового синдрому та поліпшення рухової функції уражених суглобів хворим на ревматоїдний артрит призначають ненаркотичні анагетики та нестероїдні протизапальні препарати, які здійснюють анагезуючу, жарознижувальну, протизапальну дію [2]. Проте, не зважаючи на очевидний терапевтичний ефект, ці ліки усувають тільки симптоми, а при довготривалому застосуванні можуть негативно впливати на діяльність органів шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної, імунної та видільної систем [3, 4]. Крім того, симптоматичне лікування не вирішує проблему деструкції хрящової тканини в суглобах. Тому сьогодні актуальними є дослідження ефектів речовин, які могли б усувати як біль, так і структурну деградацію [5]. Одним з досягнень сучасної фармакотерапії є розробка хондропротекторів – групи лікарських засобів, здатних впливати на симптоми та модифікувати структуру хрящової тканини [6]. Сучасні хондропротектори містять структурні елементи натуральної хрящової тканини, зокрема, хондроїтину сульфат (ХС), який є одним з основних компонентів позаклітинного матриксу сполучної тканини хряща, і класифікується Європейським агентством з лікарських засобів як біологічно активна речовина [7].

Так, показано, що в хондроцитах, виділених з хряща пацієнтів з остеоартритом, препарати ХС модулюють експресію низки структурних білків, факторів росту та білків позаклітинного матриксу [8]. Окрім того, ХС пригнічує синтез простагландину Е2, інтерлейкіну-6 та С-реактивного білка, а також катаболічну активність хондроцитів [9]. Завдяки цьому ХС здійснює позитивний вплив, створюючи передумови для формування сталого хряща. Саме тому ХС як один з симптоматичних препаратів уповільненої дії рекомендовано Європейською антиревматичною лігою (EULAR) та Європейським товариством з клінічних та економічних аспектів остеопорозу та остеоартриту (ESCEO) для лікування пацієнтів з артритом та артрозами колінного суглоба та стегна [10, 11]. Згідно з даними джерел літератури, наявна в шлунково-кишковому тракті мікрофлора здатна руйнувати ХС, який надійшов *per os*, – він частково десульфатується та деполімеризується [12–14]. Тому особливу зацікавленість викликають ін'єкційні форми хондропротекторів, зокрема, новий препарат «Хондросат» виробництва ТОВ «Фармацевтичний завод «Біофарма». Успішна розробка та впровадження в лікарську практику нових препаратів потребує ретельних доклінічних досліджень.

Мета дослідження – вивчити вплив препарату «Хондросат» на перебіг експериментального ад'ювантного артриту в щурів.

Матеріали та методи. Оцінку специфічної фармакологічної активності препарату «Хондросат» (ТОВ «Фармацевтичний завод «Біофарма», м. Біла Церква, розчин для ін'єкцій 100 мг/мл

по 2 мл у ампулі) проводили на моделі ад'ювантного артриту (АА), що є найнаближенішою до ревматоїдного артриту людини [15]. Для створення цієї патології щурам у праву кінцівку субплантарно вводили по 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда («Difco laboratory», США) [16]. Починаючи з 14 доби, тваринам щоденно впродовж 10 діб внутрішньоочередово вводили «Хондросат» у терапевтичній дозі – 35 мг/кг. Референтним препаратом був обраний «Мукосат нео» («Белмедпрепараты», м. Мінськ, Білорусь, розчин для ін'єкцій 100 мг/мл по 2 мл у ампулі).

Досліди проведено на 24 білих нелінійних щурах обох статей масою 170–190 г. Лабораторних тварин утримували у віварії згідно з стандартними санітарними нормами, на відповідному харчовому раціоні [17]. Усі дослідження виконані згідно з правилами «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних і інших наукових цілях» [18]. Щури були поділені на 4 групи: перша – інтактний контроль (n = 6); друга – тварини з експериментальним АА (n = 6); третя – тварини з експериментальним АА + «Хондросат» (n = 6); четверта – тварини з експериментальним АА + «Мукосат нео» (n = 6).

Ефективність впливу препаратів на розвиток і перебіг експериментального АА оцінювали за анальгетичним ефектом, зменшенням набряку кінцівок, вмістом у плазмі крові біохімічних маркерів стану суглобів. Анальгетичний ефект оцінювали на 24 добу на моделі теплової імєрсії, вимірюючи латентний період реакції відсмикування хвоста після його занурення у водяну баню при температурі ($50,0 \pm 0,2$) °C [16].

Розмір гомілкового суглоба вимірювали планіметрично в самій широкій його частині на всіх етапах дослідження (0, 14 та 24 доби). Уміст у плазмі крові біохімічних маркерів – серомукоїдів [19] та глікозаміногліканів [20] визначали після закінчення експерименту (24 доба).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм STATISTICA 6.0 (statsoft, USA), використовуючи t критерій Ст'юдента [21]. Значущими вважали відмінності між контролем і дослідом при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Досліджено зміни больового порогу у відповідь на термічний подразник упродовж формування та лікування артриту. Результати досліджень показали, що на 24 добу дослідження щури з АА на 24,3 % ($p < 0,05$) швидше відсмикують хвіст від джерела тепла, ніж інтактні тварини (табл. 1).

Після курсового лікування обома препаратами в усіх тварин спостерігається послаблення больового синдрому. Проте якщо в III групі значення порога больової чутливості наближалося до такого у інтактних тварин, то в IV цей показник залишався значущо меншим щодо I групи – на 12,9 % ($p < 0,05$). Отже, «Хондросат» має вищу анальгетичну активність ніж референтний препарат «Мукосат нео».

Відомо, що пік запальної реакції при експериментальному АА припадає на 14 добу [15, 16]. У цей термін у всіх групах тварин з експериментальною патологією спостерігали збільшення розмірів ушкодженого суглоба

У групі II – на 22,2 %, у групі III – на 20,5 %, у групі IV – на 17,5% щодо

Таблиця 1

Зміни порога больової чутливості у щурів з ад'ювантним артритом під впливом препаратів «Хондросат» і «Мукосат нео» на 24 добу дослідження, $M \pm m$, n = 6

Показник	Група тварин			
	Інтактний контроль (I)	Ад'ювантний артрит (II)	Ад'ювантний артрит + Хондросат (III)	Ад'ювантний артрит + Мукосат нео (IV)
Латентний період, хв	$120,3 \pm 3,47$	$91,0 \pm 2,31^*$	$112,5 \pm 5,89$	$104,7 \pm 4,58^*$

Примітка. * $p < 0,05$ щодо інтактного контролю.

вихідного рівня (табл. 2). На 24 добу експерименту в щурів з АА (група II) розмір гомілкового суглоба перевищував вихідний рівень на 29,9 %. При цьому в III групі тварин об'єм набряку задньої кінцівки був більшим вихідного рівня на 15,6 %, а в IV – на 18,2 %. Отже, після 10-денного лікування досліджуваними препаратами спостерігається зменшення розмірів ушкоджених суглобів. Антиексудативна активність «Хондросату» була більш вираженою, оскільки у цієї групи щурів (III) об'єм набряку зменшився на 10,7 %, а при дії «Мукосат нео» (IV група) – на 6,4 % щодо нелікованих тварин (група II).

Різноманітні запальні захворювання, до яких належить і ревматоїдний артрит, супроводжуються збільшенням концентрації в плазмі крові гексоз, зв'язаних з серомукоїдами. Оскільки останні, як і глюкозаміноглікани, входять до складу сполучної тканини, у разі її пошкодження або руйнування ці мукопротеїди потрапляють у системний кровотік. Вони є маркерами пошкодження суглобів, які відображають інтенсивність та поширеність запального процесу, і дозволяють більш об'єктивно оцінити ступінь

деструкції хряща та ефективність лікування [16]. Результати досліджень показали, що у тварин з АА на 24 добу дослідження вміст серомукоїдів у плазмі крові збільшився на 550 %, тобто у 6,5 разу, а глюкозаміногліканів на 53,4 % порівняно з показниками інтактних тварин (табл. 3).

Лікування впродовж 10 діб препаратом «Хондросат» (тварини III групи) призвело до зниження рівня серомукоїдів на 47,4 % ($p < 0,05$), а глюкозаміногліканів на 17,6 % щодо відповідних значень у щурів групи II. Водночас у тварин, яким вводили препарат «Мукосат нео», концентрації цих сполук щодо їх рівня в щурів з АА зменшилися на 19,2 та 7,2 % відповідно. Отже, здатність препаратів, які містять хондроїтину сульфат, знижувати рівень серомукоїдів та глюкозаміногліканів у крові може свідчити про ефективність лікування, деяке відновлення сполучної тканини, нормалізацію стану й функцій суглобів. При цьому кращу протизапальну та відновлювальну дію демонструє «Хондросат». У референтного препарату «Мукосат нео» ці властивості менш виражені.

Таблиця 2

Динаміка розмірів суглобів у щурів упродовж перебігу та після лікування експериментального ад'ювантного артриту, мм, $M \pm t$, $n = 6$

Доба досліджу	Група тварин		
	Ад'ювантний артрит (II)	Ад'ювантний артрит + Хондросат (III)	Ад'ювантний артрит + Мукосат нео (IV)
Вихідний рівень	24,00 $\pm$ 0,68	24,07 $\pm$ 0,42	24,67 $\pm$ 0,84
14	29,33 $\pm$ 0,88*	29,00 $\pm$ 0,68*	29,00 $\pm$ 0,89*
24	31,17 $\pm$ 0,60*	27,83 $\pm$ 0,48**	29,17 $\pm$ 0,54**

Примітка. * $p < 0,05$ щодо вихідного рівня, ** $p < 0,05$ щодо показника групи ад'ювантного артриту.

Таблиця 3

Концентрація серомукоїдів та глюкозаміногліканів у сироватці крові щурів за ад'ювантного артриту та впливу препаратів «Хондросат» і «Мукосат нео» на 24 добу дослідження

Показник	Група тварин			
	Інтактний контроль (I)	Ад'ювантний артрит (II)	Ад'ювантний артрит + Хондросат (III)	Ад'ювантний артрит + Мукосат нео (IV)
Серомукоїди, у. о.	0,12 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,03*	0,41 $\pm$ 0,03#	0,63 $\pm$ 0,05
Глюкозаміноглікани, мг/100 мл	0,81 $\pm$ 0,21	1,25 $\pm$ 0,22*	1,03 $\pm$ 0,26	1,16 $\pm$ 0,33

Примітка. * $p < 0,05$ щодо групи інтактного контролю; # $p < 0,05$ щодо групи ад'ювантного артриту.

Висновок

Розчин для ін'єкцій «Хондросат» має позитивний терапевтичний ефект при лікуванні ад'ювантного артриту в щурів. Після 10-денного внутрішньочеревинного застосування у тварин з експериментальною патологією підвищується поріг больової чутливості,

зменшуються розміри суглобів, а також уміст серомукоїдів та глюкозаміногліканів у сироватці крові. Антиноцицептивна, протизапальна та модифікуюча хондропротекторна активність препарату «Хондросат» більш виражена, ніж у референтного препарату «Мукосат нео».

1. Митрофанов В. А. Новая технология лечения аутоиммунных артритов (экспериментальное исследование) / В. А. Митрофанов, М. В. Федотова, Б. Я. Позднякова, Е. В. Гладкова // Травма. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 277–281.
2. Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis / Tanaka Y. // Korean J. Intern. Med. – 2016. – V. 31(2). – P. 210–218.
3. Зупанець І. А. До характеристики гастротоксичної дії нестероїдних протизапальних засобів – неселективних, селективних і специфічних інгібіторів ЦОГ-2 / І. А. Зупанець, Е. А. Андреева // Ліки України. – 2005. – № 4. – С. 113–114.
4. Characteristics and clinical outcome of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute hepatonephrotoxicity among Chinese patients. / Cao Y. L., Tian Z. G., Wang F. [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2014 – V. 20(38). – P. 13956–13965.
5. Symptom and structure modification in osteoarthritis with pharmaceutical-grade chondroitin sulfate: What's the evidence? / Hochberg M., Chevalier X., Henrotin Y. [et al.] // Curr. Med. Res. Opin. – 2013. – V. 29. – P. 259–267.
6. Носівець Д. С. Фармакологія хондропротекторів (огляд фармацевтичного ринку України) / Д. С. Носівець // Вісник проблем біології і медицини. – 2013 – Т. 1 (104), Вип. 4. – С. 57–63.
7. Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures—Human (CMDh). Overview of Biological Active Substances of Non-Recombinant Origin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/procedural_guidance/Compilation_Biological_Active_Substance_non-recombinant_origin.pdf (accessed on 21 November 2014).
8. Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes / Calamia V., Fernandez-Puente P., Mateos J. [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2012. – Jun 11 (6). – P. M111.013417.
9. Variable effects of 3 different chondroitin sulfate compounds on human osteoarthritic cartilage/chondrocytes: Relevance of purity and production process / Tat S. K., Pelletier J. P., Mineau F. [et al.] // J. Rheumatol. – 2010. – V. 37. – P. 656–664.
10. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). / Bruyere O., Cooper C., Pelletier, J. P. [et al.] // Semin. Arthritis Rheum. – 2014 – V. 44. – P. 253–263.
11. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISt) / Zhang W., Doherty M., Arden N. [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – V. 64. – P. 669–681.
12. Characterization of a bacteroides species from human intestine that degrades glycosaminoglycans / Ahn M. Y., Shin K. H., Kim D.-H. [et al.] // Can. J. Microbiol. – 1998. – V. 44. – P. 423–429.
13. Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate / Conte A., Volpi N., Palmieri L. [et al.] // Arzneimittel-Forschung. – 1995. – V. 45(8). – P. 918–925.
14. Volpi N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf®) and its constituents in healthy male volunteers / Volpi N. // Osteoarthritis and Cartilage. – 2002. – V. 10. – P. 768–777.
15. Саратиков А. С. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия) / А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, Т. П. Прищеп. – Томск, 1983. – 104 с.
16. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авідена, 2001. – 528 с.
17. Настанова СТ-НМОЗУ 42-6.0:2008. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика (видання офіційне) / О. Стефанов, Т. Бухтіарова, В. Коваленко [та ін.] – Київ : Моріон, 2009. – С. 37–68.
18. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
19. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Минск, 2000. – Т. 2. – С. 64–66.
20. Метод определения глюкозаминогликанов в биологических жидкостях / П. Н. Шараев, В. Н. Пишков, Н. И. Соловьева [и др.] // Лабораторное дело. – 1987. – № 5. – С. 330–332.
21. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – 3-е изд. – Москва: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

В. Л. Карбовський, І. А. Шевчук, О. В. Куркіна, Т. Є. Маковська
Дослідження впливу препарату «Хондросат» на перебіг експериментального
ад'ювантного артриту в щурів

Ревматоїдний артрит – це системне автоімунне захворювання, яке характеризується запаленням і деструкцією суглобів, а також розвитком синовіту, який погано піддається лікуванню. Одним з досягнень сучасної фармакотерапії є розробка хондропротекторів – групи лікарських засобів, здатних впливати на симптоми та модифікувати структуру хрящової тканини. Сучасні хондропротектори містять структурні елементи натуральної хрящової тканини, зокрема, хондроїтину сульфат, який є одним з основних компонентів позаклітинного матриксу сполучної тканини хряща і класифікується Європейським агентством з лікарських засобів як біологічно активна речовина.

Мета дослідження – вивчити вплив препарату «Хондросат» на перебіг експериментального ад'ювантного артриту в щурів.

Починаючи з 14 доби від початку розвитку експериментального ад'ювантного артриту тваринам однієї групи щоденно протягом 10 діб внутрішньоочеревинно вводили препарат «Хондросат», а іншої – референтний препарат «Мукосат нео» у терапевтичних дозах – 35 мг/кг. Ефективність лікування оцінювали за наступними показниками: розмір гомілкового суглоба, анагетичний ефект препаратів, уміст у плазмі крові біохімічних маркерів стану суглобів.

Показано, що після 10-денного застосування препарату «Хондросат» у щурів з експериментальним ад'ювантним артритом розмір суглобів зменшується на 10,7 % ($p < 0,05$), а під дією референтного препарату – на 6,4 % ($p < 0,05$). Концентрація серомукоїдів у сироватці крові щурів під впливом препарату «Хондросат» зменшилася на 47,4 % ($p < 0,05$), а у тварин, яким вводили «Мукосат нео» – на 19,2 % порівняно з показником у тварин з експериментальним ад'ювантним артритом. Концентрація глюкозаміногліканів у цих групах зменшилася на 17,6 та 7,2 % відповідно.

Розчин для ін'єкцій «Хондросат» має позитивний терапевтичний ефект при лікуванні ад'ювантного артриту в щурів. Антиноцицептивна, протизапальна та модифікуюча хондропротекторна активність препарату «Хондросат» більш виражена, ніж у референтного препарату «Мукосат нео».

Ключові слова: ревматоїдний артрит, хондропротектори, хондроїтину сульфат, хондросат

В. Л. Карбовский, И. А. Шевчук, О. В. Куркина, Т. Е. Маковская
Исследование влияния препарата «Хондросат» на течение
экспериментального адьювантного артрита у крыс

Ревматоидный артрит – это системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением и деструкцией суставов, а также развитием синовита, который плохо поддается лечению. Одним из достижений современной фармакотерапии является разработка хондропротекторов – группы лекарственных средств, способных влиять на симптомы и модифицировать структуру хрящевой ткани. Современные хондропротекторы содержат структурные элементы натуральной хрящевой ткани, в частности, хондроитина сульфат, который является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани хряща и классифицируется Европейским агентством по лекарственным средствам как биологически активное вещество.

Цель исследования – изучить влияние препарата «Хондросат» на течение экспериментального адьювантного артрита у крыс.

Начиная с 14 дня от начала развития экспериментального адьювантного артрита, животным одной группы ежедневно в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили препарат «Хондросат», а другой – референтный препарат «Мукосат нео» в терапевтических дозах – 35 мг/кг. Эффективность лечения оценивали по следующим показателям: размер голеностопного сустава, анальгетический эффект препаратов, содержание в плазме крови биохимических маркеров состояния суставов. Показано, что после 10-дневного применения препарата «Хондросат» у крыс с экспериментальным адьювантным артритом размер суставов уменьшается на 10,7 % ($p < 0,05$), а под действием референтного препарата – на 6,4 % ($p < 0,05$). Концентрация серомукоидов в сыворотке крови у крыс под влиянием препарата «Хондросат» уменьшилась на 47,4 % ($p < 0,05$), а у животных, которым вводили «Мукосат нео» – на 19,2 % по сравнению с показателями животных с экспериментальным адьювантным артритом. Концентрация глюкозаминогликанов в этих группах уменьшилась на 17,6 и 7,2 % соответственно.

Раствор для инъекций «Хондросат» имеет положительный терапевтический эффект при лечении адьювантного артрита у крыс. Антиноцицептивная, противовоспалительная и модифицирующая хондропротекторная активность препарата «Хондросат» более выражена, чем у референтного препарата «Мукосат нео».

Ключевые слова: ревматоидный артрит, хондропротекторы, хондроитина сульфат, хондросат

V. L. Karbovskyy, I. A. Shevchuk, O. V. Kurkina, T. Ye. Makovska
A study of influence of «Chondrosut» on the course of experimental adjuvant
arthritis in rats

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease characterized by inflammation and destruction of joints, as well as the development of synovitis, which is resistant to treatment. One of the achievements

of modern pharmacotherapy is development of chondroprotectors. It is a group of medical products that can influence the symptoms of rheumatoid arthritis and modify the structure of cartilage. Modern chondroprotectors containing structural elements of natural cartilage particularly chondroitin sulfate. It is main component of the extracellular matrix of connective tissue of cartilage. European Medicines Agency classifies chondroitin sulfate as a biologically active substance.

The aim of the study was to research influence of the medical product «Chondrosut» on the course of experimental adjuvant arthritis in rats.

Starting from 14 days from the onset of experimental adjuvant arthritis animals of one group were injected i.p. «Chondrosut» daily for 10 days. The other group were injected with reference product «Mukosat neo». Therapeutic dose of medical products for both groups was established as 35 mg/kg. Treatment efficacy was evaluated by the following parameters: the size of the ankle joint, the analgesic effect, serum levels of biochemical markers of joint health. The results demonstrate that after 10 days of «Chondrosut» injection, size of the joints in rats with experimental adjuvant arthritis was reduced by 10,7 % ($p < 0,05$), and under the influence of the reference drug – by 6,4 % ($p < 0,05$). Seromucoid concentration in serum of rats treated with «Chondrosut» decreased by 47,4 % ($p < 0,05$), while the animals treated with «Mukosat neo» – 9,2 %, relative to corresponding parameters in experimental adjuvant arthritis animals. The level of glycosaminoglycans in these groups decreased by 17,6 and 7,2 % respectively.

Therefore, injection «Chondrosut» has a positive therapeutic effect for the treatment of adjuvant arthritis in rats. Antinociceptive, anti-inflammatory and modifying chondroprotective activity of «Chondrosut» drug is more pronounced than the reference product «Mukosat neo».

Key words: rheumatoid arthritis, chondroprotectors, chondroitin sulfate, chondrosut

Надійшла: 4 березня 2016 р.

Контактна особа: Шевчук Інна Анатоліївна, кандидат біологічних наук, ТОВ «Фармацевтичний завод «Біофарма», буд. 37, вул. Київська, м. Біла Церква, 09100. Тел.: + 38 0 66 103 77 50.
Електронна пошта: publication@biofarma.ua

I. А. Лукіна, О. В. Мазулін, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова
**Експериментальне вивчення антиоксидантної
та гепатопротекторної активності екстракту
з трави *Polygonum persicaria* L.**

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: гірчак почечуйний,
антиоксидантна активність,
гепатопротекторна активність,
хронічна алкогольна інтоксикація

Пошук нових ефективних та безпечних лікарських засобів рослинного походження є однією з важливих задач сучасної медицини та експериментальної фармакології.

Сьогодні для успішного лікування багатьох захворювань нерідко застосовують численні лікарські засоби, які разом з високою ефективністю мають низку побічних ефектів, зокрема, гепатотоксичність. На відміну від легенів і нирок, які також страждають від токсичної дії препаратів, що вводяться внутрішньовенно та перорально, ураження печінки частіше виникають при ентеральному застосуванні, що пов'язано з особливостями кровопостачання печінки та метаболізму в ній лікарських засобів [1].

Отже, комплексна терапія захворювань печінки різного генезу вимагає використання безпечних багатофункціональних препаратів – гепатопротекторів, які сприяють збереженню та відновленню пошкоджених тканин печінки. Багаторічна медична практика довела, що фітопрепарати для лікування низки захворювань за ефективністю не поступають синтетичним аналогам, а через відсутність побічних дій і протипоказань мають переваги [2, 3].

Цінними компонентами рослинної сировини, які зумовлюють їхню антиоксидантну та гепатопротекторну активність є флавоноїди, амінокислоти [2, 4, 5]. Сьогодні широко застосовують з лікувальною метою лікарські засоби на основі розторопші плямистої, у якій

діючою речовиною є флавоноїди (флаволігнан – силімарин).

Одним з цінних джерел флавоноїдів та амінокислот є трава *Polygonum persicaria* L. (гірчак почечуйний, род. гречкові – *Polygonaceae*). Родина *Polygonaceae* налічує до 40 родів і понад 800 видів, представники якого поширені переважно в помірних областях обох півкуль і лише зрідка – у субтропіках. У країнах СНД ідентифіковано до 150 видів, у тому числі 18 – розповсюджені на території України. За рахунок умісту різноманітних біологічно активних речовин рослини цього роду виявляють гепатопротекторну, антиоксидантну, кровоспинну, протизапальну та ін. дії [4–6]. Дані щодо гепатопротекторної та антиоксидантної активності *Polygonum persicaria* L. у науковій літературі не знайдені, фармакологічні дослідження ліофілізованого екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. (ЛЕГ) раніше не проводилися.

Мета дослідження – провести експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. на моделі ураження печінки за хронічної алкогольної інтоксикації.

Матеріали та методи. На кафедрі фармакогнозії, фармхімії технології ліків Запорізького державного медуніверситету було розроблено та апробовано технологію отримання ліофілізованого порошку з трави *Polygonum persicaria* L. методом сублімаційної сушки (на лабораторній установці Christ Alpha 1-2 LD plus, Німеччина), яка дозволяє зберегти високий вміст стабільних і термолабільних біологічно активних речовин.

Експериментальну частину виконано на білих нелінійних щурах обох статей масою 165–170 г, одержаних з ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Розподіл тварин за статтю не проводили через нерівномірну чисельність самок і самців. Під час експерименту тварини знаходилися в стандартних умовах за температури 18–24 °С, вологості 50–60 %, природного світлового режиму «день-ніч», на постійному харчовому та питному режимі згідно з правилами утримання експериментальних тварин, встановлених Директивою Європейського Союзу 2010/63/EU та наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 1 березня 2012 р. № 249. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до міжнародних вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних і інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986 р.), правил GLP та методичних рекомендацій ДП «Державний експертний центр МОЗ України» [7–9]. Дослідження проводили в лабораторії ЦНДЛ при кафедрі фармакології та медичної рецептури ДЗ «Запорізький державний медичний університет», сертифікованій ДП «Державний експертний центр МОЗ України».

Щурів було розподілено на 4 групи по 10 тварин для вивчення гепатопротекторної активності: група інтактних тварин (інтактний контроль), група з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації (ХАІ) та 2 групи тварин з моделлю патології, одна з яких отримувала ЛЕГ, а інша референс-препарат.

Експериментальну хронічну алкогольну інтоксикацію (ХАІ) моделювали щоденним внутрішньошлунковим введенням щурам 15 % розчину етанолу в дозі 4 г/кг протягом 10 днів, наступні 10 днів вводили 15 % розчин етанолу зі збільшенням дози до 6 г/кг. Починаючи з 21 дня до закінчення експерименту щурам вводили 25 % розчин етанолу в дозі 4 г/кг. ЛЕГ вводили внутрішньошлунково за допомогою металевго зонда в дозі 100 мг/кг, один раз на одну добу, щоденно протягом 30 діб. Як розчинник використовували воду очищену [10].

Як референс-препарат у дослідженнях *in vivo* було обрано Гепабене («Merckle GmbH»/ «ratiopharm International GmbH», Німеччина) у дозі 100 мг/кг, у дослідях *in vitro* – Емоксипін (ФДУП «Московський ендокринний завод», Російська Федерація).

На 31 день експерименту проводили аналіз морфологічних і біохімічних показників. Гепатопротекторну активність ЛЕГ визначали за вмістом білірубіну, активністю трансаміназ (АлАТ, АсАТ), фосфатаз (лужної (ЛФ) та кислої (КФ)), визначали також показники тимолової проби та тривалість гексеналового сну. За активністю супероксиддисмутази (СОД), накопиченням продуктів окиснювальної модифікації білка – альдегідфенілгідразонів (АФГ) і карбоксифенілгідразонів (КФГ) у печінці оцінювали стан антиоксидантної та детоксикаційної системи печінки, процесів окислативного стресу [7, 12, 13].

Дослідження антиоксидантної активності (АОА) ЛЕГ також проводили *in vitro*. Для цього використовували метод оцінки АОА за інгібуванням окисної модифікації білка в цитозольній фракції печінки, викликаній реактивом Фентона [11].

Результати дослідження розраховували за допомогою стандартного статистичного пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk. Дані наведено у вигляді середнього значення. Вірогідність різниці між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента при нормальному розподілі. У разі розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann-Whitney. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $P < 0,05$ (95 %).

Результати та їх обговорення. Результати досліджень антиоксидантної та гепатопротекторної активності ЛЕГ наведено в таблицях 1, 2.

Виходячи з отриманих даних (табл. 1), у сироватці крові тварин контрольної групи суттєво підвищився рівень білірубину, активність АлАТ, АсАТ та фосфатаз (ЛФ, КФ) на тлі збільшення показника тимолової проби та тривалості гексеналового сну порівняно з показниками інтактного контролю. У групі ХАІ + ЛЕГ порівняно з групою контролю було зареєстровано достовірне зниження біохімічних маркерів ура-

ження печінки – активності трансаміназ (АлАТ, АсАТ), тимолової проби. Також за умов застосування ЛЕГ спостерігали певний вплив на холестаз, зокрема, тенденцію до помірного зменшення рівня білірубину та активності ЛФ в крові експериментальних тварин. Уведення ЛЕГ сприяло відновленню детоксикаційної функції печінки, про що свідчило достовірне зниження тривалості гексеналового сну. Виходячи з вищенаведеного, можна зробити висновок, що курсове введення тваринам ЛЕГ за умов ХАІ чинило виражену гепатопротективну дію.

Таблиця 1

Показники функції печінки за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації в щурів та застосування ліофілізованого екстракту з трави гірчака печечуйного, $M \pm m$ ($n = 10$)

Група тварин Показник	Інтактний контроль	Хронічна алкогольна інтоксикація (контроль)	Хронічна алкогольна інтоксикація + Ліофілізований екстракт з трави гірчака печечуйного	Хронічна алкогольна інтоксикація + Гепабене
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,70 ± 0,21	7,20 ± 0,47	6,50 ± 0,31	5,10 ± 0,41
АлАТ, ммоль/л·год	0,19 ± 0,01	1,89 ± 0,18*	0,97 ± 0,07**	1,11 ± 0,08**
АсАТ, ммоль/л·год	0,53 ± 0,04	1,57 ± 0,43*	0,87 ± 0,07**	0,98 ± 0,08**
ЛФ, мкмоль/л·с	0,63 ± 0,04	2,73 ± 0,11*	2,55 ± 0,07	2,71 ± 0,07
КФ, мкмоль/л·с	0,71 ± 0,03	2,33 ± 0,21*	1,92 ± 0,11	1,97 ± 0,12
Гексеналовий сон, хв	26,0 ± 1,8	48,10 ± 4,15*	31,7 ± 3,1**	34,5 ± 4,2**
Тимолова проба, од. помутніння	1,42 ± 0,11	9,12 ± 0,51*	5,00 ± 0,42**	6,77 ± 0,54**

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: * $P < 0,05$ відносно інтактного контролю;

** $P < 0,05$ відносно контрольної групи.

Таблиця 2

Показники оксидативного стресу в печінці щурів за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації та застосування ліофілізованого екстракту з трави гірчака печечуйного, $M \pm m$ ($n = 10$)

Група тварин Показник	Інтактний контроль	Хронічна алкогольна інтоксикація (контроль)	Хронічна алкогольна інтоксикація + Ліофілізований екстракт з трави гірчака печечуйного	Хронічна алкогольна інтоксикація + Гепабене
Активність СОД, у.о./мг білка·хв	268,0 ± 21,1	110,7 ± 8,2*	161,4 ± 8,1**	115,2 ± 10,2
Уміст АФГ, у.о./г білка	6,23 ± 0,51	21,2 ± 1,1*	14,20 ± 0,88**	17,2 ± 1,1**
Уміст КФГ, у.о./г білка	2,88 ± 0,21	12,50 ± 0,89*	7,80 ± 0,67**	11,8 ± 1,0

Моделювання ХАІ призводило до пригнічення активності ключового ферменту антиоксидантної системи гепатоциту – супероксиддисмутази (СОД) і активації оксидативного стресу, накопичення цитотоксичних продуктів окиснювальної модифікації білка печінки (АФГ, КФГ) (табл. 2).

На тлі ХАІ введення тваринам ЛЕГ сприяло помірному підвищенню активності СОД, що ймовірно пов'язано зі зниженням рівня супероксидрадикала, надлишок якого пригнічує активність цього ферменту. Відомо, що біологічно активні речовини, виділені з *Polygonum persicaria* L., здатні виступати як скаведжери активних форм кисню, так і більшою мірою гідрофільних вільних радикалів. Зниження концентрації маркерів окиснювальної модифікації білка в тканині печінки – АФГ і КФГ на фоні введення ЛЕГ вказує на здатність екстрактивних речовин гірчака почечуйного регулювати рівень гідрофільних вільних радикалів у клітині, зокрема, алкоксильних. З метою підтвердження механізмів АOA ЛЕГ були проведені дослідження його активності *in vitro* [11, 12]. Для оцінки АOA використовували метод інгібування окисної модифікації білка (ОМБ), викликаній реактивом Фентона. Отримані результати наведено в таблиці 3.

Окисна модифікація білкових структур клітин призводить до порушення мембранного потенціалу та процесів деполяризації, десенситизації рецепторів, метаболізму клітини, мітохондріальної дисфункції, надалі до ініціації

апоптозу [10]. Одним з ключових механізмів дії багатьох антиоксидантів-цитопротекторів є їхня здатність гальмувати процеси ОМБ і накопичення маркерів АФГ, КФГ [10]. У зв'язку з цим, перспективним напрямом є пошук препаратів, що гальмують процеси ОМБ.

Експерименти *in vitro* показали, що досліджуваний екстракт має бажану активність і за ступенем зниження вмісту АФГ та КФГ конкурує з активністю емоксипіну.

Таким чином, проведені дослідження показали, що на тлі ушкодження печінки за умов хронічної алкогольної інтоксикації застосування ЛЕГ у дозі 100 мг/кг чинить гепатопротекторну та антиоксидантну дію.

Отримані дані підтверджують, що така фармакологічна активність властива іншим представникам видів роду *Polygonum* L. [5, 6, 14]. Яскравими представниками видів роду *Polygonum* L. з гепатопротекторною та антиоксидантною дією є *Polygonum bellardii* All., *Polygonum odoratum* L., фармакологічну активність яких вивчали на моделях ураження печінки чотирехлористим вуглецем і ацетамінофеном відповідно [5, 14]. Отже, отримані в дослідженні дані повністю узгоджуються з інформацією інших наукових джерел.

Усе вищезазначене експериментально обґрунтовує застосування ЛЕГ як перспективної лікарської рослинної сировини для виробництва препаратів з гепатопротекторною й антиоксидантною дією.

Таблиця 3

Антиоксидантна активність ліофілізованого екстракту з трави гірчака почечуйного in vitro за інгібуванням окисної модифікації білка в тканині печінки, M ± m, n = 5

Група тварин \ Показник	АФГ, у. о./г білка	КФГ, у. о./г білка
Інтактний контроль	1,070 ± 0,002	1,37 ± 0,02
Контроль	9,95 ± 007*	6,870 ± 0,002*
Ліофілізований екстракт з трави гірчака почечуйного (10 ⁻⁷ г)	7,21 ± 0,01**	4,72 ± 0,02**
Емоксипін (10 М)	7,000 ± 0,002**	4,87 ± 0,01**

Висновки

1. Результати експериментів на щурах з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації свідчать, що курсове введення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. у дозі 100 мг/кг позитивно впливає на функціональний стан печінки, сприяє покращанню її детоксикаційної функції, характеризується гепатопротекторною та антиоксидантною активністю. За силою гепатопротекторної активності дослі-

джуваний екстракт конкурує з референс-препаратом Гепабене.

2. Досліджуваний екстракт проявляє антиоксидантну активність *in vitro* та за ступенем зниження маркерів окиснювальної модифікації білка не поступається емоксипіну.

3. Отримані дані експериментально обґрунтовують застосування екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. як перспективної лікарської рослинної сировини для виробництва препаратів гепатопротекторної та антиоксидантної дії.

1. Набока О. І. Гепатопротекторна дія екстракту ласкавцю золотистого за експериментального ураження печінки щурів тетрацикліном / О. І. Набока, С. З. Хуарі, О. Ю. Кошова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 2 (43). – С. 72–77.
2. Куркин В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных средств / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 1897–1901.
3. Попович В. П. Гепатопротекторний потенціал рослин: монографія / В. П. Попович, Б. П. Громошук, В. А. Сятиня. – Київ : Інтерсервіс, 2012. – 188 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. Antioxidant, hepatoprotective and antimicrobial activities of the aerial parts of *Polygonum bellardii* All. / Adel M. Abdel-Kader, Alaa M. Nafady, Amany S. Ahmed [et al.] // Bull. Pharm. Sci., Assiut University. – 2012. – V. 35, № 1. – P. 43–54.
6. Pharmacological and other Bioactivities of the Genus *Polygonum* – A Review / Dong X., Fu J., Yin X. [et al.] // Trop. J. Pharm. Res. – 2014. – V. 13, № 10. – P. 1749–1759.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації): за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена». – 2001. – 528 с.
8. European convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
9. Науково-методичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 156 с.
10. Соколик О. П. Спонтанний та індукований АФК *in vitro* апоптоз нейронів сенсомоторної кори щурів при хронічній алкоголізації: ефекти нейропротекторів / О. П. Соколик // Матеріали доповіді 76 Всеросійської наукової конференції з міжнародною участю «Молодіжна наука та сучасність», м. Курськ, Росія. – 2011. – С. 294.
11. Методи оцінки антиоксидантної активності речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідях *in vitro*: метод. реком. / І. Ф. Бєленічев, Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв, С. І. Коваленко. – Київ : ДФЦ МОЗ України, 2001. – 19 с.
12. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції / І. С. Чекман, І. Ф. Бєленічев, О. О. Нагорна [та ін.] // Методичні рекомендації. – Київ : ТОВ «Видавництво «Юстон», 2016. – 80 с.
13. Lundblad Roger L. / Hand book of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
14. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Polygonum odoratum* L. extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats / N. Somporn, R. Jitvaropas, S. Saenthaweesuk, Am. Thuppiya // Thammasat Medical Journal. – 2013. – V. 13, № 4. – P. 456–464.

І. А. Лукіна, А. В. Мазурін, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова **Експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності екстракту з трави *Polygonum persicaria* L.**

Мета дослідження – експериментальне вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. на моделі ураження печінки за хронічної алкогольної інтоксикації.

В експериментах на щурах з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації встановлено, що курсове введення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L. у дозі 100 мг/кг

позитивно впливає на функціональний стан печінки, сприяє покращанню її детоксикаційної функції, характеризується гепатопротекторною та антиоксидантною активністю. За силою гепатопротекторної активності досліджуваний екстракт конкурує з референс-препаратом Гепабене. Досліджуваний екстракт проявляє антиоксидантну активність *in vitro* та за ступенем зниження маркерів окиснювальної модифікації білка не поступається емоксипіну.

Отримані дані аргументують доцільність подальшого вивчення ліофілізованого водного екстракту з трави *Polygonum persicaria* L., що має антиоксидантну та гепатопротекторну активність, як засобу комплексної терапії, так і з профілактичною метою.

Ключові слова: гірчак печечуйний, антиоксидантна активність, гепатопротекторна активність, хронічна алкогольна інтоксикація

И. А. Лукина, А. В. Мазулин, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтиярова
Экспериментальное изучение антиоксидантной и гепатопротекторной активности экстракта травы *Polygonum persicaria* L.

Цель исследования – экспериментальное изучение антиоксидантной и гепатопротекторной активности лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria* L. на модели поражения печени при хронической алкогольной интоксикации.

В экспериментах на крысах с моделью хронической алкогольной интоксикации установлено, что курсовое введение лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria* L. в дозе 100 мг/кг оказывает положительное влияние на функциональное состояние печени, способствует улучшению ее детоксикационной функции, характеризуется гепатопротекторной и антиоксидантной активностью. По выраженности гепатопротекторного действия исследуемый экстракт конкурирует с референс-препаратом Гепабене. Он также проявляет антиоксидантную активность *in vitro* и по степени уменьшения маркеров окислительной модификации белка не уступает эмоксипину.

Полученные данные аргументируют целесообразность дальнейшего изучения лиофилизированного водного экстракта травы *Polygonum persicaria* L., обладающего антиоксидантной и гепатозащитной активностью, как средства комплексной терапии, так и с профилактической целью.

Ключевые слова: горец печечуйный, антиоксидантная активность, гепатопротекторная активность, хроническая алкогольная интоксикация

I. A. Lukina, A. V. Mazulin, A. V. Abramov, N. V. Bukhtiyarova
Experimental study of the antioxidant and hepatoprotective activities of the extract from the herb *Polygonum persicaria* L.

The aim of the study was experimental evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria* L. under liver damage model induced by chronic alcohol intoxication.

In experiments on rats under chronic alcohol intoxication it was found that course administration of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria* L. (100 mg/kg) demonstrates positive effects on the liver, improves its detoxification function, characterizes by antioxidant and hepatoprotective properties. The extract was not inferior to the reference drug by the strength of hepatoprotective effect. It also demonstrated antioxidant effect *in vitro* significantly decreased the level of oxidative stress markers.

The results obtained substantiate the further study the feasibility of lyophilized extract from the herb *Polygonum persicaria* L. having antioxidant and hepatoprotective activities as a means of complex therapy and preventive purposes as well.

Key words: *Polygonum persicaria* L., antioxidant activity, hepatoprotective activity, chronic alcohol intoxication

Надійшла: 30 грудня 2016 р.

Контактна особа: Лукіна Ірина Андріївна, аспірант, кафедра фармакогнозії, фармацевтичної технології ліків, Запорізький державний медичний університет.
Електронна пошта: lukina_iryana@u

С. М. Марчишин, А. О. Савич, О. П. Андріішин

Вплив збору антидіабетичного на гістологічний стан печінки щурів за умов моделювання цукрового діабету II типу

Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України»

Ключові слова: цукровий діабет, збір антидіабетичний, гістологічне дослідження, гепатоцити

Упродовж останніх років спостерігається значне зростання поширеності цукрового діабету (ЦД). В Україні станом на початок 2012 року число зареєстрованих хворих на ЦД перевищило 1,264 млн осіб. Кількість хворих на цукровий діабет у світі (366 млн осіб) неухильно зростає і за прогнозами в 2030 році може сягнути 552 млн [8].

ЦД становить серйозну медико-соціальну проблему в зв'язку з ураженням практично всіх органів і систем організму, зокрема, шлунково-кишкового тракту. Гіперглікемія, гіперліпідемія, порушення інших ланок обміну речовин нерозривно пов'язані з патологією печінки, що регулює вуглеводний та ліпідний обмін, депонує глікоген, бере участь у синтезі ліпопротеїнів дуже низької щільності. Порушення обміну речовин обов'язково асоціюється зі змінами функції печінки. ЦД II типу в більшості випадків пов'язаний з розвитком інсулінорезистентності (ІР), що призводить до надмірної маси тіла. Відомо, що ІР, окрім інших органів, розвивається й у печінці. Наслідком зниження чутливості гепатоцитів до інсуліну є зменшення гліюконеогенезу та збільшення синтезу жирних кислот та ліпопротеїнів. Розвивається жирова дистрофія (стеатоз) печінки, збільшуються її розміри, виникає ферментативна недостатність. Синтез ліпопротеїнів дуже низької щільності призводить до посилення ліпідемії та атерогенності крові, розвитку та прогресування ожиріння. При стеатозі та склеротичних змінах печінки відбувається формуван-

ня портальної, а потім і системної гіпертензії. Зазначені ураження печінки пов'язані з усіма компонентами патогенезу ЦД II типу, і це обов'язково слід враховувати при проведенні терапії [3].

Саме тому фітотерапія може бути використана як допоміжний метод при лікуванні та профілактиці ЦД, оскільки проявляє системну дію на організм та впливає на всі ланки метаболізму, зокрема, функціональну активність печінки.

Лікарські рослини, що містяться в новому досліджуваному зборі антидіабетичному, зокрема, трава хвоща польового (*Equiseti arvensis herba*), квіти бузини (*Sambuci flores*), кореневища та корені оману (*Inulae rhizomata et radices*), трава звіробою (*Hyperici herba*), квітки липи (*Tiliae flores*), трава споришу (*Polygoni avicularis herba*), листя чорниці (*Myrtilli folium*), листя кропиви (*Urticae folia*) проявляють гепатопротекторну, протизапальну, гіполіпідемічну, гіпоглікемічну та антисклеротичну дії [4, 7] і тому можуть бути використані для усунення деструктивно-дистрофічних змін печінки.

Мета дослідження – вивчення впливу нового рослинного збору з антидіабетичною дією на гістологічний стан печінки щурів за умов інсулінорезистентності.

Матеріали та методи. Експериментальну інтолерантність до глюкози моделювали на 25 білих самцях щурів масою 200–250 г. Об'єктом дослідження була печінка тварин різних груп: після 2-тижневого підшкірного введення дексаметазону в дозі 0,125 мг/кг маси тіла тварин [6] – контрольна патологія; після лікувально-профілактичного внутрішньошлункового введення водного відвару збору антидіабетичного (1:10) у дозах 6 мл/кг, 9 мл/кг та

12 мл/кг одночасно з ін'єкціями дексаметазону; інтактних щурів – інтактний контроль. Виведення з експерименту всіх тварин було проведено на 15 день від початку дослідження. Усі дослідження проводили з дотриманням правил «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986 р.) [1].

Отриманий тканинний матеріал фіксували в 10 % розчині формаліну. Одну частину кожного зразка зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливали в парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, проводили ШІК-реакцію для виявлення глікогену. Другу частину зразків різали на кріостатмікротомі та фарбували суданом IV для виявлення нейтральних жирів [2, 5].

Мікропрепарати вивчали під світловим мікроскопом Granum та фотодokumentували цифровою відеокамерою Granum ДСМ 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Tour View з метою калібрування яскравості та чіткості зображення.

Результати та їх обговорення. Як показало світлооптичне дослідження, у інтактних щурів гістологічна картина органа мала типову для цих тварин будову. Часточковий малюнок тканини внаслідок майже повної відсутності сполучнотканинних прошарків не виразний. Межі часточок визначали за триадами. Печінкові часточки складалися з тяжів гепатоцитів, які мали чітку радіальну спрямованість. Зони триад (портальних трактів) вузькі. Гепатоцити в різних відділах печінкових часточок характерної форми та розміру, цитоплазма рівномірно профарбована, оптично щільна, не містила включень, видимих при світловій мікроскопії. Ядра гепатоцитів нормохромні, центрально розташовані, містили 1, рідше 2 ядерця. Кількість двоядерних гепатоцитів достатня. Стан епітелію жовчних протоків та ендотелію міжчасточкових кровоносних судин у триадах, а також ендотелій інших кровоносних судин у межах норми. Внутрішньочасточкові гемокапіляри помірно розши-

рені та кровонаповнені, містили звичайну кількість лімфоїдних клітин. Клітини Купфера без особливостей. Мітози у клітинах не спостерігалися (рис. 1).

ШІК-реакція показала, що цитоплазма гепатоцитів рівномірно та щільно заповнена дрібними гранулами глікогену (рис. 2), фарбування суданом не виявило накопичення жиру в клітинах (рис. 3).

Після 2-тижневого введення дексаметазону виявлено порушення радіальної балкової будови печінкової паренхіми. Гепатоцити щільно прилягали один до одного, що призводило до виразного звуження просвітів синусоїдальних капілярів. Практично всі гепатоцити мали ознаки дистрофії, місцями видно руйнування сусідніх клітинних мембран, дрібні ділянки гепатоцитолізу. У цитоплазмі клітин виявлені не чітко оконтуровані ділянки просвітлення цитоплазми та дрібні вакуолі. Ядра

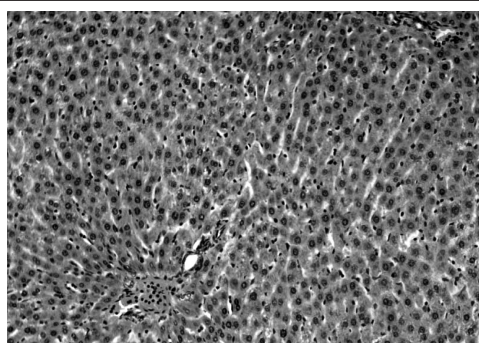


Рис. 1. Печінка інтактного щура. Нормальний стан печінкової паренхіми. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 200$

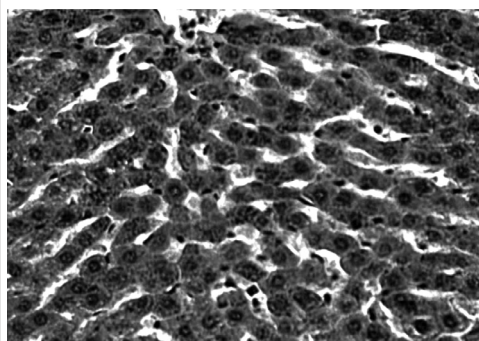


Рис. 2. Печінка інтактного щура. Рівень глікогену в гепатоцитах відповідає нормальному. Мікрофото: ШІК-реакція. $\times 250$

більшості гепатоцитів мономорфні, гетерохроматичні, ядерця не контуряться. Двойдерні клітини спостерігалися рідше порівняно з контрольною групою (рис. 4).

Фарбування суданом виявило накопичення жиру в цитоплазмі гепатоцитів. Краплі жиру різні за розміром, виявлені також у клітинах Купфера (рис. 5).

При постановці ШІК-реакції знайдено значне зменшення насиченості глікогеном цитоплазми клітин або відсутність його (рис. 6).

Уведення водного відвару збору антидіабетичного на тлі дексаметазону покращувало морфологічний стан печінки щурів. Виразність позитивного впливу відвару мала дозозалежний характер. Так, після введення відвару в дозі 6 мл/кг у тварин ще виявляли дифузну дистрофію гепатоцитів, але

виразність її була меншою за контрольну. Ознаки гепатолізису зменшені. Більш чіткою була структура ядер, у яких проглядалися ядерця. Виявлявся анізонуклеоз (коливання розміру ядер). Більш чіткою була й радіальна спрямованість печінкових балок, просвіти синусоїдних капілярів менше звужені й з невеликою кількістю формених елементів крові (рис. 7).

У цитоплазмі значної кількості гепатоцитів збільшено вміст глікогену (рис. 8). Зменшено накопичення жиру, краплі якого були переважно дрібні й не порушували цілісність клітин (рис. 9).

Після застосування водного відвару в дозі 9 мл/кг дистрофічні зміни гепатоцитів мали лише перипортальну вогнищеву локалізацію, при цьому частина гепатоцитів у цих зонах були достатньо морфологічно повноцінними. Візуально збільшувалася кількість двойдерних

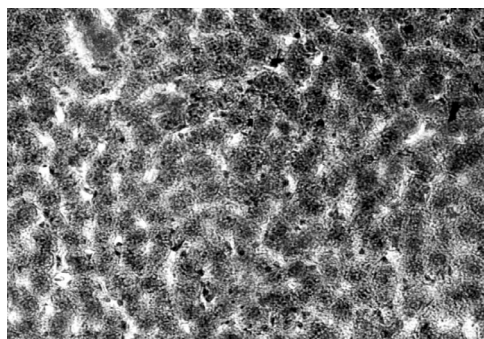


Рис. 3. Печінка інтактного щура. Відсутність жиру в цитоплазмі клітин. Мікрофото: забарвлення суданом IV. $\times 250$

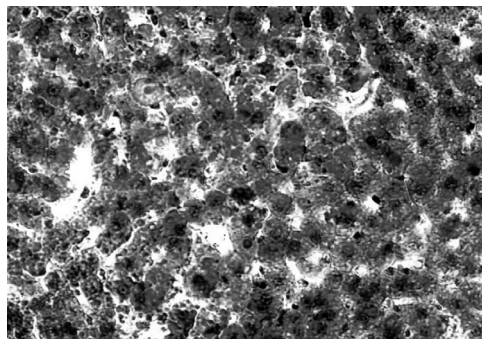


Рис. 5. Печінка щура після 2-тижневого введення дексаметазону. Накопичення жиру в цитоплазмі клітин. Мікрофото: забарвлення суданом IV. $\times 250$

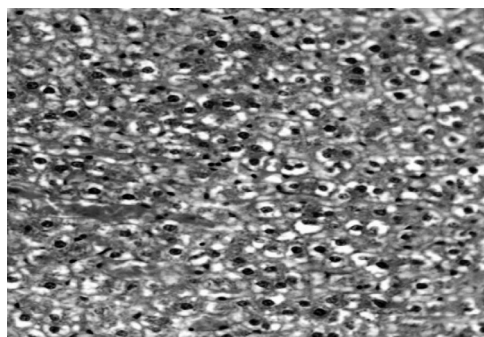


Рис. 4. Печінка щура після 2-тижневого введення дексаметазону. Дифузна дистрофія гепатоцитів, дисконфлексія печінкових балок, виразне звуження просвіту синусоїдних капілярів, дрібні ділянки гепатолізису. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозин. $\times 250$

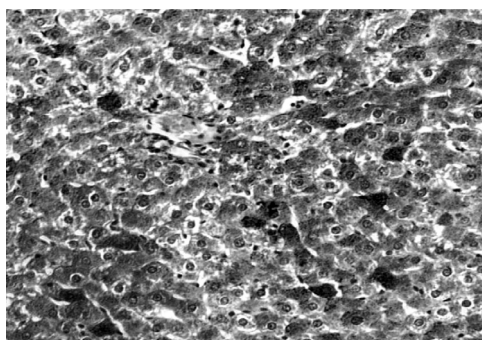


Рис. 6. Печінка щура після 2-тижневого введення дексаметазону. Зменшення вмісту або відсутність глікогену в більшості гепатоцитів. Мікрофото: ШІК-реакція. $\times 200$

клітин (рис. 10). У 20 % щурів зміни печінкової паренхіми були дуже помірними.

Зниження вмісту глікогену відмічено лише в перипортальних гепатоцитах, інтенсивність ШИК-реакції інших зон часточок у різних щурів коливалася від дещо зниженої до нормальної (рис. 11).

Дрібнокрапельну жирову дистрофію від слабкої до помірної визначали також переважно в гепатоцитах, що локалізовані в перипортальних зонах. У клітинах Купфера жирові включення відсутні (рис. 12).

Відвар збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг проявляв найвиразніший гепатопротекторний ефект. У більшості

щурів балкова структура тканини помітно не порушена. Самі гепатоцити – нормального розміру. Ядра клітин – чітко структуровані, часто з крупними ядерцями, кількість яких іноді досягала 3–4 в одному ядрі. Ознаки гепатолізу практично відсутні, лише поодинокі гепатоцити або окремі дрібновогнещеві осередки клітин мали невиразні ознаки дистрофії (рис. 13). Пул двоядерних клітин та виразність анізонуклеозу практично були на рівні інтактного контролю. Виявлено гепатоцити в стані поділу (рис. 14). Усе це свідчило про активацію регенерації тканини. Відновлена здатність клітин до накопичення глікогену (рис. 15), жирові включення відсутні (рис. 16).

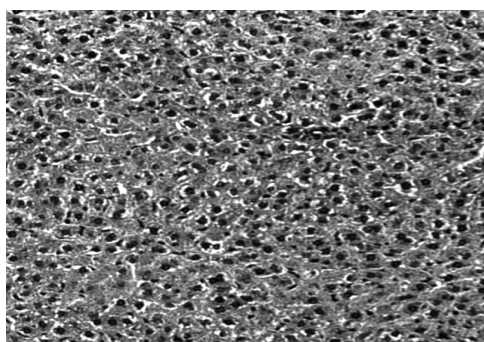


Рис. 7. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 6 мл/кг на тлі дексаметазону. Зменшення виразності дистрофії гепатоцитів, більш чітка радіальна спрямованість печінкових балок, збільшення просвіту синусоїдних капілярів. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 200$

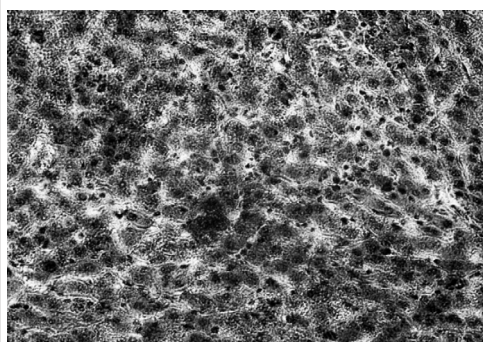


Рис. 9. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 6 мл/кг на тлі дексаметазону. Зменшення накопичення жиру в клітинах. Мікрофото: забарвлення суданом IV $\times 200$

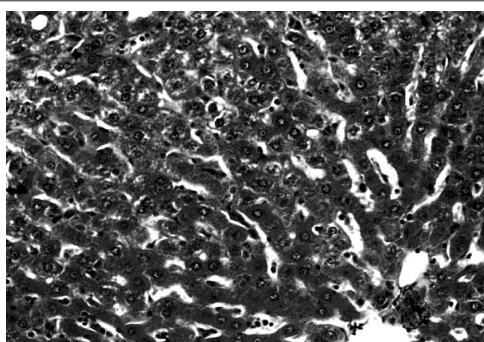


Рис. 8. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 6 мл/кг на тлі дексаметазону. Збільшення вмісту глікогену в цитоплазмі значної кількості гепатоцитів. Мікрофото: ШИК-реакція. $\times 200$

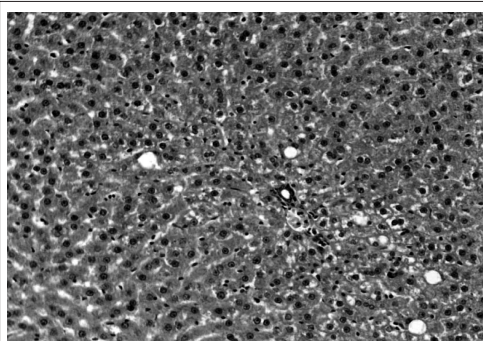


Рис. 10. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 9 мл/кг на тлі дексаметазону. Радіальна спрямованість печінкових балок збережена на більшості ділянок часточок, просвіт синусоїдних капілярів нормальний. Помірна дистрофія гепатоцитів перипортальної зони. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 200$

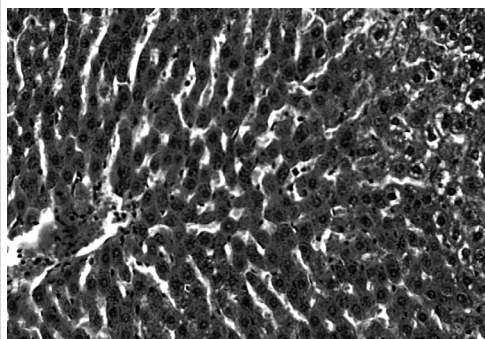


Рис. 11. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 9 мл/кг на тлі дексаметазону. Зменшення вмісту глікогену тільки в перипортальних гепатоцитах. Мікрофото: ШІК-реакція. $\times 200$

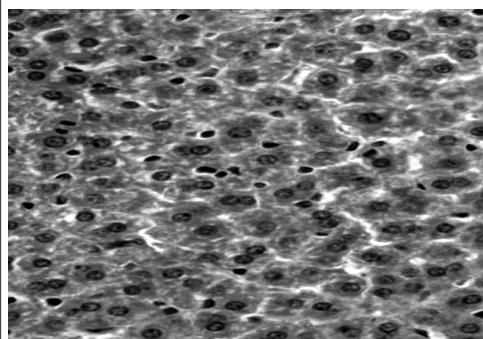


Рис. 14. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг на тлі дексаметазону. Поява гепатоцитів у стані поділу. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 400$

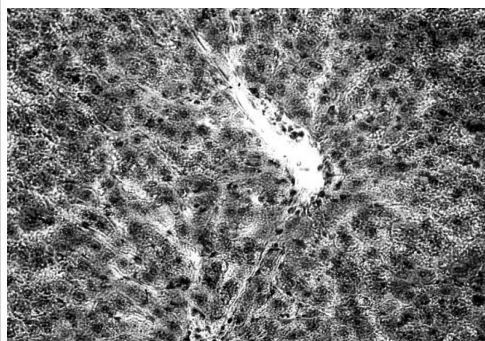


Рис. 12. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 9 мл/кг на тлі дексаметазону. Наявність дрібних жирових включень тільки в клітинах перипортальних зон. Мікрофото: забарвлення суданом IV $\times 200$

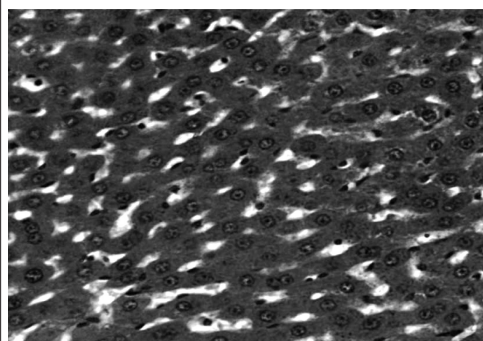


Рис. 15. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг на тлі дексаметазону. Нормалізація вмісту глікогену в гепатоцитах. Мікрофото: ШІК-реакція. $\times 200$

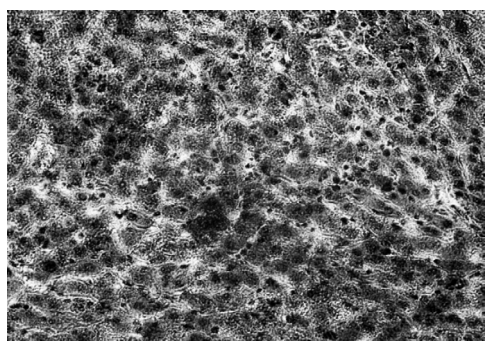


Рис. 13. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг на тлі дексаметазону. Практично повне відновлення морфоструктури тканини, окремі гепатоцити з невиразними ознаками дистрофії. Мікрофото: забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 200$

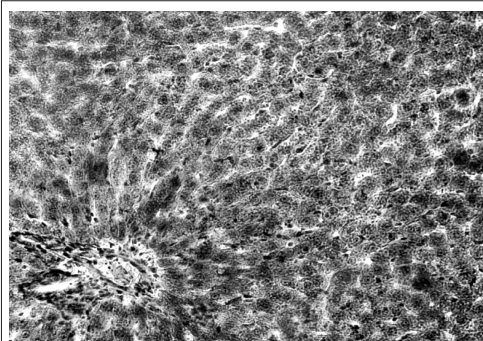


Рис. 16. Печінка щура за умов застосування водного відвару збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг на тлі дексаметазону. Відсутність жирових включень у гепатоцитах. Мікрофото: забарвлення суданом IV $\times 200$

Висновки

При введенні дексаметазону щурам заведеною вище схемою в печінці тварин виникають структурні зміни, які супроводжуються гіпоксією, порушеннями вуглеводного та ліпідного обміну, і є характерними для ЦД II типу.

Одночасне введення дексаметазону та водного відвару збору антидіабетичного в різних дозах послаблює або

попереджує деструктивно-дистрофічні зміни структурно-функціональної організації печінки щурів.

Найбільший вплив водний відвар збору антидіабетичного проявляє в дозі 12 мл/кг, виразно підвищує резистентність печінки щурів до дії агента, що викликає її пошкодження, та нормалізує метаболізм.

1. Директива Совета ЕС о сближении законов, постановлений и администрирование положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС) / Надлежащая производственная практика лекарственных средств; Под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загория, В. П. Георгиевского, Е. П. Безуглой. – Киев : Морион, 1999. – С. 508–545.
2. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Москва : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
3. Михайлов В. В. Основы патологической физиологии: Руководство для врачей / В. В. Михайлов, Б. М. Сагалович. – Москва : Медицина, 2001. – С. 121–122.
4. Носов А. М. Лекарственные растения / А. М. Носов. – Москва : ЭКСМО-Пресс, 2000. – 350 с.
5. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. – Москва : Иностран. Литература, 1962. – 967 с.
6. Полторак В. В. Експериментальне вивчення нових гіпоглікемічних засобів / В. В. Полторак, Н. І. Горбенко // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. – Київ, 2001. – С. 396–408.
7. Фитотерапия сахарного диабета / В. Н. Хворостинка, О. И. Москаленко, Л. В. Журавлева, В. Н. Савченко. – Харьков : Прапор, 1995. – 256 с.
8. Regional overviews [Електронний ресурс] // IDF Diabetes Atlas. – Режим доступу: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>

С. М. Марчишин, А. О. Савич, О. П. Андрієшин

Влияние сбора антидиабетического на гистологический стан печенки щуров за умов моделювання цукрового діабету II типу

Мета дослідження – вивчення впливу нового рослинного збору з антидіабетичною дією на гистологічний стан печінки щурів за умов інсулінорезистентності.

Виявлено, що введення водного відвару збору антидіабетичного на фоні модельованого діабету запобігає розладам мікроциркуляції та сприяє збереженню трабекулярної будови печінкових часточок. Ознаки гепатолізу та дистрофії гепатоцитів менше виражені, у клітинах краще зберігається глікоген, виявляється менше ліпідних крапель, розмір їхній зменшується. Явища анізонуклеозу менше виражені, ядра клітин краще контуровані, частіше зустрічаються клітини з двома ядрами, збільшується вміст еухроматину, на фоні якого краще збереженими виглядають ядерця.

Позитивний вплив водного відвару збору антидіабетичного на морфологічну структуру печінки має дозозалежний характер: при його введенні в дозі 6 мл/кг маси тіла тварин дистрофічні зміни зберігають дифузний характер, у дозі 9 мл/кг – виявляються на периферії часточок і виражені менше, у дозі 12 мл/кг – мають дрібновогнищевий характер і спостерігаються в перипортальних ділянках.

Таким чином, експериментально встановлено, що водний відвар збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг маси тіла тварин підвищує резистентність гепатоцитів до дії дексаметазону, попереджує та зменшує деструктивно-дистрофічні зміни структурних компонентів печінки щурів та нормалізує в них метаболічні процеси.

Ключові слова: цукровий діабет, збір антидіабетичний, гистологічне дослідження, гепатоцити

С. М. Марчишин, А. А. Савич, А. П. Андрієшин

Влияние сбора антидиабетического на гистологическое состояние печени крыс в условиях моделирования сахарного диабета II типа

Цель исследования – изучение влияния нового растительного сбора с антидиабетическим действием на гистологическое состояние печени крыс в условиях инсулинорезистентности.

Вывявлено, что введение водного отвара сбора антидиабетического на фоне моделированного диабета предотвращает расстройства микроциркуляции и способствует сохранению трабекулярного строения печеночных долек. Признаки гепатоліза и дистрофии гепатоцитов меньше выражены, в клетках лучше сохраняется гликоген, меньше оказывается липидных капель, размер их умень-

шається. Явлення анізонуклеоза менше виражені, ядра кліток краще контуровані, частіше зустрічаються клітки з двома ядрами, збільшується вміст еухроматину, на фоні якого краще збереженими виглядають ядринки.

Позитивний вплив водного відвару збору антидіабетичного на морфологічну структуру печінки має дозований характер: при його введенні в дозу 6 мл/кг маси тіла тварин дистрофічні зміни зберігають дифузний характер, в дозі 9 мл/кг – виявляються на периферії долек і виражені менше, в дозі 12 мл/кг – мають мелкоочаговий характер і спостерігаються в перипортальних зонах.

Таким чином, експериментально встановлено, що водний відвар збору антидіабетичного в дозі 12 мл/кг маси тіла тварин підвищує резистентність гепатоцитів до дії дексаметазону, запобігає і зменшує деструктивно-дистрофічні зміни структурних компонентів печінки крыс і нормалізує в них метаболічні процеси.

Ключові слова: цукровий діабет, збір антидіабетичний, гистологічне дослідження печінки, гепатоцити

S. M. Marchyshyn, A. O. Savych, A. P. Andriyishyn

An influence of antidiabetic collection on the histological state of rat liver in modeling of diabetes mellitus type II

The aim of research was to study the impact of the new herbal collection with antidiabetic effect on the histological state of rat liver in the conditions of insulin resistance.

In experiment with model of diabetes it was revealed that introduction of water decoction of antidiabetic collection prevents disorders of microcirculation and preserves hepatic lobule trabecular structure. Signs of hepatolysis and dystrophy are less prominent, glycogen is better saved, less lipid drops are revealed and their size decreased. Anisonucleosis is less observed, nuclei of cells are better seen, more binucleated cells are found, euchromatin predominates and nucleoli are saved better.

Positive influence of water decoction of antidiabetic collection on rat liver morphological structure directly depends on dose: dystrophic changes are diffuse after its administration at a dose of 6 ml/kg, at a dose of 9 ml/kg, – they are less prominent and were revealed at the periphery of lobules, at a dose of 12 ml/kg, small nodes of changed structures are seen around portal tracts.

So, in experiment it was revealed that the water decoction of antidiabetic collection at a dose of 12 ml/kg, increases resistance of hepatocytes to the action of dexamethasone, prevents and reduces the destructive-dystrophic changes of structural components of rat liver and normalizes metabolic processes in organ.

Key words: diabetes mellitus, antidiabetic collection, histological research, hepatocytes

Надійшла: 22 лютого 2016 р.

Контактна особа: Марчишин Світлана Михайлівна, професор, доктор фармацевтичних наук, кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», буд. 1, майдан Волі, м. Тернопіль, 46001. Тел.: + 38 0 67 936 16 70. Електронна пошта: svitlanafarm@ukr.net

А. В. Паршиков¹, Г. В. Петрова²

Цитотоксические эффекты синтетических производных α -токоферола и митомицина С на клетки Сасо 2

¹Государственное учреждение «Институт фармакологии и токсикологии Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев

²Институт биохимии имени А. В. Палладина Национальной академии наук Украины, г. Киев

Ключевые слова: α -токоферол, NAD(P) H-хиноноксидоредуктаза 1, митомицин С, клетки Сасо 2

К настоящему времени накоплены экспериментальные доказательства способности природных изомеров α -токоферола (α -ТФ) и его синтетических производных проявлять цитотоксические эффекты по отношению к культивируемым клеткам различного генеза, в том числе раковым и трансформированным [1]. Внимание исследователей к этому феномену обусловлено, прежде всего, возможностью использования данных соединений в противоопухолевой терапии. В наших предыдущих исследованиях установлено, что чувствительность нормальных клеток крыс к цитотоксическому действию аналогов α -ТФ зависит от базального уровня активности в них NAD(P) H-хиноноксидоредуктазы, а также показана способность данных соединений модулировать активность энзима [2].

NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза 1 (DT-диафараза, NQO1, 1.6.99.2) – цитозольный гомодимерный флавопротеин – участвует, по крайней мере, в трех системах биохимических реакций: одноступенчатом двухэлектронном восстановлении хинонов до гидрохинонов, поддержании в восстановленной активной форме эндогенных антиоксидантов, регуляции стабильности опухолевого супрессора и проапоптического фактора белка p53. Такой широкий спектр биологической активности позволяет DT-диафаразе участвовать в регуляции процессов антиоксидантной защиты,

детоксикации ксенобиотиков и запрограммированной гибели клеток [3]. DT-диафараза экспрессируется практически во всех органах и тканях млекопитающих, ее активность относительно легко модулируется *in vivo* и *in vitro*, при этом как активация, так и ингибирование энзима приводят к выраженному физиологическому ответу. Так, активаторы DT-диафаразы обеспечивают лучшее выживание клеток и традиционно рассматриваются как соединения, снижающие риск развития оксидативного стресса, канцерогенеза и апоптоза [3, 4]. С другой стороны, ингибирование энзима в клетках раковых опухолей сопровождается как снижением резистентности клеток к химиотерапевтическим соединениям [5], так и реверсией их злокачественного фенотипа [6].

Участие DT-диафаразы во множественных биохимических реакциях, обеспечивающих гомеостаз клетки, дает основание предполагать возможность использования соединений, способных модулировать ее активность, в качестве терапевтических средств. К их числу могут принадлежать и производные α -ТФ. Так, гибель тимоцитов крыс под воздействием α -токоферола с укороченной до 6 атомов углерода боковой цепью (α -ТФ-С6) и α -токоферилсукцината (α -ТС) сопровождается протеолизом молекулы DT-диафаразы [7]. В то же время α -ТС, индуцируя апоптоз клеток рака простаты линии PC3, одновременно способен повышать их резистентность к проапоптическому действию хинонов. Этот эффект нивелируется при ингибировании эндогенной

ДТ-диафразы, хотя α -ТС не индуцирует экспрессию энзима [8]. Неоднозначность эффектов производных α -ТФ по отношению к клеткам различного генеза и обусловила проведение данного исследования.

Цель исследования – выяснить способность синтетических производных α -ТФ индуцировать гибель клеток аденокарциномы эпителия толстого кишечника человека линии Сасо 2 и модулировать в них активность ДТ-диафразы.

Материалы и методы. Использованные митомицин С и (+)- α -ТС произведены фирмой Sigma (США). Производные α -ТФ с укороченной боковой цепью синтезированы в отделе биохимии витаминов и коэнзимов Института биохимии имени А. В. Палладина НАН Украины [9].

Клетки Сасо 2 получены из коллекции банка клеточных линий тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р. Н. Кавецкого НАН Украины. Культивирование клеток проводили в полной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка, 25 мМ глюкозы, антибиотика пеницилин (50 ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл), при 37 °С в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂ и 95 % влажности), в планшетах 24- и 96-лунок. По достижении 80 % конфлюэнтности клетки инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрациях, обозначенных на рис. 1–4, в течение 18 ч. Гидрофобные вещества добавляли из концентрированных маточных растворов в этаноле предварительно разбавленными культуральной средой так, чтобы конечная концентрация органического растворителя не превышала 0,1 %. К клеткам в контроле добавляли соответствующее количество этанола. По завершении инкубации клетки отмывали физиологическим раствором Хенкса.

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолийбромид (МТТ-тест) согласно техническому протоколу фирмы-производителя (Sigma, США). За 100 % принимали поглоще-

ние света раствором формазана, образованного клетками в контроле.

Активность ДТ-диафразы определяли согласно методу, описанному в работе [10]. К клеткам в ячейке 96-луночного планшета добавляли 25 мкл раствора, содержащего 0,8 % дигитонин, 2 ммоль/л EDTA-Na, 25 ммоль/л трис-HCl буфер, pH, 7,8, и инкубировали 10 мин при 37 °С, а затем еще 10 мин при комнатной температуре и встряхивании. Вносили 100 мкл среды, содержащей 25 ммоль/л трис-HCl буфер, pH 7,5; 0,7 мг/мл БСА; 0,01% Твин-20; 5 мкмоль/л FAD; 30 мкмоль/л NADP⁺; 1 ммоль/л глюкозо-6-фосфат; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (2 ед./мл); 0,3 мг/мл МТТ и 50 мкмоль/л менадиона. Пробы инкубировали при 37 °С, реакцию останавливали добавлением 25 мкл раствора, содержащего 0,3 ммоль/л дикумарола и 5 ммоль/л K₃PO₄ в 0,5 % диметилсульфоксиде. Поглощение света определяли при длине волны 570 нм на фотометре планшетного типа Multiscan EX (Thermo, США) против пробы интактных клеток, среда инкубации которых дополнительно содержала 0,15 ммоль/л дикумарола. За 100 % принимали поглощение пробы клеток в контроле.

Содержание белка определяли с использованием реагента бицинхониновая кислота – CuSO₄ согласно техническому протоколу фирмы-производителя (Sigma, США).

Экспериментальные данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Проведено три независимых эксперимента, инкубацию клеток с соединениями в каждой концентрации проводили в четырех параллельных постановках. Статистическую достоверность результатов оценивали в программе OriginPro9 с помощью t-критерия Стьюдента, различия считались достоверными при P < 0,05.

Результаты и их обсуждение. Исследованы три синтетические производные α -ТФ – α -токоферол и α -токоферилхинон с укороченными до 6 атомов углерода боковыми цепями (соответственно α -ТФ-С6 и α -ТХ-С₆, короткоцепочечные производные), а также α -токоферилсукцинат (α -ТС). Концен-

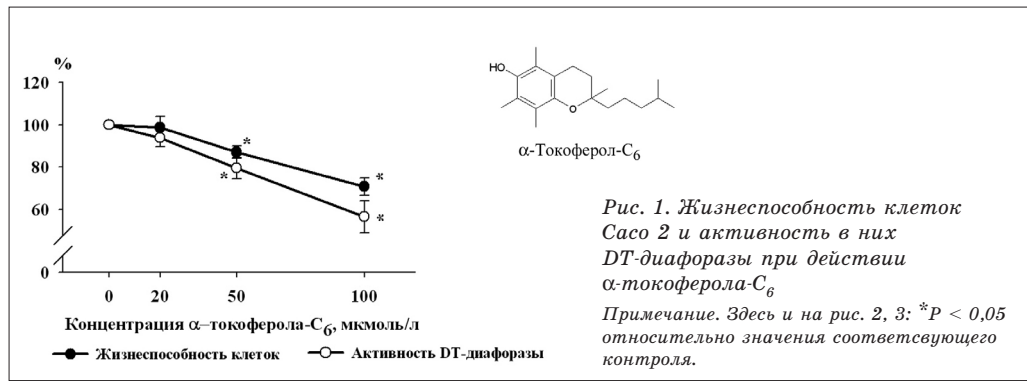
трации использованных соединений соответствуют диапазону физиологических концентраций α -ТФ в сыворотке крови человека.

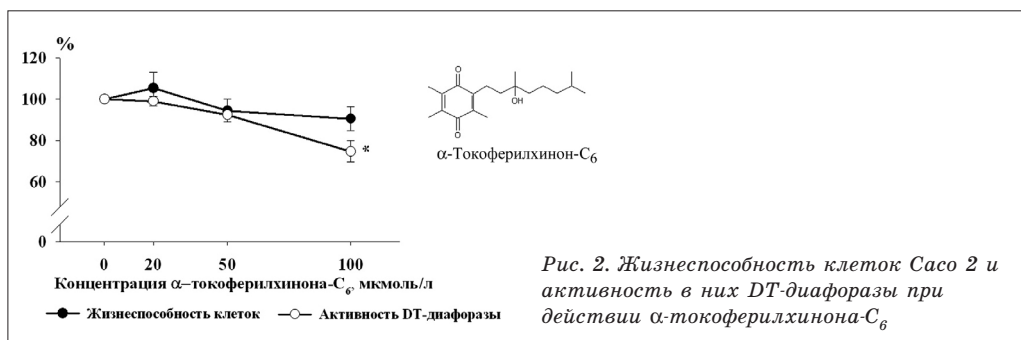
Увеличение концентрации α -ТФ- C_6 приводит к постепенному падению выживаемости клеток Сасо 2, достоверное снижение их жизнеспособности наблюдается в диапазоне концентраций 50–100 мкмоль/л, количество погибших клеток при максимальной концентрации аналога составляет 29 %. Снижение активности ДТ-диафоразы в клетках Сасо 2 также зависит от концентрации α -ТФ- C_6 и при ее значении 100 мкмоль/л составляет 43 % (рис. 1).

В наших предыдущих исследованиях показано снижение жизнеспособности клеток крыс различного генеза при действии α -ТФ- C_6 . При концентрации C_6 -аналога 100 мкмоль/л количество погибших тимоцитов и спленоцитов составляет около 75 %, а гепатоцитов – 50 % [2]. Однако клетки Сасо 2 оказались менее чувствительными к цитотоксическому действию короткоцепочечного аналога α -ТФ по сравнению с нормальными клетками крыс. С другой стороны, α -ТФ- C_6 в концентрации 75 мкмоль/л вызывает гибель практически 100 % клеток эпителиоидной карциномы линии HeLa-S3K и клеток острой лейкемии линии СЕМ-С-7 человека [11], а апоптоз 50 % популяции клеток рака простаты линий LNCaP и PC-3 – в диапазоне концентраций 15–20 мкмоль/л [12]. Очевидно, что такое расхождение в степени эффектов α -ТФ- C_6 на функционирование клеток различного генеза определяется зависимостью его цитотоксического действия от особенностей метаболизма клеток, одной из которых

может являться базальный уровень активности ДТ-диафоразы [2]. Известно, что экспрессия ДТ-диафоразы у млекопитающих обладает выраженной видовой и органной специфичностью, в результате чего ее активность в клетках различных тканей существенно различается. Так, у крыс наивысшая активность энзима присуща печени и легким [13]. У человека самая высокая активность ДТ-диафоразы выявлена в желудочно-кишечном тракте и в жировой ткани, в то время как в сердце и печени уровень ее экспрессии крайне низок [13, 14]. И хотя по данным литературы клетки Сасо 2 имеют наиболее низкую (по сравнению с другими линиями клеток карциномы кишечника человека) активность ДТ-диафоразы [15], по нашим данным ее специфическая активность в этом типе клеток составляет $(42,94 \pm 1,99)$ нмоль/(мин · мг протеина), что в 4,4 раза превышает таковую в гепатоцитах крыс [2]. В отличие от α -ТФ, традиционно считающегося универсальным антиоксидантом, α -ТФ- C_6 обладает прооксидантными и мембрано-дестабилизирующими свойствами [16], что, вероятно, и опосредует его цитотоксическое действие. Поскольку ДТ-диафораза относится к группе энзимов антиоксидантной защиты, ее высокий уровень активности в клетках Сасо 2 и может определять их относительно низкую чувствительность к цитотоксическому действию α -ТФ- C_6 .

В отличие от α -ТФ- C_6 , α -ТХ- C_6 , являющийся потенциальным субстратом для ДТ-диафоразы, оказался неспособным влиять на выживаемость клеток Сасо 2 во всех исследованных концентрациях (рис. 2), а выявленное





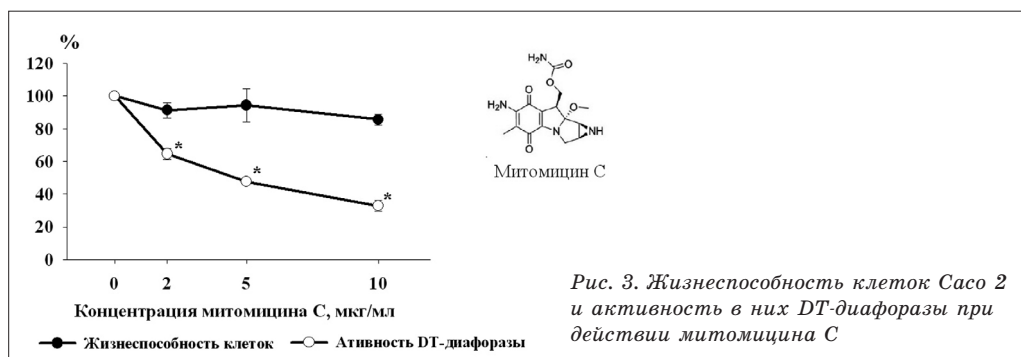
при его действии снижение активности ДТ-диафоразы не превышает 25 % и наблюдается лишь при концентрации 100 мкмоль/л.

Одним из основных свойств, опосредствующих токсические эффекты биологически активных хинонов, считается их способность к индукции оксидативного стресса. Последний формируется, когда фенольные хиноны при участии оксидоредуктаз системы цитохрома Р450 превращаются в промежуточные радикалы семихинона, которые, в свою очередь, вступая в неэнзиматическую реакцию с молекулярным кислородом, образуют его активные формы. Развитие именно такого биохимического сценария в клетке и предотвращает ДТ-диафараза, катализируя одноступенчатое восстановление хинонов до гидрохинонов минуя промежуточную стадию образования семихинонов [4]. Логично предположить, что, чем выше активность ДТ-диафоразы в клетках, тем ниже их чувствительность к цитотоксическому действию хинонов. Повышенная (по отношению к соответствующим нормальным тканям) активность ДТ-диафоразы считается характерной особенностью клеток большинства типов раковых опухолей [4, 17]. Выяв-

лена также способность ДТ-диафоразы к биоактивации некоторых хинонов, сутью которой является преобразование соединений с первоначально относительно низкой токсичностью в такие, которые обладают высоким уровнем токсичности [18]. Предполагается, что к таким соединениям относится митомицин С (ММС) – антибиотик хиноновой природы, официально используемый для лечения различных типов рака, в том числе и колоректального. Считается, что ММС нетоксичен для клеток с низкой активностью ДТ-диафоразы, тогда как в клетках с высокой активностью энзима превращается при его участии в алкилирующее соединение, вызывающее образование поперечных сшивок цепи ДНК и ингибирование ее синтеза [19]. Исходя из этого, мы использовали данное соединение как положительный контроль.

Однако ММС также оказался неспособным к индукции гибели клеток Сасо 2, хотя при его действии наблюдается значительное ингибирование ДТ-диафоразы (рис. 3).

Полученные результаты оказались неожиданными с точки зрения предполагаемого механизма цитотоксичности ММС относительно клеток раковых



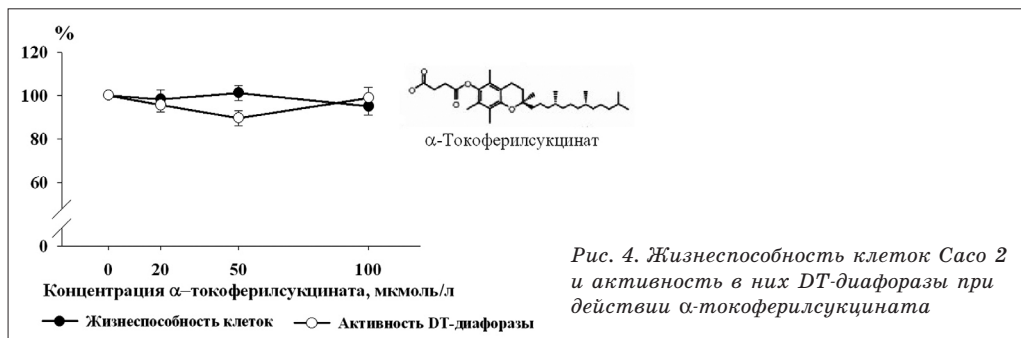


Рис. 4. Жизнеспособность клеток Сасо 2 и активность в них DT-диафоразы при действии α -токоферилсукцината

опухолей. Однако отметим, что способность DT-диафоразы активировать ММС выявлена лишь при низких значениях pH. В физиологических же условиях ММС является не только плохим субстратом для DT-диафоразы, но и ее ингибитором [19, 20], что подтверждают полученные нами результаты. Следует также подчеркнуть, что степень ингибирования DT-диафоразы α -ТФ-С₆ (43 %, рис. 1) сопоставима с таковой для МСС в диапазоне концентраций 2–5 мкг/мл (35,0–52,5 %, рис. 3). Учитывая тот факт, что ингибирование энзима в клетках раковых опухолей сопровождается реверсией их злокачественного фенотипа [6], выявленная нами способность короткоцепочечных аналогов α -ТФ снижать активность DT-диафоразы может отражать и их потенциальную способность активировать дифференцирование раковых клеток. Приведенные результаты свидетельствуют о зависимости цитотоксических эффектов короткоцепочечных производных α -ТФ от базального уровня в клетках активности DT-диафоразы и подтверждают диагностическую важность ее определения для выбора вида химиотерапии.

Из всех производных α -ТФ, способных к индукции гибели клеток, наиболее хорошо изучен α -токоферилсукцинат (α -ТС), в основном, благодаря работам группы J. Neuzil [21], где показана возможность его использования как противоопухолевого средства. Предполагаемые на сегодня механизмы действия α -ТС многочисленны и разнообразны [21, 22] и, согласно одному из них, в цитотоксические эффекты α -ТС может быть вовлечена DT-диафоараза [8]. Как представлено на рисунке 4, α -ТС оказался неспособным как сни-

жать жизнеспособность клеток Сасо 2, так и влиять на активность в них DT-диафоразы.

Аналогичные результаты были получены нами также и при исследовании эффектов α -ТС на гепатоциты крыс [2]. Отметим, что цитотоксические свойства α -ТС зависят от интактности его молекулы, поскольку гидролиз эфирной связи нивелирует способность аналога индуцировать гибель клеток [23]. Очевидно, присущая клеткам желудочно-кишечного тракта человека высокая активность неспецифической эстеразы обеспечивает превращение α -ТС в α -ТФ, который, как известно, не проявляет цитотоксических свойств.

Выводы

1. Цитотоксическое действие α -ТФ-С₆ на клетки линии Сасо 2 проявляется в снижении их жизнеспособности и ингибировании активности DT-диафоразы, степень которого сопоставима с таковой при действии МСС в диапазоне концентраций 2–5 мкг/мл. При этом ММС не влияет на выживаемость клеток.
2. α -ТХ-С₆ не изменяет жизнеспособность клеток Сасо 2, однако при концентрации 100 мкмоль/л снижает активность DT-диафоразы на 25 %.
3. α -ТС не проявляет цитотоксичности относительно исследуемых клеток.
4. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной противоопухолевой активности короткоцепочечных производных α -ТФ, однако, степень ее проявления зависит от особенностей метаболизма клеток, в частности, от базального уровня активности в них DT-диафоразы.

1. *Constantinou C.* Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs / *Constantinou C., Papas A., Constantinou A. I.* // *Int. J. Cancer.* – 2008. – V. 123, № 4. – P. 739–752.
2. *Petrova G. V.* The sensitivity of cells with the various level of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to cytotoxic action of quinonimines and α -tocopherol synthetic derivatives / *Petrova G. V., Parshykov A. V.* // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – V. 87, № 4. – P. 45–53.
3. *Dinkova-Kostova A. T.* NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional anti-oxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector / *Dinkova-Kostova A. T., Talalay P.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – V. 501, № 1. – P. 116–123.
4. *Nioi P.* Contribution of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors / *Nioi P., Hayes J. D.* // *Mutat. Res.* – 2004. – V. 555, № 1–2. – P. 149–171.
5. Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents / *Zeekpudsa P., Kukongviriyapan V., Senggunprai L.* [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2014. – V. 33, № 1. – P. 1–13.
6. Superoxide-mediated mechanism induces growth inhibition of pancreatic cancer via a dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase / *Cullen J. J., Hinkhouse M. M., Grady M.* [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63, № 17. – P. 5513–5520.
7. *Петрова Г. В.* Эффекты α -токоферола и его производных на содержание NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы 1 в тимocyтах крыс / *Петрова Г. В., Донченко Г. В., Клименко Е. П.* // *Доповіді НАН України.* – 2014. – № 4. – С. 156–161.
8. α -Tocopheryl succinate pre-treatment attenuates quinone toxicity in prostate cancer PC3 cells / *Bellezza I., Grottelli S., Gatticchi L.* [et al.] // *Gene.* – 2014. – V. 539, № 1. – P. 1–7.
9. Пат. № 21527, UA, МПК C07D311/72 (1995.07), A61K31/355 (1995.07). Спосіб одержання 2,5,7,8-тетраметил-2-(4'-метил-3-пентенил)-6-ацетоксихроману / *Свішук О. А., Донченко Г. В., Даневич О. І.* та ін.; - власник – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ. – № 95073189; опубл. 28.02.2000. Бюл. № 1.
10. *Prochaska H. J.* Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells. A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers / *Prochaska H. J., Santamaria A. B.* // *Anal. Biochem.* – 1988. – V. 169, № 2. – P. 328–336.
11. Влияние α -токоферола и его производных на жизнеспособность культуры злокачественных клеток / *Донченко Г. В., Холодова Ю. Д., Кузьменко И. В.* [и др.] // *Укр. биохим. журн.* – 1998. – Т. 70, № 2. – С. 37–45.
12. Vitamin E facilitates the inactivation of the kinase Akt by the phosphatase PHLPP1 / *Huang P. H., Chuang H. C., Chou C. C.* [et al.] // *Sci. Signal.* – 2013. – V. 6, № 267. – P. ra19. – <http://www.sciencesignaling.org>.
13. *Rooseboom M.* Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs / *Rooseboom M., Commandeur J. N. M., Vermeulen N. P. E.* // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – V. 56, № 1. – P. 53–102.
14. *Siegel D.* Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues / *Siegel D., Ross D.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V. 29, № 3–4. – P. 246–253.
15. *Bonnesen C.* Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines / *Bonnesen C., Eggleston I. M., Hayes J. D.* // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61, № 16. – P. 6120–6130.
16. *Петрова Г. В.* Мембранотропные и прооксидантные свойства короткоцепочечных производных α -токоферола / *Петрова Г. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – Т. 79, № 4. – С. 39–45.
17. Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism / *Cullen J. J., Hinkhouse M. M., Grady M.* [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63, № 17. – P. 5513–5520.
18. Bioactivation of quinones by DT-diaphorase. Molecular, biochemical and chemical studies / *Ross D., Beall H., Traver R.D.* [et al.] // *Oncol. Res.* – 1994. – № 6. – P. 493–500.
19. *Volpato M.* Tailoring targeted therapy to individual patients: lessons to be learnt from the development of mitomycin C / *Volpato M., Phillips R.M.* // *Cancer Genomics. Proteomics.* – 2007. – V. 4, № 3. – P. 175–186.
20. Kinetics of NAD(P)H:quinone oxidoreductase I (NQO1) inhibition by mitomycin C *in vitro* and *in vivo* / *Gustafson D. L., Siegel D., Rastatter J. C.* [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2003. – V. 305, № 3. – P. 1079–1086.
21. Redox-active and redox-silent compounds: synergistic therapeutics in cancer / *Tomasetti M., Santarelli L., Allegra R.* [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – V. 22, № 5. – P. 552–568.
22. The role of alpha-tocopheryl succinate (α -TOS) as a potential anticancer agent / *Angulo-Molina A., Reyes-Leyva J., López-Malo A.* [et al.] // *Nutr. Cancer.* – 2014. – V. 66, № 2. – P. 167–176.
23. The selective antiproliferative effects of alpha-tocopheryl hemisuccinate and cholesteryl hemisuccinate on murine leukemia cells result from the action of the intact compounds / *Farris M. W., Fortuna M. V., Everen C. K.* [et al.] // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54, № 13. – P. 3346–3351.

А. В. Паршиков, Г. В. Петрова

Цитотоксические эффекты синтетических производных α -токоферола и митомицина С на клетки Сасо 2

Исследовали способность синтетических производных α -токоферола (α -ТФ) и митомицина С индуцировать гибель клеток аденокарциномы эпителия толстого кишечника человека линии Сасо 2 и модулировать в них активность NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы 1 (ДТ-диафоразы).

С использованием МТТ-теста установлено, что только α -ТФ с укороченной до 6 атомов углерода боковой цепью (α -ТФ-С₆) в концентрациях 50–100 мкмоль/л способен снижать жизнеспособность клеток, в то время как короткоцепочечный α -токоферилхинон (α -ТХ-С₆), α -токоферилсукцинат (α -ТС) и митомицин С (ММС) не оказывают цитотоксического эффекта.

Все, кроме α -ТС, исследованные соединения снижают активность ДТ-диафоразы, а степень ингибирования энзима α -ТФ-С₆ в концентрации 100 мкмоль/л (43 %) сопоставима с таковой для МСС в диапазоне концентраций 2–5 мкг/мл (35–52,5 %). α -ТХ-С₆ снижает активность ДТ-диафоразы на 25 % лишь в концентрации 100 мкмоль/л.

Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной противоопухолевой активности короткоцепочечных производных α -ТФ, однако степень ее проявления зависит от особенностей метаболизма клеток, в частности, от базального уровня активности в них ДТ-диафоразы.

Ключевые слова: α -токоферол, NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза 1, митомицин С, клетки Сасо 2

О. В. Паршиков, Г. В. Петрова

Цитотоксичний ефект синтетичних похідних α -токоферолу та мітоміцину С на клітини Сасо 2

Досліджували здатність синтетичних похідних α -токоферолу (α -ТФ) і мітоміцину С індукувати загибель клітин аденокарциноми епітелію товстого кишковика людини лінії Сасо 2 і модулювати в них активність NAD(P)H-хіноноксидоредуктази 1 (ДТ-діафрази).

З використанням МТТ-тесту встановлено, що тільки α -ТФ з укороченим до 6 атомів вуглецю бічним ланцюгом (α -ТФ-С₆) за концентрацій 50–100 мкмоль/л здатний знижувати життєздатність клітин, у той час як коротколанцюговий α -токоферилхінон (α -ТХ-С₆), α -токоферилсукцинат (α -ТС) і мітоміцин С (ММС) не мають цитотоксичного ефекту.

Усі, окрім α -ТС, досліджені сполуки знижують активність ДТ-діафрази, а ступінь інгібування ензиму α -ТФ-С₆ за концентрації 100 мкмоль/л (43 %) порівнювана з такою для МСС у діапазоні концентрацій 2–5 мкг/мл (35–52,5 %). α -ТХ-С₆ знижує активність ДТ-діафрази на 25 % лише за концентрації 100 мкмоль/л.

Отримані результати свідчать про потенційну протипухлинну активність коротколанцюгових похідних α -ТФ, однак ступінь її прояву залежить від особливостей метаболізму клітин, зокрема, від базального рівня активності в них ДТ-діафрази.

Ключові слова: α -токоферол, NAD(P)H-хіноноксидоредуктаза 1, мітоміцин С, клітини Сасо 2

A. V. Parshykov, G. V. Petrova

The cytotoxic effect of α -tocopherol synthetic derivatives and Mitomycin C on Caco 2 cells

The effects of α -tocopherol (α -Toc) synthetic derivatives and mitomycin C on human colonic epithelial adenocarcinoma cell line Caco 2 viability and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) activity were investigated.

Using MTT test it was shown that only α -Toc with shortened to 6 carbon atoms side chain (α -Toc-C₆) at concentrations of 50–100 μ mol/l is able to reduce cell viability, whereas short-chain α -tocopherol quinone (α -TQ-C₆), α -tocopherol succinate (α -TC) and mitomycin C (MMC) have no cytotoxic effects.

All tested compounds except α -TC reduce the activity of DT-diaphorase, and the degree of the enzyme inhibition by α -Toc-C₆ at 100 μ mol/l (43 %) is comparable to that for MMC in the concentrations range of 2–5 μ g/ml (35,0–52,5 %). α -TQ-C₆ reduces the DT-diaphorase activity by 25 % at 100 μ mol/l only.

The results and their analysis indicate the potential anticancer activity of the short-chain α -Toc derivatives; however, the degree of its manifestation depends on the cells metabolism particularity, especially on basal level of DT-diaphorase activity.

Key words: α -tocopherol, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, mitomycin C Caco 2 cells

Надійшла: 10 березня 2016 р.

Контактна особа: Паршиков Олександр Вікторович, кандидат біологічних наук, науковий співробітник, відділ експериментальної терапії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03057. Електронна пошта: o.parshykov@gmail.com

О. С. Сініцина¹, Г. В. Зайченко², І. М. Риженко¹,
Ю. Б. Лар'яновська³

Корекція станів, асоційованих з дефіцитом естрогенів, за допомогою комбінованого вагінального гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, м. Харків

³Центральна науково-дослідна лабораторія, м. Харків

Ключові слова: дефіцит естрогенів, вагінальний гель, екстракт хмелю, фітоестрогени

Різні за етіологією клімактеричні розлади (КР) у жінок, які розвиваються внаслідок вікового згасання функції яєчників, під час медикаментозного клімаксу, після хірургічних втручань на статевих органах або терапевтичного радіаційного опромінювання, виникають на тлі змін вмісту статевих гормонів, зокрема, дефіциту естрогенів. Такі КР включають коливання маси тіла, вазомоторні (зокрема, «приливи жару») та психоемоційні розлади, депресії, остеопороз, урогенітальні негаразди (атрофія слизової оболонки піхви, порушення секреторної активності вагінального епітелію, дисбактеріози) та ін. [1–3].

Визнаним методом корекції КР є замісна гормональна терапія (ЗГТ), яка ефективно лікує всі патологічні прояви дефіциту естрогенів [3], хоча для її застосування існує велика кількість протипоказань, а тривале використання гормональних препаратів пов'язано з ризиком розвитку низки ускладнень [4]. Тому через поширеність скарг на симптоми, пов'язані з дефіцитом естрогенів, необхідність мінімізувати їхне виникнення та соціальну значимість збереження якості життя жінок, перспективним є пошук та створення ефективних лікувальних засобів на основі природних хімічних сполук, які мають спорідненість до β -естрогенових рецепторів. Такі властивості мають рослинні поліфеноли [5]. Пренілфлавоноїди

характеризуються доведеною естрогеноподібною активністю та здатні попереджати більшість наслідків гіпоестрогенового стану організму – вегетативні вазомоторні реакції, дегенеративні зміни матки, гормональний баланс та ін. Увагу дослідників привертає, зокрема, 8-пренілнаренгенін (8-PN), багатим джерелом якого є хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.). Крім того, хміль містить велику кількість ізоксантохому, який може бути попередником 8-PN, що й обумовлює значний естрогеноподібний ефект цієї рослини. Тому доцільно визначити ефективність екстрактів хмелю для лікування деяких проявів гіпоестрогенового стану при топічному застосуванні в складі вагінального гелю [6]. Така лікарська форма мінімізує небажані прояви естрогеноподібних ефектів флаваноїдів. Крім того, відмічають збільшення кількості жінок з гіпоестрогенними станами, що використовують саме трансгенітальну форму при проведенні ЗГТ [7].

Мета дослідження – вивчення лікувальної дії нового комбінованого гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою за показниками динаміки маси тіла, температури шкіри, стану мікробіоценозу статевих шляхів, кислотності вагінального секрету, макро- та мікроструктури репродуктивних органів у оварієктомованих самок щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 30 аутбредних самках білих щурів з віварію НФаУ масою 190–260 г і віком 6–8 місяців на початку експерименту. Тварин утримували в стандартних умовах при природному

освітленні, раціоні, рекомендованому для даного виду тварин, та питному режимі *ad libitum*. Були досліджені наступні групи: контроль I – інтактні тварини; контроль II – самки щурів, яким проводили лапаротомію та ушивання рани без видалення яєчників; контрольна патологія (КП) – оварієктомовані самки, у яких видаляли яєчники за методом Киршенблата [8] під хлороформним наркозом в асептичних умовах. Частину оварієктомованих самок додатково рандомізували на групу Естріол (супозиторії «Овестин», Е) та групу Екстракт хмелю + молочна кислота (ЕХ + МК). Через 5 тижнів після операції оварієктомованим самкам упродовж 28 діб інтравагінально спеціальним аплікатором вводили супозиторії «Овестин» (0,03 мг/кг), або гель комбінованого складу з ЕХ + МК (0,06 мг/кг), або 0,5 мл води для ін'єкцій.

Вагінальний гель розроблений під керівництвом професора Л. І. Вишневської на кафедрі аптечної технології ліків імені Д. П. Сала НФаУ. Крім густого екстракту шишок хмелю (у подальшому екстракт хмелю), що містить багато фітоестрогенів, до його складу входять молочна кислота, яка є важливою складовою вагінального середовища, та олія лаванди, що має при топікальному використанні антисептичну, бактерицидну та репаративну дію [9]. Як препарат порівняння за показаннями до застосування обрано супозиторії вагінальні «Овестин» (Естріол, Органон, Нідерланди, серія: G44874), з 0,5 мг естріола. Терапевтичну дозу препаратів розраховували з урахуванням коефіцієнта видової чутливості [10].

Ефективність тест-зразків оцінювали за низкою показників. Масу тіла тварин вимірювали щотижня вранці натще на лабораторних електронних вагах EJ-6100 (AnD, Японія). По закінченні курсу лікування визначали наявність вегетативних вазомоторних порушень, реєструючи в інтервалі 09.00–12.00 год температуру шкіри біля кореня хвоста (термометр Thermo Tek Q5, Medical Indicators Inc, США). Цей показник вважають еквівалентом симптому «приливів жару» у жінок [11].

Перед та після курсу лікування досліджували біоценоз піхви шляхом посіву підготованих зразків на спеціальні та диференціально-діагностичні поживні середовища для виділення бактерій групи аеробів (м'ясо-пептонний агар) та анаеробів (анаеробний агар), а також первинної оцінки лактозонегативних та лактозопозитивних паличок (середовище Ендо), лактобактерій (лактоагар), стафілококів (сольовий агар). Після визначення кількості мікроорганізмів, що вирости, розраховували показник кількості колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів (КУО) у 1 мл [12]. У ті самі терміни вимірювали кислотність вагінального середовища за допомогою одноразових вагінальних рН-тестів Citolab (DFI Co, Ltd, Korea) з 24 год інтервалом з введенням тест-зразка.

По закінченні експерименту самок знеживлювали шляхом декапітації під хлороформним наркозом. На аутопсії брали зразки тканин матки та піхви для макро- та мікроскопічних досліджень. Вимірювали ширину рогів матки та відмічали наявність у них цервікального слизу.

Морфологічне дослідження слизової оболонки піхви та рогів матки проводили на мікропрепаратах, які забарвлювали гематоксилін-еозином [13, 14]. Перегляд мікропрепаратів виконували на мікроскопі Granum, мікрофотографування зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum ДСМ310. Фотографії обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми TourView.

При проведенні експериментів дотримувалися національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.) [15].

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакета програм Excel 2003 та Statistika 6.0. Дані представлені як середнє арифметичне ($\bar{X}$) та його похибка ($\pm S \bar{x}$) з огляду на відповідність закону нормального

розподілу у вибірках [16]. Перевірку нульової гіпотези про відсутність різниці між групами проводили, користуючись критерієм Q для множинних порівнянь [17]. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Динаміка маси тіла є непрямым підтвердженням релевантності моделі гіпоестрогенемії та ефективності тест-сразків впливати на цей симптом клімактеричного синдрому, який виникає внаслідок порушення як рівня, так і балансу естрогенів та гестагенів у крові в пременопаузальний період [18].

Нормальний фізіологічний приріст маси тіла самок груп контроль I та контроль II за час експерименту був $(8,0 \pm 0,6) \%$ та $(6,3 \pm 0,8) \%$ від початкової. У оварієктомованих самок маса тіла статистично достовірно зросла в середньому на $(15,1 \pm 0,7) \%$. У групах E та EX + МК маса тіла самок статистично достовірно зменшилася після початку лікування, а сумарний приріст наприкінці експерименту становив $(7,1 \pm 0,4) \%$ та $(10,2 \pm 1,2) \%$ від початкової маси тіла відповідно і не відрізнявся від даних самок групи контроль I.

Одними з ранніх симптомів КР є вазомоторні порушення, зокрема, приливи жару, збільшена пітливість, головний біль, гіпотонія або гіпертонія. Для виявлення однієї з таких вазомоторних реакцій перед знеживленням тварин, яких лікували, упродовж 4 год вимірювали температуру шкіри біля

кореня хвоста (рис. 1). На відміну від здорових тварин, у яких графік температури шкіри впродовж 4 год мав монотонний характер, коливаючись у межах від $28,9$ до $29,1^\circ\text{C}$, у оварієктомованих самок відмічено стрибки температури до $31,5^\circ\text{C}$ на 10-й год і $30,8^\circ\text{C}$ на 12-й год, які розцінювалися як еквіваленти «приливів жару», і, згідно з даними літератури, свідчили про порушення вазомоторних реакцій [19].

У групі оварієктомованих самок, яким проводили ЗГТ супозиторіями з E, температура весь час не відрізнялася від норми. Таку саме практично повну нормалізацію терморегуляторної реакції спостерігали в самок групи EX + МК. У тварин цієї групи був відмічений лише один пік температури на 10 годину, який досягав $29,5^\circ\text{C}$. Різниця між показником групи контроль I становила $0,55^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Також цей показник статистично достовірно відрізнявся від значень температури в оварієктомованих самок ($p < 0,05$). Можна думати, що дія досліджуваного гелю з EX + МК пов'язана зі здатністю фітоестрогенів хмелю зменшувати вивільнення гормонів, зокрема, ЛГ та ТТГ, які відіграють ключову роль у патогенезі «приливів жару» [19].

Обстеження матки у тварин різних груп показало, що в самок з груп контроль I та контроль II товщина рогу матки була однаковою й становила $(2,83 \pm 0,17)$ мм при наявності цервікального слизу в рогах матки практично в усіх тварин за одним виключен-

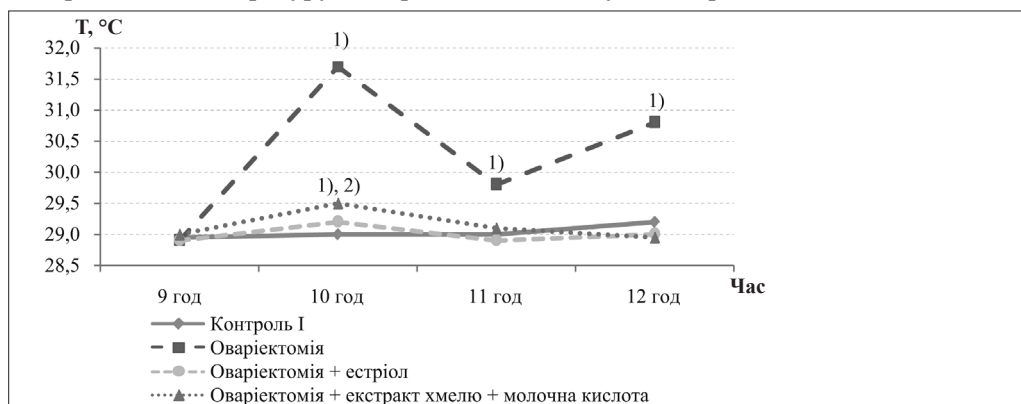


Рис. 1. Температура шкіри біля кореня хвоста в оварієктомованих самок різних груп після лікування досліджуваними препаратами

Примітка. 1) – статистично достовірна різниця з даними групи контроль I ($p < 0,05$);

2) – статистично достовірна різниця з даними групи контрольна патологія (оварієктомія) ($p < 0,05$).

ням у групі контроль II. У оварієктомованих самок товщина рогів матки зменшувалася більше, ніж у 2,4 разу до $(1,17 \pm 0,17)$ мм ($p > 0,05$), а цервікальний слиз був відсутнім у 5 з 6 тварин. Лікування супозиторіями з Е поновлювало товщину рогів матки до $(2,67 \pm 0,33)$ мм, а цервікальний слиз був наявний у 5 з 6 самок, що статистично достовірно не відрізнялося від даних контрольних груп. Оварієктомовані самки, яких лікували вагінальним гелем комбінованого складу, мали тонші роги матки, ніж у тварин групи Е, але товщі, ніж у групі КП. Однак ці відмінності не досягали статистичної значущості відносно обох груп.

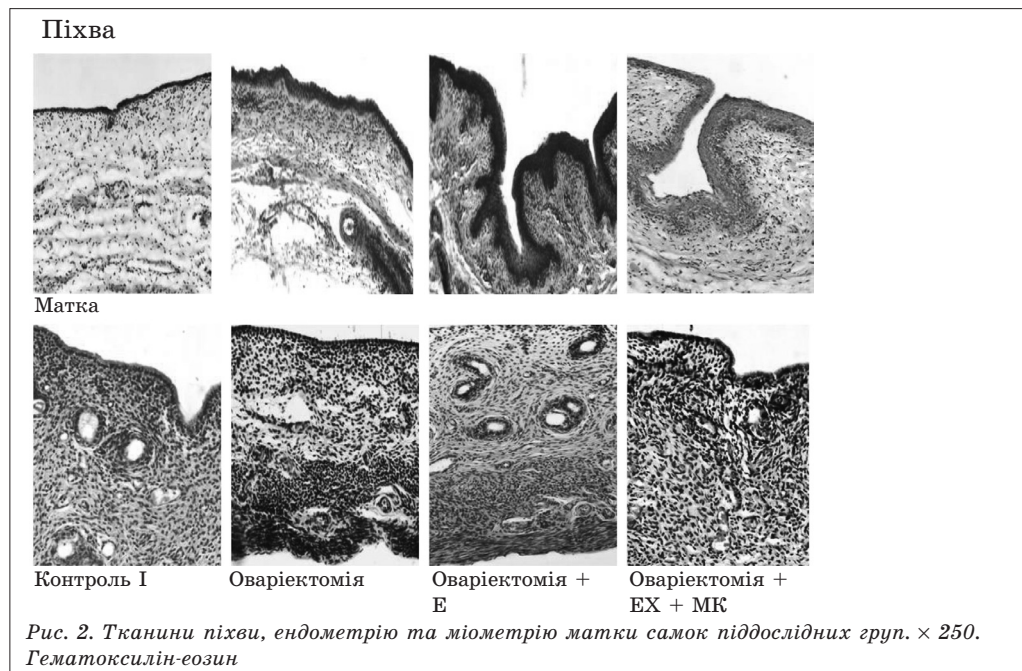
Мікроскопічне дослідження препаратів піхви та матки свідчило про нормальний стан піхви та матки контрольних тварин (рис. 2). У самок після білатеральної оварієктомії стан піхви відповідав картині гіпоестрогенії: атрофічна слизова оболонка зі зменшеною товщиною епітеліального пласта без сосочкових розростань епітелію, стоншені стромальні колагенові волокна, гіповаскуляризація. Частина кровоносних судин була спазмованою, судинна стінка в них була потовщеною. Такі самі зміни були характерні й для ендометрію та міометрію матки. Зменшувалася клітинна насиченість строми, відмічалася атрофія

та зниження секреторної активності клітин поверхневого епітелію та епітелію маточних залоз, спазм судин. Також відмічені кістозні розширення деяких залоз. У судинах міометрію спостерігали ознаки ендотеліальної дисфункції.

Препарат порівняння Е сприяв нормалізації гормонального статусу тканин піхви та матки в самок щурів: відмічено повне відновлення морфологічної структури слизової оболонки піхви, структури ендометрію та міометрію. Стан залозистих та стромальних клітин, кровоносних судин не відрізнявся від такого в самок групи контроль I.

Відновлення вагінального епітелію та строми матки спостерігали й при лікуванні вагінальним гелем комбінованого складу. Епітеліальний пласт у дистальному відділі піхви виразно збільшувався порівняно з таким у оварієктомованих тварин, було помітне диференціювання клітин, ущільнення колагенових волокон, а у власно пластинці слизової оболонки було покращено кровопостачання.

Строма матки мала нормальні розміри, залозисті клітини варіювали за чисельністю, були структурно активними та мали типову форму. У стромі ендометрію були значно збільшені кількість і стан повнокровних кровоносних судин порівняно з тваринами групи КП.



Серед клітинної композиції спостерігалися фібробласти, лімфоцити, еозинофіли. Об'єм ендометрію в самок цієї групи збільшувався помірно відносно тварин групи КП, також помірно збільшувалися м'язові шари міометрію в стінці рогів матки.

При мікробіологічних дослідженнях вагінального слизу звертали увагу на окремі тестові групи мікроорганізмів (таблиця).

Встановлено, що в самок через тривалий термін після оварієктомії статистично достовірно збільшується кількість умовно-патогенних мікроорганізмів, у тому числі аеробних грамнегативних бактерій, зростає кількість кишкових паличок, стафілококів, з'являються клостридії та зменшується загальна кількість лактобактерій.

Лікування супозиторіями з Е упродовж 28 діб позитивно змінило біоценоз вагінального секрету: помірно (статистично достовірна різниця з даними груп контроль І та КП, $p < 0,05$) зменшувалася кількість умовно-патогенних мікроорганізмів (анаеробні мікроорганізми, кишкова паличка, стафілоко-

ки), нормалізувалася кількість аеробних бактерій, зникали клостридії, відновлювалася популяція лактобактерій. У тварин групи ЕХ + МК у посівах вагінального секрету помірно зменшувалася кількість анаеробних бактерій, зникали клостридії. Відмічено більш виразний антибактеріальний ефект порівняно з Е відносно кишкової палички, аеробних грамнегативних бактерій, стафілококів та повне відновлення чисельності лактобактерій.

Кисле середовище піхви є універсальним маркером нормального гормонального статусу та стану біоценозу генітального тракту. При першому дослідженні рН вагінального секрету, яке проводили перед початком лікування тест-зразками, встановлено, що середній показник у групах контроль І та контроль ІІ не перевищував 5, тоді як у оварієктомованих тварин рН секрету піхви був статистично значуще більшим і ставав слабо лужним (рис. 3). У групі Е відмічено нормалізацію рН середовища. Ефект у групі самок ЕХ + МК був дещо менш виразним, і рН у середньому не перевищував 6, що

Таблиця

Показники стану біоценозу генітального тракту самок щурів експериментальних груп, КУО/г, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Мікро-організми	Експериментальна група					
	Конт-роль І n = 6	Оварієктомовані самки				
		Без лікуван-ня (КП), n = 6	Лікування Е, n = 6		Лікування гелем з ЕХ + МК, n = 6	
			до	після	до	після
Анаеробні бактерії	8,75 ± 0,09	8,01 ¹⁾ ± 0,08	8,03 ¹⁾ ± 0,10	8,34 ^{1), 2)} ± 0,07	8,16 ^{1), 2)} ± 0,08	8,44 ^{1), 2)} ± 0,08
Клостридії	–	5,52 ¹⁾ ± 0,09	5,42 ¹⁾ ± 0,08	– ²⁾	5,42 ¹⁾ ± 0,08	– ²⁾
Кишкова паличка	6,80 ± 0,10	8,67 ¹⁾ ± 0,17	8,53 ¹⁾ ± 0,10	7,32 ^{1), 2)} ± 0,12	8,82 ¹⁾ ± 0,12	7,06 ^{2), 3)} ± 0,10
Інші аеробні грам-негативні бактерії	6,02 ± 0,08	7,84 ¹⁾ ± 0,03	7,86 ¹⁾ ± 0,08	5,94 ²⁾ ± 0,07	7,98 ¹⁾ ± 0,10	5,34 ^{1), 2), 3)} ± 0,04
Стафілококи	3,45 ± 0,09	4,90 ¹⁾ ± 0,07	5,01 ¹⁾ ± 0,07	4,01 ^{1), 2)} ± 0,03	4,98 ¹⁾ ± 0,08	3,82 ^{1), 2), 3)} ± 0,03
Лактобактерії	9,91 ± 0,08	8,25 ¹⁾ ± 0,17	8,10 ¹⁾ ± 0,05	9,75 ²⁾ ± 0,08	8,33 ¹⁾ ± 0,12	9,87 ²⁾ ± 0,08

Примітка. ¹⁾ Статистично достовірна різниця з даними групи контроль І ($p < 0,05$); ²⁾ статистично достовірна різниця з даними групи КП ($p < 0,05$); ³⁾ статистично достовірна різниця з даними групи Е ($p < 0,05$).

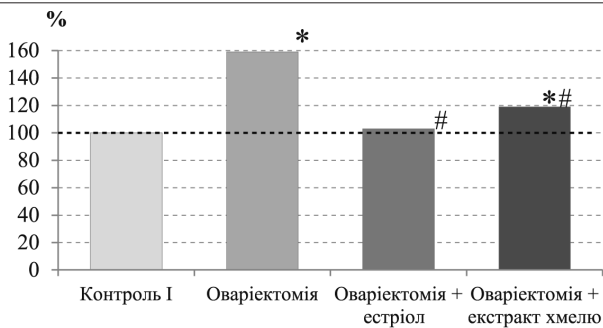


Рис. 3. Значення рН вагінального секрету в самок різних груп після лікування, %

Примітка. За 100 % прийнята величина рН групи контроль I; *статистично достовірна різниця з даними групи контроль I ($p < 0,05$); #статистично достовірна різниця з даними групи КІ (оваріектомія) ($p < 0,05$).

відповідало слабо кислому стану середовища. Тобто, гель з екстрактом хмелю сприяв зниженню рН вагінального секрету з дещо меншою ефективністю, ніж вагінальні супозиторії Овестин.

Відомо, що за умов гіпоестрогенемії ендогенне продукування молочної кислоти, яке відбувається в епітеліальних клітинах піхви під впливом естрогенів, знижується. Іншим джерелом молочної кислоти є глікоген злущених клітин епітелію після перетворення *Lactobacillus acidophilus*, які є звичайною складовою мікрофлори піхви.

У разі зменшення товщини епітеліального слою піхви за умов дефіциту естрогенів та зміни продукування цукрів на поверхні епітелію умови життєдіяльності цих бактерій погіршуються, у тому числі через зсув рН вагінального середовища, що призводить до зменшення їхньої кількості [20–22]. Отримані дані свідчать про наявність у досліджуваного вагінального гелю антибактеріальних властивостей, можливо, завдяки маслу лаванди в його складі [9].

Обговорюючи отримані результати дослідження, слід відмітити релевантність застосованої моделі гіпоестрогенії, так як у оваріектомованих самок через деякий час спостерігали надмірне зростання маси тіла, коливання температури шкіри, що є еквівалентом «приливів жару», порушення мікробіоценозу піхви, лужний зсув рН вагінального секрету, дегенеративні зміни макро- та мікробудови статевих органів, що відповідає клінічним проявам гіпоестрогенних станів. Використання Овестину,

що застосовують при проведенні ЗГТ, призвело до практично повного відновлення стану тварин до рівня інтактних самок. У них нормалізувалася маса тіла, відновилася структура піхви та матки, нормалізувався синтез глікозаміногліканів епітелієм матки з утворенням достатньої кількості цервікального слизу, а також кислотність вагінального секрету. При цьому відмічено зникнення патогенних мікроорганізмів і поява популяції лактобактерій. Вважають, що одним з механізмів цього є відновлення синтезу різних цукрів епітелієм піхви та матки, що визначає зміни біоценозу статевих шляхів та сприяє захисту від інфекцій [23].

Дослідження фармакологічної дії вагінального гелю з ЕХ + МК на організм самок щурів з модельованою гіпоестрогенією показало, що проведене курсове лікування також гальмує зростання маси тіла, попереджає виникнення вазомоторних порушень, розвиток дистрофічних макро- та мікроскопічних змін органів генітального тракту, сприяє відновленню синтезу цервікального слизу в 2/3 тварин та нормалізації кислотності вагінального секрету, але менш ефективно, ніж естріол. Водночас таке лікування не призводило до надмірної проліферації ендометрію, розвитку гіперпластичних процесів у ендометрії, сприяло контролю чисельності популяцій умовно патогенних мікроорганізмів, не викликаючи дисбіоз піхви; а відносно лактобактерій – то навіть збільшувало їхню популяцію. Така дія гелю зумовлена в певній мірі особливостями рецепції фітоестрогенів

ендогенними рецепторами естрадіолу, переважно β -рецепторами [24], а також меншою біодоступністю (через гідрофільність наренгеніну) [25].

Висновки

1. За умов білатеральної овариєктомії в самок щурів відмічено надмірне зростання маси тіла, коливання температури шкіри біля кореня хвоста, зміни мікробіоценозу піхви, збільшення показника рН вагінального секрету, дегенеративні зміни макро- та мікробудови статевих органів, що відповідає клінічним проявам клімактеричного синдрому та інших гіпоестрогенних станів.
2. Застосування гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою 28-денним курсом у дозі 0,06 мг/кг упо-

вільнювало приріст маси тіла овариєктомованих самок, стабілізувало температуру шкіри, запобігало розвитку дистрофічних макро- та мікроскопічних змін органів генітального тракту, сприяло відновленню синтезу цервікального слизу без надмірної проліферації ендометрію та розвитку гіперпластичних процесів у ендометрії, покращувало стан мікробіоценозу піхви та сприяло нормалізації рН вагінального секрету. За сукупністю ефектів гель з фітоестрогенами дещо поступався супозиторіям з естріолом.

3. Гель з екстрактом хмелю та молочною кислотою є перспективним засобом для терапії широкого кола дисгормональних розладів, які виникають за умов недостатності ендогенних естрогенів.

1. Состояние сердечно-сосудистой системы и показатели минеральной плотности костной ткани у женщин после двусторонней овариэктомии / Митрохина Т. В., Юренина С. В., Майчук Е. Ю. [и др.] // Пробл. жен. здор. – 2011. – № 3. – С. 18–25.
2. Calleja-Agius J. The urogenital system and the menopause / Calleja-Agius J., Brincat M. P. // *Climacteric*. – 2015. – V. 18, Suppl 1. – P. 1–22.
3. Kaunitz A. M. Management of Menopausal Symptoms / Kaunitz A. M., Manson J. E. // *Obstet. Gynecol.* – 2015. – V. 126, № 4. – P. 859–876.
4. Shifren J. L. Role of hormone therapy in the management of menopause / Shifren J. L., Schiff I. // *Obstet Gynecol.* – 2010. – V. 115, № 4. – P. 839–855.
5. Impact of a soy drink on climacteric symptoms: an open-label, crossover, randomized clinical trial / Tranche S., Brotons C., Pascual de la Piza B. [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2016. – № 1–6. [Epub ahead of print].
6. Evaluation of estrogenic activity of licorice species in comparison with hops used in botanicals for menopausal symptoms / Hajrahimkhan A., Simmler C., Yuan Y. [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – V. 12, № 8 (7). – P. e67947.
7. Meaidi A. Use of vaginal estrogen in Danish women: A nationwide cross sectional study / Meaidi A., Goukasian I., Lidgaard O. // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2015. – Dec 8. doi: 10.1111/aogs.12833.
8. Киршенблат Я. Д. Практикум по эндокринологии / Я. Д. Киршенблат. – Москва, 1969. – С. 55–57.
9. Jones C. The efficacy of lavender oil on perineal trauma: a review of the evidence / Jones C. // *Complementary Therapies in Clinical Practice*. – 2011. – V. 17, № 4. – P. 215–220.
10. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Рыболовлев Ю. Р., Рыболовлев Р. С. // Доклады АН СССР. – 1979. – № 6. – С. 1513–1516.
11. Novel ligands balance estrogen receptor and agonism for safe and effective suppression of the vasomotor response in the ovariectomized female rat model of menopause / C. McGregor, A. Sau, S.C. Ruddy, D. Leung [et al.] // *Endocrinology*. – 2014. – V. 155, № 7. – P. 2480–2491.
12. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів / Ю. Л. Волянський [та ін.] // Метод. рекомендації. – Київ, 2004. – 38 с.
13. Колодийчук Е. В. Морфологические изменения миокарда овариэктомированных белых крыс на фоне комплексного применения кардиотропных препаратов и заместительной терапии / Колодийчук Е. В. Мернова В. П. // Здоровье и образование в XXI веке : журн. науч. статей. – 2012. – Т. 14, вып. 2. – С. 69–73.
14. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Москва : Медицина, Ленингр. отд.-е., 1969. – 424 с.
15. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
16. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, В. А. Губенко, П. Н. Бабич. – Киев : МОРИОН, 2001. – 408 с.

17. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика / С. А. Гланц . – Москва : Практика, 1998. – 459 с.
18. Al-Safi Z. A. Obesity and Menopause / Al-Safi Z. A. // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2015. – V. 29, № 4. – P. 548–553.
19. Morrow P. K. Hot flashes: a review of pathophysiology and treatment modalities / Morrow P. K., Mat-tair D. N., Hortobagyi G. N. // Oncologist. – 2011. – V. 16, № 11. – P. 1658–1664.
20. Кира Е. Ф. Микроекология влагалища / Кира Е. Ф. // Механизмы стабильности и методы коррекции. – 2014. – № 11(31). – С. 75–81.
21. Lüthje P. Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract / Lüthje P., Hirsch-berg A. L., Brauner A. // Maturitas. – 2014. – V. 77, № 1. – P. 32–36.
22. The primate vaginal microbiome: comparative context and implications for human health and dis-ease / Stumpf R. M., Wilson B. A., Rivera A., Yildirim S. // Am. J. Phys. Anthropol. – 2013. – V. 152, Suppl 57. – P. 119–134.
23. Sugar expressions on the vaginal epithelium in pregnant mice / Yasunaga Y., Takeuchi T., Shimoka-wa T., Nabeta M. // J. Vet. Med. Sci. – 2012. – V. 74, № 6. – P. 805–808.
24. Zhao E. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth / Zhao E., Mu Q. // Sci. Pharm. – 2011. – V. 79, № 1. – P. 1–20.
25. Oral administration of Brazilian propolis exerts estrogenic effect in ovariectomized / Okamoto Y., Tobe T., Ueda K. [et al.] // J. Toxicol. Sci. – 2015. – V. 40, № 2. – P. 235–242.

О. С. Сініцина, Г. В. Зайченко, І. М. Риженко, Ю. Б. Лар'яновська
Корекція станів, асоційованих з дефіцитом естрогенів, за допомогою
комбінованого вагінального гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою

Симптоми, пов'язані з дефіцитом естрогенів внаслідок природного або медикаментозного клімаксу, після хірургічних втручань на статевих органах або терапевтичного радіаційного опромінювання, відмічаються в значній частині жінок. Необхідність їхньої мінімізації, часті протипоказання до проведення патогенетичної замісної гормональної терапії, відмова жінок від такого лікування через побоювання розвитку тяжких ускладнень визначає необхідність пошуку та створення ефективних лікувальних вагінальних засобів на основі природних хімічних сполук, зокрема, фітоестрогенів, які мають естрогеноподібну дію.

Мета дослідження – вивчити лікувальну дію нового комбінованого вагінального гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою за показниками динаміки маси тіла, температури шкіри, стану мікробіоценозу статевих шляхів, кислотності вагінального секрету, макро- та мікроструктури репродуктивних органів у оварієктомованих самок щурів.

Самкам щурів через 5 тижнів після оварієктомії інтравагінально вводили гель з екстрактом хмелю та молочною кислотою в дозі 0,06 мг/кг 28-денним курсом. По закінченні виміряли температуру тіла біля кореня хвоста (аналог симптому «приливи жару», термометр Thermo Tek Q5, США), визначали рН вагінального секрету (вагінальні рН-тести Citolab, Korea), проводили посів його зразків на спеціальні та диференціально-діагностичні поживні середовища для виділення та ідентифікації бактерій піхви, макро- та мікроскопічно досліджували стан піхви та матки та порівнювали ефективність гелю з дією вагінальних супозиторіїв овестин з естріолом.

Встановлено, що застосування гелю уповільнювало приріст маси тіла оварієктомованих самок, стабілізувало температуру шкіри, запобігало розвитку дистрофічних макро- та мікроскопічних змін органів генітального тракту, сприяло відновленню синтезу цервікального слизу без надмірної проліферації ендометрію та розвитку гіперпластичних процесів в ендометрії. У вагінальному секреті самок помірно зменшувалася кількість анаеробних бактерій, зникали клостридії, повністю відновлювалася чисельність лактобактерій, нормалізувалася кислотність. За сукупністю ефектів комбінований гель дещо поступався супозиторіям з естріолом.

Доцільним є подальше дослідження вагінального гелю з екстрактом хмелю та молочною кислотою з метою створення нового засобу для лікування симптомів, пов'язаних з дефіцитом естрогенів у жінок.

Ключові слова: дефіцит естрогенів, вагінальний гель, екстракт хмелю, фітоестрогени

О. С. Синицина, А. В. Зайченко, И. М. Рыженко, Ю. Б. Ларьяновская
Коррекция состояний, ассоциированных с дефицитом эстрогенов, с
помощью комбинированного вагинального геля с экстрактом хмеля и
молочной кислотой

Симптомы, связанные с дефицитом эстрогенов вследствие естественного или медикаментозного климакса, после хирургических операций на половых органах или терапевтического радиационного облучения, отмечаются у значительной части женщин. Необходимость их минимизации, частые противопоказания к проведению патогенетической заместительной гормональной терапии, отказ женщин от такого лечения из-за боязни развития тяжелых осложнений определяет необходимость поиска и создания эффективных лечебных вагинальных средств на основе природных химических соединений, в частности, фитоэстрогенов, обладающих эстрогеноподобным действием.

Цель исследования – изучить лечебное действие нового комбинированного вагинального геля с экстрактом хмеля и молочной кислотой по показателям динамики массы тела, температуры кожи, состояния микробиоценоза половых путей, кислотности вагинального секрета, макро- и микро-структуры репродуктивных органов у овариэктомированных самок крыс.

Самкам крыс через 5 недель после овариэктомии интравагинально вводили гель с экстрактом хмеля и молочной кислотой в дозе 0,06 мг/кг 28-дневным курсом. По окончании измеряли температуру тела у корня хвоста (аналог симптома «приливы жара», термометр Thermo Tek Q5, США), определяли pH вагинального секрета (вагинальные pH-тесты Citolab, Korea), проводили посев его образцов на специальные и дифференциально-диагностические питательные среды для выделения и идентификации бактерий влагалища, проводили макро- и микроскопические исследования состояния влагалища и матки и сравнивали эффективность геля с действием вагинальных суппозитория Овестин с эстриолом.

Установлено, что использование геля замедляло прирост массы тела овариэктомированных самок, стабилизировало температуру кожи, предотвращало дистрофические макро- и микроскопические изменения органов генитального тракта, способствовало возобновлению синтеза цервикальной слизи без чрезмерной пролиферации эндометрия и развития гиперпластических процессов в эндо- и миометрии. В вагинальном секрете самок умеренно уменьшалось количество анаэробных бактерий, исчезали клостридии, полностью восстанавливалась численность лактобактерий, нормализовалась кислотность. По совокупности эффектов комбинированный гель несколько уступал суппозиториям с эстриолом.

Целесообразно продолжить исследование вагинального геля с экстрактом хмеля и молочной кислотой с целью создания нового средства для лечения симптомов, связанных с дефицитом эстрогенов у женщин.

Ключевые слова: дефицит эстрогенов, вагинальный гель, экстракт хмеля, фитоэстрогены

O. S. Sinitsyna, G. V. Zaychenko, I. M. Ryzhenko, Y. B. Laryanovska **Correction of deficit-estrogenic state by the combined vaginal gel with extract of hops and lactic acid**

Symptoms, associated with estrogen deficiency due to natural menopause or medication after surgery on genitals or therapeutic radiation exposure, have been observed in a significant proportion of women. Need to minimize them, frequent contraindications of pathogenetic hormone replacement therapy, rejection of such treatment by women through the fear of severe complications requires a search and development of effective vaginal treatment based on natural chemical compounds, in particular phytoestrogens of estrogen-like effects.

The objective is to investigate the therapeutic effect of new combined vaginal gel with hop extract and lactic acid in terms of the body weight dynamics, skin temperature, condition of microbiocenosis of genital tract, acidity of vaginal secretion, macro- and microstructure of the reproductive organs in spayed rats.

In 5 weeks after spaying, female rats were intravaginally administered with gel with hop extract and lactic acid at a dose of 0,06 mg/kg, 28 day's course. Upon completion of the course, the body temperature at the root of the tail has been measured (similar to symptom «fever flushes», thermometer ThermoTek Q5, USA), vaginal secretion pH has been determined (vaginal pH-tests Citolab, Korea), samples thereof have been seeded in specific and differential diagnostic digestive media for determination and identification of vaginal bacteria, macro- and microscopic examination of vagina and uterus condition has been carried out and efficiency of gel has been compared with the effect of Ovestin with estriol pessaries.

It has been found that the use of gel slows the spayed females weight gain, stabilizes skin temperature, prevents dystrophic macro- and microscopic changes in organs of genital tract, contributes to the resumption of cervical mucus synthesis without excessive endometrium proliferation and development of hyperplastic processes in the endo- and myometrium. The vaginal secretion of females has shown moderate decrease of the number of anaerobic bacteria, no *Clostridia*, completely restored number of lactic acid bacteria, normalization of acidity. For the cumulative effect, the combined gel has yielded to estriol suppositories.

Further study of vaginal gel with the hop extract and lactic acid is feasible with the purpose of creation of a new preparation for treatment of estrogen deficiency related symptoms in women.

Key words: estrogen deficit, vaginal gel, extract of hops, phytoestrogens

Надійшла: 16 лютого 2016 р.

Контактна особа: Сініцина О. С., аспірант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Електронна пошта: ksu.sinitsyna@mail.ru

Розробка інноваційних лікарських засобів у ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

**Участь ДУ «ІФТ НАМНУ» у 6-й Міжнародній виставці «PHARMATechExpo»:
семінар «Цілеспрямовані технологічні, фармако-токсикологічні
та фармацевтичні дослідження як основа сучасної платформи розробки
інноваційних лікарських засобів»**



Участь у міжнародних форумах є доброю традицією для фахівців ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». 22 жовтня 2015 року відбувся семінар «Цілеспрямовані технологічні, фармако-токсикологічні та фармацевтичні дослідження як основа сучасної платформи розробки інноваційних лікарських засобів», який був ініційований організаторами проекту LAVComplex та PharmaTechExpo за сприяння Всеукраїнської громадської організації «Асоціація фармакологів України».

Під час семінару провідні вчені Інституту в галузі хімії, біології, медицини та фармації представили цікаві доповіді, що висвітлювали актуальну тему платформних технологій, які дозволяють транспортувати лікарські засоби до органів-мішеней. Важливо підкреслити, що саме транспортними ліпосомальними системами, антиокси-

дантними ліпосомальними препаратами протягом багатьох років займався академік НАМН України, професор Олександр Вікторович Стефанов, який 15 років був директором Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Цей напрям досліджень сьогодні з успіхом продовжують його колеги.

Перша доповідь була представлена віце-президентом Всеукраїнської громадської організації «Асоціація фармакологів України», заступником директора Інституту з наукової роботи, доктором хімічних наук Г. С. Григор'євою та присвячена універсальним наносистемам доставки лікарських засобів, їх класифікації за типами залежно від природи носія, від виміру, біосумісності, що, у свою чергу, модифікує властивості лікарських засобів. Були узагальнені сучасні погляди на ключові для сьогодення дослідження у сфері нанотехнологій та платформних технологій,

підкреслено здатність за рахунок нанопакування збільшувати активність та терапевтичні властивості препаратів. Прикладом такого лікарського засобу, зокрема, є препарат Ліпофлавіон, який входить до скарбнички наукових досягнень Інституту та застосовується як протизапальний, репараційний, ангіопротекторний засіб. Цей препарат об'єднує антиоксидантні, протизапальні, противірусні властивості біофлавоноїду кверцетину з антигіпоксантами, антиоксидантами, мембранопротекторною дією ліпосомального яєчного фосфатидилхоліну.

Наступною була доповідь головного наукового співробітника відділу експериментальної терапії Інституту, доктора медичних наук О. С. Хромова. Доповідач зупинився на питаннях лікування станів, що супроводжуються критичною недостатністю кровообігу, гіпоксичною гіпоксією тощо. Лекція була присвячена підходам до цитопротекції та захисту найвразливіших ланок функціонування серцево-судинної системи при означених критичних станах з використанням фосфатидилхолінових ліпосом.

Механізму дії фосфоліпідних ліпосом та їхньому терапевтичному потенціалу була присвячена доповідь доктора біологічних наук, професора, завідувачою відділом загальної токсикології В. М. Коваленко. У доповіді було висвітлено історію розробки ліпосомальної системи доставки активних фармацевтичних інгредієнтів, визначено особливості ліпосомальних препаратів, які були створені у світі за останні десятиріччя. Підкреслюючи роль досліджень академіка НАМН України О. В. Стефанова, В. М. Коваленко зупинилася на значущості фармакологічних властивостей ліпосомальної форми фосфатидилхоліну, на основі якої було створено препарат Ліпін, інших сучасних вітчизняних ліпосомальних препаратів, зокрема,

Ліпофлавіону, Ліоліву та Ліпідоксу. У презентації було чітко визначено їхній вплив на різні патологічні процеси в організмі.

Наступний доповідач – кандидат медичних наук, провідний науковий співробітник відділу онкофармакології О. О. Хавич висвітлювала питання широкого використання ліпосомальних препаратів в онкології. У доповіді було підкреслено, що використання ліпосомальних форм протипухлинних засобів покращує ефективність, та певною мірою полегшує перенесення хворими токсичних наслідків хіміотерапії антибластичними засобами, серед яких вже широко використовуються протипухлинні антибіотики антрациклінового ряду, а також долучаються вже відомі ліпосомальні препарати, такі як кверцетин та ліпофлавіон, що повторно досліджуються з метою розширення показань для їхнього використання та залучення до схем та режимів протипухлинної хіміотерапії. Основні результати експериментальних досліджень Ліпофлавіону-Нано з комбінацією цитостатичних препаратів було винесено на обговорення під час презентації.

Останній доклад був присвячений підходам до забезпечення контролю за якістю та стандартизацією ліпосомальних засобів. Лектор – кандидат фармацевтичних наук, керівник Державної лабораторії з контролю якості лікарських засобів ДУ «ІФТ НАМНУ» О. І. Голембіовська визначила тему забезпечення якості ліпосомальних засобів та необхідність відтворення їхніх якісних і кількісних характеристик у межах серії, необхідність проведення контролю їхньої відповідності за різноманітними фізико-хімічними показниками, а також основні параметри стандартизації ліпосом.

Матеріал підготувала провідний науковий співробітник, кандидат медичних наук С. С. Таніна

Терапевтичний потенціал та механізми дії фосфоліпідних ліпосом

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

Широка зацікавленість сьогодні нанопродуктами, зокрема, нанобіотехнологічними продуктами у фармації, цілком зрозуміла. Ці продукти з широким спектром дії інтенсивно використовуються для діагностики, профілактики та лікування захворювань різної етіології. Створення штучних мембран – ліпосом – є одним з перспективних напрямів сучасної нанобіотехнології.

Ліпосоми не слід розглядати лише як інертні носії. Їхній фосфоліпідний склад визначає рідкокристалічні властивості та проникність мембран, що наразі розглядаються як панель управління внутрішньоклітинними процесами. Фосфоліпіди проявляють мембранотропну дію, впливаючи на структуру мембран. Ламелярна конфігурація фосфатидилхолінових міцел є ідеальним структурним елементом репарації біомембран. Також слід відзначити, що фосфоліпіди не викликають викривлення мембран і здатні нормалізувати текучість і мембранний транспорт. До того ж фосфатидилхолін – попередник синтезу ліпідних форм, здатних забезпечувати мембраностабілізуючу дію. Фосфатидилхолін як попередник синтезу діацилгліцеролу, сфінгомієліну, фосфатидної кислоти, лізофосфатидилхоліну, фосфатидилсерину, фактора активації тромбоцитів – важливих компонентів сигнальних систем – здатен впливати на сигнальну функцію мембран.

Завдяки антирадикальним властивостям, здатності інактивувати іони металів перемінної валентності фосфоліпіди проявляють радіпротекторні та генопротекторні властивості. Крім того, фосфатидилінозитол впливає на стабілізацію та регуляцію хроматину.

Гіполіпідемічна дія фосфоліпідів реалізується шляхом зниження експресії ацетил-СоА-карбоксилази та синтезу ЖК шляхом транскрипційної супресії

SREBP-1 сигналізації, пов'язаної з ростом адипоцитів і гомеостазом холестеролу, збільшення β -окиснення жирних кислот, супресії синтезу жирних кислот.

Поверхнево-активні властивості фосфоліпідів є підставою для їхнього використання при лікуванні легеневих захворювань.

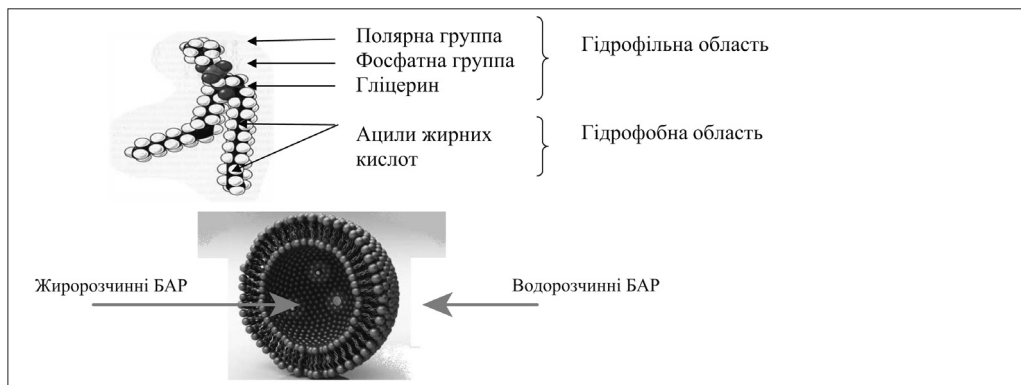
З огляду на зазначене, під керівництвом академіка НАМН України О. В. Стефанова було досліджено фармакологічні властивості ліпосомальної форми фосфатидилхоліну та створено на її основі препарат Ліпін.

Ліпін показаний до застосування при широкому переліку захворювань. У пульмонології він використовується для лікування гострої та хронічної легеневої недостатності різного генезу в дорослих та дітей, у тому числі новонароджених і недоношених. У гастроентерології Ліпін застосовують при гострих і хронічних активних гепатитах, хронічному некалькульозному холециститі, цирозі печінки, неспецифічному виразковому коліті. Також зазначений препарат показаний при інфаркті міокарда, нестабільній стенокардії, гострому та хронічному пієлонефриті, хронічному гломерулонефриті, діабетичній нефропатії в стадії ниркової недостатності, в акушерстві для лікування пізнього гестозу, внутрішньоутробної гіпоксії плода.

З огляду на амфіфільність ліпосом (наявність гідрофільної та гідрофобної області в молекулі фосфатидилхоліну), вони здатні виступати носіями як водо-, так і ліпідорозчинних фармацевтично активних інгредієнтів.

Доставка діючої речовини ліпосомами має ряд переваг завдяки:

- спорідненості з клітинами та тканинами;
- здатності накопичуватися в ішемізованих тканинах;
- доставці до мішеней гідрофільних та



- гідрофобних лікарських засобів;
- контрольованому вивільненню діючої речовини;
 - пролонгації дії;
 - зменшенню токсичності.

Отже, ліпосоми є корисними для забезпечення біодоступності діючої речовини, яка має низький рівень розчинності, велику молекулярну масу, є нестабільною та має короткий термін терапевтичної дії.

Історія розробки ліпосомальної системи доставки активних фармацевтичних інгредієнтів бере початок із 1964 року, коли Bangham and Horne вперше отримали багаточислові везикули. Наступного року Bangham et al., (1965 p.) повідо-

мили про створення модельної біомембранної системи на основі структур везикул, що має іонний градієнт. Уперше використав ліпосоми для доставки біоактивної субстанції Gregoriadis i et al. (1971 p.).

У 1990 році вийшов на ринок Європи перший ін'єкційний ліпосомальний препарат амфотерицин В (AmBisome®). FDA затвердила перший ліпосомальний протипухлинний засіб (Doxil®), який також є першим нанопрепаратом, впровадженим у США.

У таблиці 1 наведено перелік природних фосфоліпідів, що використовуються для створення ліпосомальних лікарських засобів.

Таблиця 1

Природні фосфоліпіди та їхні похідні, що використовуються в ліпосомальних препаратах

Препарат	Фосфоліпіди	Лікарський засіб	Рік впровадження
Ambisome®	Гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін та дистероїлфосфатидилгліцерол	Amphotericin B	1990 (Europe)
			1997 (USA), 2000
Doxil®	Гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін та дистероїлфосфатидилгліцерол-PEG2000	Doxorubicin	1995, 1999, 2003 (Europe, Canada) 2007)
DaunoXome®	Дистеарилфосфатидилхолін	Daunorubicin	1996 (Europe)
			1996 (USA)
Myocet™	Яєчний фосфатидилхолін	Doxorubicin	2000 (Europe)
DepoDur™	Діолеїлфосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидилгліцерол	Morphine sulfate	2004
DepoCyt®	Діолеїлфосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидил-гліцерол	Cytosine Arabinoside	1999
Lipo-Dox®	Дистеарилфосфатидилхолін та дистероїлфосфатидилгліцерол-PEG2000	Doxorubicin	2001 (Taiwan)
Marqibo®	Яєчний сфінгомієлін	Vincristine	2012 (USA)

За останні 50 років у плані розробки ліпосомальних препаратів слід зазначити ряд важливих технічних досягнень, до яких належать:

- направлена доставка ліків;
- екструзія для отримання однорідних розмірів ліпосом;
- регульоване вивільнення активних фармацевтичних інгредієнтів;
- пролонгована присутність у кровоносному руслі завдяки пегільованим ліпосомам;
- створення ліпосом, що містять полімери нуклеїнових кислот;
- розробка ліпосомальних форм лікарських засобів з лігандами до мішеней.

Це дозволило створити високоефективні лікарські засоби за кордоном (табл. 2) та в Україні (табл. 3), що мають різні показання до медичного застосування.

Ліпофлавіон. Ліпофлавіон, ліофілізат для емульсії для ін'єкцій у флаконах № 1, що містить лецитин-стандарту у перерахунку на лецитин 550 мг та кверцетин у перерахунку на суху речовину 15 мг. Механізм фармакологічної дії Ліпофлавіону визначається його складовими. Дані щодо ефективності фосфатидилхоліну та його ліпосомальної форми наведено вище. Що стосується кверцетину, то відомо, що цей біофлавоноїд є сильним антиоксидантом,

Таблиця 2

Лікарські засоби в ліпосомальній формі

Назва	Активна субстанція	Показання до застосування	Виробник
Abelcet	amphotericin B	Грибкова інфекція	Enzon
Ambisome®	amphotericin B	Грибкова та протозойна інфекція	Gilead Sciences
Depocyt®	cytarabine	Злоякісний лімфоматозний менінгіт	Pacira
DaunoXome®	daunorubicin	ВІЛ-зумовлена саркома Kaposi	Gilead Sciences
Myocet®	doxorubicin	З циклофосфамідом при метастатичному раку легень	Zeneus
Epaxal	IRIV vaccine	Гепатит А	Crucell
Inflexal V	IRIV vaccine	Грип	Berna Biotech
DepoDur®	morphine	Післяопераційна аналгезія	SkyePharma, Endo
Visudyne	verteporfin	Вікова дегенерація макули, міопія	QLT, Novartis
Curosurf	liposomeproteins SP-B i SP-C	Окулярний гістоплазмоз	Chiesi Farmaceutici, S.p.A.
Doxil®/ Caelyx	liposome-PEG doxorubicin	Сурфактант легень при синдромі дистресу дихання	Orto Biotech, Shering Plough
Estrasorb	estradiol	Терапія менопаузи	Novavax
Marqibo®	vincristine	Гостра лімфобластозна лейкемія, меланома	Spectrum Pharmaceuticals
Lipo-Dox®	liposome-PEG doxorubicin	Саркома Каросі, метастатичний рак легень, метастатичний рак яєчників, множинна меланома	TTY BIOPHARM
Lipopheron®	interferon alpha-2b	Імуностимулятор	Jadran

Вітчизняні ліпосомальні препарати направленої дії

Препарат	Виробник	Активна фармацевтична субстанція	Основна фармакологічна дія
Ліпін	ЗАТ «Біолік»	Фосфатидилхолін	Антигіпоксична Антиоксидантна Мембранопротекторна
Ліпофла- вон	ЗАТ «Біолік»	Фосфатидилхолін, кверцетин	Кардіопротекторна Протипухлинна (препарат супроводу) Офтальмологічна Антиоксидантна
Ліолів	ЗАТ «Біолік»	Фосфатидилхолін, антраль	Гепатопротекторна
Ліподокс	ЗАТ «Біолік»	Фосфатидилхолін, доксорубіцину гідрохлорид	Протипухлинна

який переважає α -токоферол. Антиоксидантні властивості кверцетину зумовлені наявністю в його молекулі 3 центрів. Найвираженішу антиоксидантну активність проявляє перший центр за рахунок наявності двох дипольних гідроксильних груп, які легко окиснюються активним киснем і вільними радикалами. Унаслідок окиснення кверцетину утворюється менш реактивний радикал. Два інші центри реалізують антиоксидантну дію за рахунок комплексоутворення з дво- і тривалентними металами (Fe^{3+} , Cu^{2+}), що входять до складу каталітичних центрів окисно-відновних ферментів, і азотовмісними еко4ендотоксинами. Зокрема, кверцетин утворює хелати заліза. Також він здатний інгібувати ксантиноксидазу та зменшувати оксидативні ушкодження.

Відомо, що в основі патологічних процесів у міокарді лежать порушення цілісності мембран кардіоміоцитів, активація фосфоліпази та оксигеназ, які стимулюють утворення вільних радикалів, провокуючи аномальне ПОЛ. Одночасно з ініціюванням ПОЛ спостерігається активація ліпоксигеназ, які підсилюють утворення лейкотрієнів. Останні, у свою чергу, викликають коронарний спазм, тахіаритмії, збільшують агрегацію тромбоцитів, запалення кардіоміоцитів. Доведено, що біофлавоноїд кверцетин є перспективним інгібітором ліпоксигеназ. В основі його протизапальної ефективнос-

ті лежить інгібіторна дія щодо 5-ліпоксигенази, експресії індукційної NO синтази і NF κ B, забезпечення стабілізації мембран тучних клітин та інгібування дегрануляції базофілів, зниження активності комплементу, а отже зменшення адгезії клітин запалення з ендотелієм. Крім того, ангіопротекторні властивості даного біофлавоноїду реалізуються завдяки зменшенню імобілізації лейкоцитів із стінкою ендотелію в ході ішемії та реперфузії, індукції активності NO синтази, інгібуванню каталітичної активності тромбіну в реакції зв'язування фібриногену, гіполіпідемічній дії.

Кверцетин виявляє також протипухлинну дію, інгібуючи проліферацію клітин шляхом взаємодії з білками сигнального шляху онтогенезу, індукуючи апоптоз і блокуючи клітинний цикл ракових клітин.

За даними клінічних досліджень у хворих на гострий коронарний синдром з елевацією сегмента ST під час проведення успішної реваскуляції міокарда з використанням інгібітора 5-ліпоксигенази – корвітину (розчинна форма кверцетину) – у ранні терміни захворювання зменшується поширення зони некрозу (у пацієнтів з гострим інфарктом міокарда з відкритою інфарктзалежною вінцевою артерією). Також показано, що раннє призначення кверцетину сприяло зменшенню дисфункції лівого шлуночка міокарда, покращанню скоротливої здатності міокарда.

Ex vivo також виявлено інгібуючу дію кверцетину на експресію циклооксигенази-2, пригнічення ним утворення тромбосану В2 і гальмування агрегації тромбоцитів.

У таблиці 4 наведено дані щодо ефективності кверцетину за гострого коронарного синдрому.

Проте фактором, що лімітує застосування кверцетину в медичній практиці, є низька біодоступність, пов'язана з його гідрофобними властивостями. Спроба поєднати властивості кверцетину та фосфатидилхоліну в одному препараті шляхом включення першого в унікальну систему доставки – ліпосому – призвела до створення в Україні в Інституті фармакології та токсикології НАМН України нового лікарського засобу – ліпосомальної форми кверцетину, Ліпофлакону. Даний препарат показаний до застосування у кардіології при гострому інфаркті міокарда без зубця Q, нестабільній і стабільній стенокардії, міокардиті, як препарат супроводу для запобігання токсичних уражень міокарда при проведенні циклів поліхіміотерапії раку молочної залози. Препарат створено з урахуванням механізмів патологічних процесів у міокарді, з одного боку, і фармакологічних ефектів фосфатидилхоліну та кверцетину.

З огляду на досягнення високої біодоступності, синергізму ефектів кверцетину й ліпосомальної форми фосфатидилхоліну, що супроводжується посиленням антиоксидантної, цитопро-

текторної, імуномодуючої та ендотелійпротекторної дії, даному препарату належить особливе місце. Включення кверцетину до ліпосом дозволило не тільки суттєво збільшити його біодоступність, але за даними доклінічних досліджень розширило можливості застосування даного препарату за різних патологічних станів, для корекції яких необхідний засіб з багатовекторною фармакодинамікою: антиоксидантною, антирадикальною, антигіпоксичною, протиішемичною та мембраностабілізуючою дією (табл. 5).

За даними клінічних випробувань застосування Ліпофлакону протягом 6 місяців на фоні тромболітичної терапії у хворих на гострий інфаркт міокарда позитивно вплинуло на систолічну й діастолічну функції лівого шлуночка та швидкість його ремоделювання, функцію мітрального клапану, сприяло прогресивному зниженню ступеня мітральної регургітації, зменшенню жорсткості серцевого м'яза, а також розмірів лівого передсердя, що знижує ризик виникнення загрозливих для життя порушень ритму та раптової смерті.

У хворих на нестабільну стенокардію застосування Ліпофлакону на тлі базової терапії сприяло покращанню серцевого ритму та інших показників:

- пришвидшувалося зникнення клінічних проявів стенокардії (больовий та астено-вегетативний синдроми);
- знижувалася активність симпатичної ланки вегетативної нервової системи;

Таблиця 4

Ефекти застосування кверцетину за гострого коронарного синдрому

Репаративна дія (нормалізація трофіки тканин) Протизапальна дія (зниження синтезу лейкотрієнів)	→	Зменшення розмірів зони некрозу
Антиоксидантна й антигіпоксична дії (зниження активності процесів ПОЛ, стабілізація мембран)	→	Підвищення резистентності мембран кардіоміоцитів до ішемії, зменшення числа ускладнень, пов'язаних з реперфузією міокарда
Ангіопротекторна дія (нормалізація підвищеної судинно-тканинної проникності)	→	Покращання внутрішньосерцевої гемодинаміки
Протиаритмічна дія	→	Підвищення електричної стабільності серця

Фармакологічна дія Ліпофлакону в експерименті

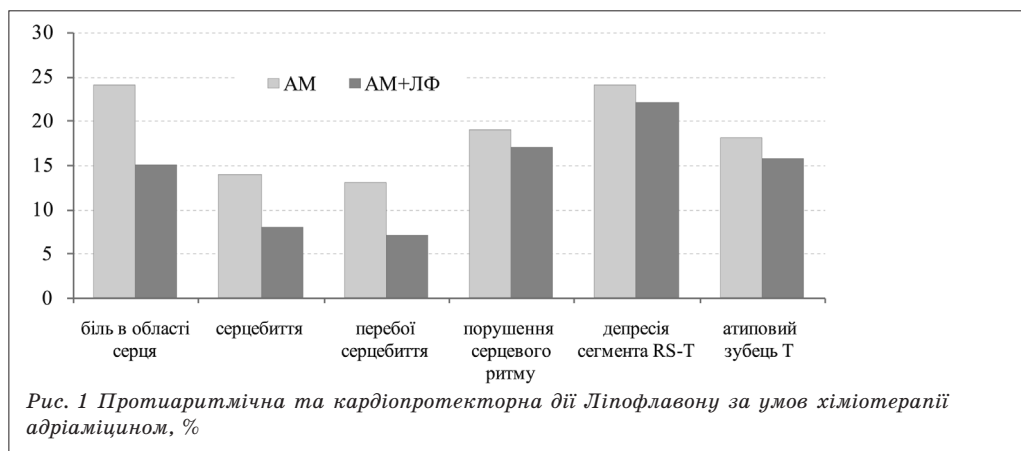
Активність	Модель	Кількість публікацій (роки)
Кардіопротекторна	Доксорубіцинова кардіоміопатія Адреналіновий міокардит Ізодриновий міокардит Хронічна серцева недостатність	12 (2003–2009)
Ангіопротекторна	Стрептозотоциновий діабет (судинні дисфункції <i>in vitro</i>) Опромінення в дозі 6 Гр (посляпроменева гіпертензія)	3 (2006–2012)
Протипроменева	Гостре променеве ураження мишей	4 (2006–2009)
Церебро-протекторна	Геморагічний інсульт Черепномозкова травма	4 (2005–2010)
Нейропротекторна	Травматичне пошкодження сідничного нерва	3 (2010)
Нефропротекторна	Гостра токсична нефропатія	6 (2008–2011)
Гепатопротекторна	Експериментальні гепатити різної етіології	7 (2004–2007)
Противиразкова	Етанол-преднізолонова виразка шлунка Аспіринова виразка шлунка	2 (2007, 2008)
Протиопікова	Термічний опік шкіри 2–3А ступеня	1 2007

- нормалізувався парасимпатичний баланс та показники ПОЛ і системи антиоксидантного захисту;
- нормалізувався рівень Т- і В-лімфоцитів, активізувалися супресорні регуляторні механізми, відбувалося пригнічення гуморальної ланки імунітету, що сприяло усуненню розбалансованості й аутоагресії імунного гомеостазу;
- нормалізувався рівень С-реактивного білка та ліпідного спектра крові;
- покращувався суб'єктивний стан пацієнтів та об'єктивні показники роботи серцево-судинної системи;
- збільшувалася толерантність до фізичного навантаження.

Дані щодо кардіопротекторної дії Ліпофлакону за умов застосування як препарату супроводу за протипухлинної фармакотерапії раку молочної залози наведено на рисунку 1.

Ще однією лікарською формою є Ліпофлакон для застосування в офтальмології – ліофілізат для очних крапель.

Препарат випускають у вигляді порошку ліофілізованого для приготування очних крапель у флаконах. Препарат дозволений до клінічного застосування в офтальмологічній практиці (наказ МОЗ України від 7 квітня 2005 р. № 156) і зареєстрований в Україні (реєстраційне посвідчення № UA/3053/01/01). Даний препарат застосовується при лікуванні хворих на травматичні кератити, при цьому прискорюється термін епітелізації, зменшується тривалість збереження больових відчуттів. Застосування Ліпофлакону сприяє швидкій регресії запального процесу при комплексному лікуванні хворих після екстракції катаракти з наступною імплантацією. Виявлено ефективність препарату в комплексному лікуванні дегенеративних захворювань сітківки, наприклад, непроліферативної діабетичної ретинопатії, що нерідко призводить до значного зниження зору, сліпоті та інвалідності. У патогенезі діабетичної ретинопатії важливу роль відіграють метабо-



лічні та гемодинамічні порушення. Метаболічні аномалії призводять до ушкодження мембран, порушення проникності клітин, ішемії сітківки. При цьому підвищується в'язкість крові, ущільнюється базальна мембрана судин сітківки, руйнуються перичити та утворюються капілярні мікроаневризми. Погіршення реологічних властивостей крові призводить до порушення капілярного кровотоку, підвищення кров'яного тиску в капілярах сітківки. Елементи крові з патологічно змінених судин потрапляють у сітківку. У структурно змінених ішемізованих сітківці утворюється велика кількість цитокінів і факторів росту, створюються сприятливі умови для неоваскуляризації, розвиваються клінічні ознаки діабетичної ретинопатії. У комплексному лікуванні хворих на діабетичну ретинопатію Ліпофлавон сприяє розширенню порогової чутливості сітківки, зменшенню набряку сітківки та показника порога електричної чутливості за фосфеном, збільшенню показника критичної частоти зникнення миготіння за фосфеном, корекції вмісту прозапальних (IL-1 β і TNF- α) і протизапального (IL-4) цитокінів.

Використання препарату Ліпофлавон (внутрішньовенно 10 ін'єкцій на тлі інсталяції цього самого препарату в кон'юнктивальну порожнину по 1 краплі 5 разів на день протягом двох місяців) паралельно з базисною терапією (вітамін Е по 0,3 г на добу) дозволило досягти достовірного збільшення гостроти зору порівняно з базисною терапією, сприяло підвищенню рівня антиоксидантного статусу організму за активністю глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, каталази та рівнем малонового діальдегіду.

Натепер хвороби рогівки, зокрема травматичного генезу, є однією з основних причин звертання хворих за офтальмологічною допомогою. Проаналізовано вплив застосування Ліпофла-вону додатково до базисної терапії на показники місцевого імунітету ока при лікуванні хворих на травматичні ерозії рогівки. За умов додаткового застосування Ліпофла-вону відмічено підвищення рівня секреторного імуноглобуліну А, лізоциму, а також зниження вираженості аутоімунних й імунокомплексних реакцій, тоді як у групі порівняння (базисна терапія)

Таблиця 6

Рівень цитокінів сльози у хворих на травматичну ерозію рогівки до та після лікування

Імунологічний показник	Базисна терапія + Ліпофлавон (n = 80)		Базисна терапія (n = 40)	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
TNF- α , пг/мл	204,0 $\pm$ 2,2***	109,0 $\pm$ 2,1	202,0 $\pm$ 2,3***	131,0 $\pm$ 2,5*
IL-1 β , пг/мл	187,0 $\pm$ 2,0***	101,0 $\pm$ 1,6	189,0 $\pm$ 2,1***	124,0 $\pm$ 2,4***
IL-4, пг/мл	26**	47,3**	27*	30

Примітка. Достовірність відмінностей показника по відношенню до норми: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$; *** – $P < 0,001$.

наприкінці лікування зберігалися підвищеними показники циркулюючих імунних комплексів, слабка динаміка рівнів імуноглобуліну А і лізоциму, висока активність автоімунних реакцій (табл. 6).

В основній групі хворих за інсталяції додатково Ліпофлакону в період реконвалесценції (через 1 тиждень) цитокіновий профіль сльози нормалізувався: рівень прозапальних цитокінів сльози сягав показників норми, а протизапального – значно підвищувався.

У пацієнтів, яким додатково до традиційної терапії призначали Ліпофлакон, швидкість епітелізації за флюоресцеїновим тестом підвищувалася в середньому в 2,1 разу, час реконвалесценції пацієнтів наступав на 2 дні раніше, ніж у групі порівняння. При цьому зменшувалася тривалість збереження суб'єктивних скарг і об'єктивних ознак запалення відносно групи порівняння.

Препарат Ліолів-Біолік®-Ліофілізат для емульсії для ін'єкцій. Склад: діючі речовини: 1 флакон (пляшка) містить лецитин-стандарт (у перерахуванні на лецитин) – 320 мг; антраль (у перерахуванні на безводну речовину) – 4,2 мг; допоміжна речовина: лактоза моногідрат.

Ліолів-Біолік® належить до групи гепатопротекторних препаратів. Показаний для лікування гострих та хронічних гепатитів різної етіології (у тому числі вірусної), доброякісної гіпербілірубінемії та цирозу печінки в дорослих і дітей віком від 12 років. При курсовому застосуванні препарат виявляє виражені детоксикаційні властивості, зменшує прояви цитолітичного, мезенхімально-запального та холестатичного синдромів; нормалізує показники протеїнограми, вмісту білірубину, холестерину, трансаміназ і лужної фосфатази в

крові, протромбіновий індекс. Зменшує інтенсивність астеновегетативних порушень і диспептичних проявів. За результатами доклінічних досліджень встановлено, що Ліолів-Біолік® сприяє послабленню наслідків дії гепатотоксинів, активації репаративних процесів у гепатоцитах та нормалізації показників структурно-функціонального стану печінки в дорослих, молодих та нестатевозрілих тварин. Препарат інгібує процеси перекисного окиснення ліпідів у крові та тканинах, підтримує активність антиоксидантних систем організму, виконує функцію неспецифічного детоксиканту, проявляє мембранопротекторний і протизапальний ефект. Ліолів-Біолік® не порушує функціональну діяльність органів та систем організму, нетоксичний, не має кумулятивних властивостей.

На завершення хотілось би відмітити, що Україна є однією з небагатьох країн, де активно розробляють нанобіотехнології у фармації. Протягом 30 років даний напрям розвивається в Україні завдяки співдружності фахівців у галузі хімії ліпідів, фармакології, технології (академік НАМН України О. В. Стефанов зі співробітниками, д.х.н. Г. С. Григор'єва, к.х.н. Н. Ф. Конахович; академік РАМН В. І. Швець зі співробітниками; фахівці ЗАТ «Біолік» к.ф.н. Г. А. Сенніков, д.ф.н. Ю. М. Краснопольський). Це дозволило Україні вийти на світовий рівень у питанні розробки та промислового виробництва ліпосомальних препаратів різної спрямованості. Сьогодні інші вітчизняні фармацевтичні підприємства мають реальні плани з розробки та впровадження ліпосомальних лікарських засобів різної дії.

Расширение показаний для применения липосомальных средств при опухолевом росте

Государственное учреждение «Институт фармакологии и токсикологии
Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев

В Украине каждый год обнаруживается более 160 тыс. новых случаев злокачественных новообразований, почти 100 тыс. жителей умирают от рака, причем 35 % умерших – лица трудоспособного возраста; каждый час регистрируется более 20 новых случаев заболевания, а 10 жителей Украины умирают от рака. По расчетам специалистов, до 2020 года количество впервые заболевших раком в Украине превысит 200 тыс. в год.

В современной терапии онкологических больных ведущее место занимает химиотерапия, а именно, полихимиотерапия (ПХТ). Она может применяться в качестве единственного метода лечения или в комбинации с другими методами. Достижения современной химиотерапии позволили добиться успехов в излечении многих злокачественных новообразований, считавшихся ранее фатальными. Повышение эффективности лечения достигнуто благодаря интенсификации режимов химиотерапии. Однако негативной стороной ПХТ являются побочные эффекты противоопухолевых лекарственных средств, обусловленные низкой селективностью большинства цитостатиков, что служит серьезным ограничением в достижении максимального лечебного действия.

Возникновение побочных эффектов при проведении химиотерапии у онкологических больных связано со спецификой противоопухолевого эффекта препаратов, их низкой избирательностью, а также необходимостью поддерживать достаточно высокую терапевтическую дозу. Выраженность побочных эффектов зависит от типа, общей и суммарной дозы препарата, а также длительности химиотерапии.

Поражение сердца при назначении цитостатических препаратов (антраци-

клинов, флуороурацила, капецитабина, митоксантрона, цисплатина, таксанов), а также моноклональных антител (трастузумаба) может быть лимитирующим фактором в лечении онкологических заболеваний. Антрациклины (доксорубицин, эпирубицин, акларубицин, идарубицин) относятся к химиотерапевтическим антимитотическим антибиотикам, улучшающим прогноз при лейкозах, лимфомах, некоторых солидных опухолях. Несмотря на то, что антрациклины используют в онкологии уже более 30 лет, они все еще остаются препаратами первой линии.

К сожалению, антрациклины обладают высокой токсичностью (вызывают тошноту, рвоту, алопецию, супрессию гемопоэза). Кардиотоксичность этих препаратов является причиной снижения качества жизни и преждевременной смерти онкологических больных. В последние годы частота случаев кардиотоксичности несколько снизилась, что связано с изменением протоколов лечения. Тем не менее диагностика и лечение повреждения миокарда на фоне полихимиотерапии (ПХТ) онкологических заболеваний все еще остается неразрешенной проблемой.

В многочисленных клинических исследованиях было выявлено, что доксорубицин-индуцированная кардиотоксичность и застойная сердечная недостаточность (ЗСН) являются дозозависимыми, а частота возникновения этих осложнений резко повышается после достижения кумулятивной дозы более 550 мг/м². У 4 % пациентов, получивших кумулятивную дозу 500–550 мг/м², развилась ЗСН, частота случаев развития сердечной недостаточности (СН) повысилась до 18 % среди пациентов, получивших кумулятивную дозу 551–600 мг/м², и более 36 % – среди пациентов, получивших доксорубицин в дозе, превышавшей 601 мг/м².

Интересно, что между возникновением нарушения сократительной функции миокарда и кумулятивной дозой антрациклинов прямой линейной зависимости нет, а токсичность существенно варьирует у разных антрациклинов.

Большой разброс частоты выявленных случаев кардиотоксичности в различных исследованиях связан с разными критериями и возможностями диагностики. Клинико-инструментальные признаки поражения сердца выявляют, как правило, при суммарной дозе антрациклина, превышающей 550 мг/м². В то же время некоторые исследователи отмечают субклинические проявления кардиотоксичности даже при небольших дозах.

Вопрос о механизме кардиотоксического действия антрациклинов остается открытым. Можно выделить несколько общих причин возникновения кардиомиопатии, вызванной антрациклинами:

- снижение содержания антиоксидантов;
- нарастание оксидантного стресса;
- повреждение митохондрий;
- уменьшение активности Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатазы;
- связывание антрациклинов с ДНК;
- ингибирование коэнзима Q10;
- связывание антрациклинов с двухвалентными катионами (Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺);
- увеличение потока кальция и ингибирование функции саркоплазматического ретикулума;
- нарушение регуляции миокардиального фактора некроза опухолей (ФНО-α);
- повреждение β-адренергических рецепторов в обоих желудочках при хронической сердечной недостаточности, индуцированной антрациклинами;
- пострецепторные нарушения, включая повреждение связанных с гуаниновыми нуклеотидами протеинов или каталитического центра аденилатциклазы.

Обнаруженные антигенпрезентирующие клетки в миокарде дают основание предполагать наличие связи между кардиотоксичностью антрациклинов и

индукцией иммунных реакций. Также обсуждается влияние цитотоксических агентов на некоторые фосфолипиды, особенно кардиолипиды.

Независимо от всех вероятных механизмов антрациклины способствуют образованию свободных радикалов, что приводит к избыточному перекисному окислению липидов и повреждению мембран. Это наиболее вероятный механизм развития антрациклиновой кардиотоксичности.

Ценная информация была получена при анализе медицинской документации 1273 пациентов 12 европейских онкологических центров, которые были включены в исследование кардиотоксичности адриамицина. Среди возможных факторов риска выделили:

- степень экспозиции препарата (инфузия высокой дозы или большой кумулятивной дозы антрациклина);
- возраст (у больных пожилого и старческого возраста риск выше, чем у пациентов молодого возраста);
- заболевания сердца в анамнезе, артериальная гипертензия;
- комбинированная терапия, предшествующая лучевая или химиотерапия.

Влияния пола, нозологии, функции печени и приема циклофосамида на риск развития адриамицин-индуцированной кардиомиопатии выявлено не было. В этом исследовании также не выявили зависимости развития признаков кардиотоксичности от возраста.

Среднетерапевтическая доза доксорубицина составляет 60–75 мг/м² каждые 3 недели. Определены минимальные кумулятивные дозы антрациклинов у взрослых пациентов, превышение которых сопровождается риском повреждения миокарда (доксорубицин – 550 мг/м², даунорубицин – 600 мг/м², эпирубицин – 1000 мг/м², митоксантрон 160 мг/м², зорубицин 1900 мг/м²). При сопутствующей ишемической болезни сердца может снижаться кумулятивная доза, при которой развивается кардиомиопатия. Развитие кардиотоксичности АГ потенцирует даже при применении антрациклинов в низкой дозе. Также существуют доказательства повышенного риска развития кардиотоксично-

сти при применении антрациклинов у женщин. У пациентов старше 60 лет риск развития ЗСН в четыре раза выше, чем у пациентов моложе 39 лет.

Коррекции и профилактике антрациклин-индуцированной кардиотоксичности посвящено много исследований. Направленность этих исследований можно разделить на следующие группы:

- уменьшение концентрации в плазме и скорости инфузии антрациклинов;
- применение липосомальных лекарственных форм;
- использование кардиопротекторов.

В качестве кардиопротекторов большое внимание уделяется биофлавоноидам, в частности, кверцетину и его липосомальной форме. Кверцетин – один из мощных антиоксидантов не только среди флавоноидов, но и среди соединений других групп, по своим антиоксидантным свойствам он превосходит α -токоферол.

Было проведено открытое исследование (II фаза) по изучению эффективности и переносимости липосомальной формы кверцетина, препарата Липофлавон, используемого в качестве кардиопротектора при проведении курса химиотерапии. Применение Липофлавона на фоне химиотерапии было эффективным у 94 % больных, что проявилось в положительной динамике уровня кардиоспецифического тропонина, более выраженной регрессии экстрасистолической аритмии. Препарат Липофлавон характеризуется удовлетворительной переносимостью – 90 % больных перенесли терапию удовлетворительно, только у 10 % развились аллергические реакции на препарат. Липофлавон был рекомендован для клинического применения как кардиопротектор при полихимиотерапии у больных раком молочной железы.

В Институте фармакологии и токсикологии НАМН Украины несколькими отделами были проведены доклинические исследования влияния новой лекарственной формы липофлавона – Липофлавон-Нано на гомеостаз при введении комбинации цитостатиков. Были выбраны комбинации, применяемые для лечения немелкоклеточного

рака легкого и рака молочной железы, а в качестве модели использовали карциносаркому Уокера.

Проведенные исследования показали, что одноразовое введение животным исследуемых комбинаций цитостатиков проявляет специфическое противоопухолевое действие, одновременно вызывая негативные изменения показателей венозной крови (содержание гемоглобина, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и уровня гематокрита) и биохимических показателей сыворотки крови (активности ГГТ, АсАТ и ЩФ, уровня холестерина, содержания общего белка и мочевины), а также дистрофические изменения в некоторых органах и тканях (печень, почки, сердце).

Введение Липофлавон-Нано приводит к снижению в 5 раз активности ГГТ в сыворотке крови, что может свидетельствовать о гепатопротекторном действии. В венозной крови наблюдали снижение уровня лейкоцитов на 41 %, увеличение содержания гемоглобина на 64 % и гематокрита на 56,6 %.

Введение Липофлавон-Нано на фоне комбинаций цитостатиков (клинические дозы) вызывает нормализацию показателей гемоглобина, гематокрита, уменьшение количества лейкоцитов на 18 %, нормализацию содержания лимфоцитов и моноцитов.

Проведены исследования влияния Липофлавон-Нано на противоопухолевую активность комбинаций цитостатиков, а также на продолжительность жизни животных с карциносаркомой Уокера. Было показано, что введение Липофлавон-Нано увеличивает продолжительность жизни до 57,7 дня по сравнению с комбинацией (42,3 дня).

Результаты проведенных исследований коррекции Липофлавон-Нано патологических изменений при опухолевом росте и побочных эффектов химиотерапии соответствуют данным клинического применения аналога, препарата Липофлавон в циклах химиотерапии, показывают целесообразность разработки клинических режимов применения Липофлавон-Нано как препарата сопровождения для коррекции показателей гомеостаза и улучшения качества жизни онкологических больных.

Забезпечення контролю якості та стандартизації ліпосомальних засобів

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

Якість лікарських препаратів закладається на етапі фармацевтичної розробки, для якої встановлено загальний методологічний підхід і спеціальні підходи відносно різних лікарських форм, у тому числі ліпосомальних лікарських засобів, та зберігається протягом усього їхнього життєвого циклу.

Ліпосоми – це мікровезикули, які складаються з одного або декількох бішарів, розділених водними прошарками, утворених амфіфільними молекулами фосфоліпідів, які оточують водний центр. У ліпосомальних засобах, як правило, водорозчинні лікарські речовини заключені в водне середовище ліпосоми, а ліпофільні – в ліпідний шар ліпосоми. Вивільнення лікарських речовин з ліпосом модифікується за рахунок спеціальних добавок, таких як холестерин та поліетиленгліколь. Ліпосомальні засоби є термодинамічними мікроемульсіями, у яких фази представлені ліпідами, водою, поверхнево-активними речовинами, та комплексом лікарська речовина – ліпід. Ці характеристики ліпосомальних засобів обумовлюють специфічність підходів до контролю їхньої якості.

Для забезпечення якості ліпосомальних засобів та відтворюваності якісних та кількісних характеристик у межах серії необхідно контролювати їхню відповідність за різноманітними фізико-хімічними показниками. Дані щодо параметрів контролю якості та вимог до них відображені в різних нормативних документах на ліпосомальні засоби.

Проте підбір методів контролю якості ліпосомальних продуктів ускладнений структурою міцел, оскільки ліпідна везикула сформована за рахунок компонентів різного походження для досягнення бажаної ламелярності та розміру ліпосом. Екстракція лікар-

ських речовин з ліпосом повинна бути повною і селективною для встановлення їхнього кількісного вмісту. Перешкоджають швидкому та ефективному аналізу ліпосом короткий термін придатності ліпосомальних засобів (короткий термін фазової стабільності).

Слід відзначити необхідність аналізу як окремо діючої речовини та ліпосоми, так і ліпосомальної структури в цілому, з включеною в неї молекулою, оскільки ліпосомальний продукт є активним фармацевтичним інгредієнтом.

Тому методи контролю якості ліпосомальних засобів можна розділити на дві групи – це методи контролю ліпосомальних компонентів (активних інгредієнтів, ліпідних компонентів) і оцінка фізичних властивостей інтактних ліпосом як системи доставки лікарського засобу.

Для підтвердження відтворюваності характеристик ліпосом при виробництві необхідно перевірити всі вхідні матеріали на відповідність сертифікатам виробника (для активної молекули й для ліпідів). Випробування необхідно проводити як при зберіганні матеріалів, так і перед безпосереднім використанням. Фізичні характеристики ліпосомальних засобів дуже чутливі до найменших змін у процесі виробництва, зокрема, коливань тиску, температури, параметрів ліофілізації та ін. На процес стерилізаційної фільтрації можуть специфічно впливати фізична та хімічна складність ліпосомальних везикул, оскільки вони можуть взаємодіяти з матрицею фільтра. Таким чином, слід доводити за допомогою валідаційних процедур відсутність впливу тих чи інших технологічних процедур на параметри якості кінцевого продукту.

У таблиці наведені основні показники якості ліпосомальних засобів, які

мають бути оцінені протягом різних фаз розвитку ліпосом, від наукового обґрунтування до комерційного продукту та достатньо повно можуть охарактеризувати якість ліпосомальних засобів. Основні параметри стандартизації ліпосомальних засобів надано в таблиці 1.

Деякі показники якості, що застосовані до ліпосомальних засобів, мають свої особливості. Для визначення колоїдної та термічної стабільності ліпосом визначають наявність розшарування або випадання осаду в розчинах ліпосомальних засобів після центрифугування або термостатування зразків відповідно.

Ступінь інкапсуляції активної субстанції визначається як відсоток лікарського засобу, що міститься всередині ліпосом, порівняно з загальною кіль-

кістю лікарського засобу. У переважній більшості випадків визначення ступеня інкапсуляції водорозчинної активної діючої речовини проводять за допомогою гель-проникної хроматографії. На хроматограмах досліджуваних зразків ліпосом, як надмолекулярні структури, виходять у «мертвому» об'ємі, а активна діюча речовина затримується в порах гелю, за рахунок чого досягається розділення сполук.

Співвідношення активний компонент – фосфоліпід або завантаженість ліпосомального засобу характеризує відсоток умісту лікарського засобу порівняно з кількістю використаного ліпиду.

Дослідження ліпідів зазвичай включає аналіз умісту фосфору для визначення сумарного вмісту ліпідів, випробування методом ВЕРХ або ТШХ для

Таблиця 1

Основні параметри стандартизації ліпосомальних засобів

Показник	Метод
Опис, колір, запах	Візуально, за запахом
pH	pH-метрія
Колоїдна стабільність	Візуально (після центрифугування)
Термолабільність	Візуально (після термостатування), термічний аналіз
В'язкість	Віскозиметрія та ін.
Уміст зв'язаної води	Титрування за К. Фішером
Втрата в масі при висушуванні	Ваговий
Важкі метали	ААС, спектрометрія ЯМР, колориметрія та ін.
Осмоляльність	Осмометрія
Кількісний уміст активного інгредієнта	Відповідний метод аналізу
Ступінь інкапсуляції	ВЕРХ, гель-проникна хроматографія, міні-центрифужні стакани
Уміст фосфоліпідів	ВЕРХ, ТШХ (модифікований метод Барлета, Стюарта)
Склад ліпідів	ТШХ, ВЕРХ
Уміст холестеролу	ВЕРХ, ВЕТШХ, ензимометрія
Кількість залишкових розчинників	ГХ, спектрометрія ЯМР
Співвідношення активний компонент – фосфоліпід	Відповідний метод аналізу
Стерильність	USP < 71 >, Ph. Eur 2.6.1
Пірогени/бактеріальні ендотоксини	USP < 85 >, Ph. Eur 2.6.14
МБЧ	USP < 61 >, < 62 >, Ph. Eur 2.6.12, 2.6.13

Примітка. ААС – атомно-абсорбційна спектрометрія; ЯМР – спектроскопія ядерного магнітного резонансу; ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія; ТШХ – тонкошарова хроматографія; ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія.

аналізу складу індивідуальних ліпідних сполук, їхньої чистоти або наявності домішок.

Як відомо, при потраплянні ліпосом в організм на них руйнівню впливають ліпопротеїди сироватки крові. Для підвищення стабільності до складу ліпосомальних засобів вводять холестерин, який та кількість якого також необхідно контролювати.

Залишкові розчинники можуть виявлятися при використанні недостатньо висушеної сировини при виробництві ліпосомальних засобів і впливати на стабільність ліпосом викликати побічну дію після застосування ліпосомального лікарського засобу.

Необхідно відзначити також значний вплив якості підготовки води, яка використовується при виробництві ліпосомальних засобів.

Для встановлення стабільності, умов зберігання та дати повторного тестування або терміну придатності проводять стрес-тестування ліпосом, визначаючи профіль деградації (тобто, піддають ліпосомальний засіб впливу високої температури, світла, кисню та змінюють рН середовища). У таблиці 2 наведено основні показники якості, які контролюються при вивченні фізичної та хімічної стабільності ліпосомальних засобів.

Дослідження стабільності ліпосомальних засобів повинні включати мікробіологічну стабільність.

Розмір ліпосом є одним з критичних параметрів, що впливає на активність та розподіл ліпосомальних засобів у організмі. Простим методом встановлення фізичної стабільності ліпосом за їхнім розміром є будь-яка форма мікро-

Таблиця 2

Основні показники стабільності ліпосомальних засобів

Показник	Метод
<i>Стабільність фізична</i>	
Зовнішній вигляд	Візуальний
Розподіл розмірів везикул: - субмікронні	Динамічне та статичне розсіювання світла, мікроскопія, гель-ексклюзійна хроматографія, турбідиметрія
- мікронні	Світлоблокування, світлова мікроскопія, лазерна дифракція, статичне розсіювання світла
Поверхневий електричний потенціал (зета-потенціал)	Використання мембран-зв'язаних електродів/ електрофоретична рухливість
Поверхневий рН	Використання рН-чутливих електродів
Ламелярність	Кріо-електронна мікроскопія, 31 Р ЯМР
Термотропна поведінка фаз, розділення фаз, фазовий перехід	ЯМР, ІЧ, флуоресцентна мікроскопія, раманівська спектроскопія, турбідиметрія
Відсоток вільного активного інгредієнта	Гель-ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія, осадження, центрифугування
<i>Стабільність хімічна</i>	
рН	рН-метрія
Уміст вільних жирних кислот	ВЕРХ
Ступінь гідролізу фосfolіпідів	ВЕРХ, ТШХ
Ступінь окиснення фосfolіпідів (ацильних зв'язків)	ГХ (склад жирних кислот), СФ (кон'юговані дієни, трієни), йодометрія (ліпідні пероксиди)
Окиснений холестерол	ТШХ, ВЕРХ
Розпад антиоксидантів	ТШХ, ВЕРХ
Розпад активного компоненту	Відповідний метод аналізу

скопії. Зміни хімічного характеру в ліпосомальних засобах також призводять до модифікацій розмірів ліпосом, їхньої агрегації.

Показник зета-дисперсності відображає взаємний вплив дисперсності середовища та диспергованої частинки, і є індикатором поверхневого заряду частинок. Цей показник використовується для прогнозування та контролю стійкості колоїдних суспензій або емульсій та має значний вплив на біологічну активність ліпосом.

Ламелярність ліпосом контролюється під час дослідження стабільності, оскільки вона значно впливає на ефективність інкапсуляції та швидкість вивільнення лікарського засобу з ліпосоми, а також долю препарату після клітинного захоплення.

Хімічна стабільність ліпідів включає дослідження продуктів окиснення та гідролізу. Продукти гідролізу фосфоліпідів (жирні кислоти, лізоліпиди та ін.) сприяють збільшенню розмірів та полідисперсності міцел, підвищують проникність бішару, що, у свою чергу, збільшує вивільнення активного інгредієнта та призводить до гелеутворення.

Усі наведені показники мають велике значення не лише при дослідженні стабільності, а й при розробці технології отримання ліпосом.

Як приклад застосування вищевказаних параметрів контролю якості ліпосомальних засобів можна навести деякі показники специфікації на лікарських засіб «Ліпофлакон, порошок ліофілізований для приготування очних крапель у флаконі № 1», який застосовується в офтальмології як протизапальний засіб, стимулятор регенерації ушкоджених тканин ока, імунокоректор та антиоксидант у хворих на травматичні ураження рогівки, кератити різного генезу, при запальних захворюваннях переднього відділу ока, дегенеративних змінах сітківки та зорового нерва.

До складу ліпосомального засобу «Ліпофлакон» входять ліпосомально-організований яечний фосфатидилхолін, флавоноїд кверцетин та допоміжна речовина (кріо-протектор) лактоза.

До переліку показників якості ліпосомального засобу «Ліпофлакон», включені ті, що відповідають вимогам ДФУ, які пред'являються до очних засобів, а також специфічні – які характеризують активний інгредієнт (кверцетин) і ліпіди (фосфатидилхолін) (табл. 3).

Фармакопейні вимоги до контролю якості ліпосомальних засобів

Очевидним є системний підхід до стандартизації лікарських засобів, у тому числі ліпосомальних. Показники якості лікарських засобів, що забезпечують їхню ефективність і безпеку, наведені в реєстраційному досьє та фармакопей, а не тільки в МКЯ. Так, до Індійської фармакопей за 2010 рік було включено загальну монографію на ліпосомальні засоби, яка дає їхнє визначення та характеристики.

Загальна стаття дає таке визначення поняттю ліпосомальних засобів: «Ліпосомальні засоби – стерильні дисперсії для ін'єкцій або інфузій на основі фосфоліпідів з/без холестеролу у водному середовищі».

Характеристики ліпосомальних засобів:

- можуть містити антиоксиданти, стабілізатори або буфери;
- прозорі/опалесцентні;
- активний компонент інкапсульований у везикулу або включений у подвійний ліпідний шар.

Методи отримання:

- утворення ліпідної плівки для гідратації, гідратація з агітацією, утворення пухирців (ультразвукова гомогенізація, екструзія та ін.);
- стійкість суспензій, однорідність після струшування.

Дана монографія встановлює також обов'язкові параметри контролю якості: механічні домішки, однорідність вмісту, об'єм, що витягається, стерильність, пірогени, розмір везикул, ламелярність.

Загальна стаття на лікарську форму «Порошки для приготування розчинів для ін'єкцій», зокрема на ліпосомальний амфотерицин В, регламентує вимоги до твердих речовин – стерильність, прозорість, однорідність дисперсії. Ліофілізовані ліпосомальні засоби для парентерального застосування розглядаються

Зразок специфікації на лікарський засіб «Ліпофлавон, порошок ліофілізований для приготування очних крапель у флаконі № 1»

Показник	Вимога специфікації	Метод контролю
Опис	Аморфна маса світло-жовтого кольору з характерним запахом	Візуально, п. МКЯ
Ідентифікація - кверцетин	Максимуми поглинання при 255–259 нм та 373–377 нм; якісна реакція з заліза (III) хлоридом	УФ-спектрометрія, ДФУ 2.2.25 ДФУ 2.3.1
- фосфатидилхолін	Наявність плями жовтого кольору на рівні плями ФСЗ фосфатидилхоліну	ТШХ, ДФУ 2.2.27
Час утворення та стійкість емульсії	Час утворення емульсії не більше ніж 2 хв, стійкість не менше ніж 10 хв	п. МКЯ
pH	4,5–7,2	Потенціометрія, ДФУ 2.2.3
Сторонні домішки	Сума домішок менше ніж 4 %	ТШХ, 2.2.27
Втрата маси при висушуванні	Не більше ніж 5 %	ДФУ 2.2.4
Однорідність маси	18/20 $\pm$ 10 %; 0/20 $\pm$ 20 %	ДФУ 2.9.5
Осмоляльність	300–400 мосмоль/кг	ДФУ 2.2.35
Кількісне визначення - кверцетин	Від 0,67 до 0,83 мг/флакон	УФ-спектрофотометрія, ДФУ 2.2.25
- фосфатидилхолін	Від 24,75 до 30,25 мг/флакон	
Стерильність	Має бути стерильним	ДФУ 2.6.1, метод висівання на чашки

як ліпосомальні порошки для ін'єкції або інфузії.

Нині працює робоча група Комісії ЄФ на базі компанії SwissMedic, яка була сформована ще в 2011 році. До її повноважень входить розробка монографій на комплекси небіологічного походження, у тому числі на ліпосомальні засоби. Тому, крім вже існуючих керівництв FDA і МКЯ на ліпосоми, найближчим часом можна очікувати на окрему монографію і, можливо, декілька статей на окремі ліпосомальні

засоби в таких виданнях – флагманах, як Європейська або Американська фармакопея.

При цьому для реєстрації, виробництва та контролю лікарських засобів відповідно до цих документів необхідні наукові дослідження все більш високого рівня на всіх етапах життєвого циклу продукції, від фармацевтичної розробки та експериментальних досліджень до серійного виробництва і контролю якості готового лікарського засобу.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Хромов А. С. Общая фармакологическая безопасность и сердечно-сосудистая система	3
--	---

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

Каврайский Д. П., Штрыголь С. Ю., Георгиянц В. А., Северина А. И. Скрининговое исследование новых производных пиразоло[3,4-d]пиримидин- 4-она на противосудорожную активность	16
---	----

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Альчук А. И. Влияние 4-[4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил]бензойной кислоты на функциональное состояние печени крыс в условиях ежедневной физической нагрузки	28
--	----

Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г. Исследование желудочной секреции у крыс с адьювантным артритом на фоне применения ибупрофена и его комбинации с винбороном	34
--	----

Иванкив Я. И., Олещук А. М. Применение мелатонина при экспериментальном сахарном диабете I типа	41
--	----

Калько Е. А., Дрогвоз С. М., Кононенко А. В., Захарко Н. В., Горбач Т. В., Мищенко О. Я., Бездетко Н. В. Циркадианные биоритмы углеводного обмена у крыс в условиях острого парацетамолового гепатита	48
---	----

Карбовский В. Л., Шевчук И. А., Куркина О. В., Маковская Т. Е. Исследование влияния препарата «Хондросат» на течение экспериментального адьювантного артрита у крыс	54
---	----

Лукина И. А., Мазулин А. В., Абрамов А. В., Бухтиярова Н. В. Экспериментальное изучение антиоксидантной и гепатопротекторной активности экстракта травы <i>Polygonum persicaria</i> L.	60
---	----

Марчишин С. М., Савич А. А., Андришин А. П. Влияние сбора антидиабетического на гистологическое состояние печени крыс в условиях моделирования сахарного диабета II типа	66
--	----

Паршиков А. В., Петрова Г. В. Цитотоксические эффекты синтетических производных α -токоферола и митомицина С на клетки Сасо 2	73
---	----

Синицына О. С., Зайченко А. В., Рыженко И. М., Ларьяновская Ю. Б. Коррекция состояний, ассоциированных с дефицитом эстрогенов, с помощью комбинированного вагинального геля с экстрактом хмеля и молочной кислотой	80
---	----

СОБЫТИЯ

Разработка инновационных лекарственных средств в ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». Участие ГУ «ИФТ НАМНУ» в 6-й Международной выставке «PHARMATechExpo»: семинар «Цілеспрямовані технологічні, фармакотоксикологічні та фармацевтичні дослідження як основа сучасної платформи розробки інноваційних лікарських засобів»	89
---	----

CONTENT

REVIEWS

<i>Khromov A. S.</i> Safety pharmacology and cardiovascular system.....	3
---	---

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

<i>Kavraiskiy D. P., Shtrygol' S. Yu., Georgiyants V. A., Severina A. I.</i> Screening study of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-one derivatives for anticonvulsant activity	16
---	----

WORKING OUT OF THE NEW METHODOLOGICAL WAYS

<i>Alchuk O. I.</i> The effect of 4-[4-oxo-4H-quinazoline-3-il] benzoic acid on the functional condition of the rats' liver under daily physical strain.....	28
<i>Hladkykh F. V., Stepaniuk N. H.</i> The study of the gastric secretion in rats with adjuvant arthritis against the application of ibuprofen and its combination with vinboron	34
<i>Ivankiv Ya. I., Oleshchuk O. M.</i> Application of melatonin in experimental type I diabetes	41
<i>Kalko E. A., Drogovoz S. M., Kononenko A. V., Zacharko N. V., Gorbach T. V., Mischenko O. Ya., Bezdetko N. V.</i> Circadian biorhythms of carbohydrate metabolism in rats under acute paracetamol hepatitis	48
<i>Karbovskyy V. L., Shevchuk I. A., Kurkina O. V., Makovska T. Ye.</i> A study of influence of «Chondrosut» on the course of experimental adjuvant arthritis in rats.....	54
<i>Lukina I. A., Mazulin A. V., Abramov A. V., Bukhtiyarova N. V.</i> Experimental study of the antioxidant and hepatoprotective activities of the extract from the herb <i>Polygonum persicaria</i> L.	60
<i>Marchyshyn S. M., Savych A. O., Andriyishyn A. P.</i> An influence of antidiabetic collection on the histological state of rat liver in conditions of diabetes mellitus type II	66
<i>Parshykov A. V., Petrova G. V.</i> The cytotoxic effect of α -tocopherol synthetic derivatives and Mitomycin C on Caco 2 cells	73
<i>Sinitsyna O. S., Zaychenko G. V., Ryzhenko I. M., Laryanovska Y. B.</i> Correction of deficit-estrogenic state by the combined vaginal gel with extract of hops and lactic acid	80

EVENTS

The development of innovative medicines in SI «Institute of pharmacology and toxicology NAMS of Ukraine». The participation of the Institute in the 6 th International exhibition «PHARMATechExpo»: seminar «Targeted technology, pharmaco-toxicological and pharmaceutical research as the foundation of modern development platform of innovative medicines»	89
---	----