
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

№ 4–5(50)/2016

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Бухтіарова Т. А., Губський Ю. І.* «Ліки-сироти» на основі нових молекулярних субстанцій, схвалені FDA у 2011–2015 роках (аналітичний огляд) 3
- Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г.* Вінборон: перший український гастропротектор – агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1) 20

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

- Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Цивунін В. В., Георгіянц В. А.* Гостра токсичність та ефективність 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-*D*]піридин-4-ону на моделі пентилентетразолового кіндлінгу в мишей 30
- Мироненко С. І., Піняжко О. Р., Лесик Р. Б.* Вплив оригінальних похідних 4-тіазолідинону: Les-1205 та Les-2658, леветирацетаму та діазепаму на поведінку умовно-рефлекторного активного уникнення в шурів 35
- Сліпченко Т. Д., Штриголь С. Ю., Кудіна О. В., Таран А. В., Рубан О. А.* Порівняльне доклінічне дослідження психотропних властивостей препаратів шоломниці байкальської 41

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

- Білай І. М., Цис О. В., Михайлюк Є. О., Коваленко С. І., Шабельник К. П.* Дослідження актопротекторної активності похідних 1,2,4-тріазолу в експерименті 50
- Дринь Д. О., Мельник М. І., Соловйов А. І., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В.* Вуглецеві наночастинки як новітні блокатори мускаринових катіонних струмів у міоцитах тонкого кишечника 55
- Кононенко А. Г., Кравченко В. М.* Вплив спиртової настойки листеця ряски малої на морфофункціональний стан щитоподібної залози за експериментального гіпотиреозу 62
-

<i>Нагорна О. О., Горчакова Н. О., Бєленічев І. Ф., Чекман І. С.</i> Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на систему оксиду азоту в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією	70
<i>Павлов С. В., Левченко К. В.</i> Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів <i>in vitro</i>	78
<i>Фалюш О. А., Полякова Л. І., Сачинська О. В., Резніков О. Г.</i> Зміни епітеліально-стромального співвідношення у трансплантатах раку передміхурової залози людини при застосуванні наночастинок золота	84
РОЗРОБКА НОВИХ МЕТОДИЧНИХ ПРИЙОМІВ	
<i>Кравець Д. С., Лук'янчук В. Д.</i> Новий методичний підхід до оцінки впливу ліків на кінетику вільнорадикальних реакцій у біосубстратах	90
ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛОДИХ УЧЕНИХ	
<i>Садогурська К. В.</i> До питання безпечності нанохрому цитрату за умов повторного введення	95
ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ	
<i>Савіна Н. О., Кузнецова О. М., Черемєнко А. М., Брицун В. М., Останіна Н. В.</i> Дослідження кількісного вмісту та супровідних домішок цефепіму методом ВЕРХ	101
ОСОБИСТОСТІ	
До ювілею члена-кореспондента НАН і НАМН України, професора, доктора медичних наук, лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Івана Сергійовича Чекмана	108
СОДЕРЖАНИЕ	111
CONTENT	112

Т. А. Бухтіарова, Ю. І. Губський

«Ліки-сироти» на основі нових молекулярних субстанцій, схвалені FDA у 2011–2015 роках (аналітичний огляд)

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

Ключові слова: «ліки-сироти»,
нові молекулярні субстанції, FDA

«Ліки-сироти» (orphan drug) – лікарські засоби, що спеціально розроблені для лікування рідкісних захворювань (так званих «захворювань-сиріт»). У більшості країн світу такий статус надається небезпечним для життя або хронічним виснажуючим захворюванням, що мають низьку розповсюдженість (наприклад, менше ніж 1 на 1500 осіб у США, менше ніж 1 на 2500 пацієнтів у Японії, менше ніж 1 на 2000 осіб в Європі та Україні [1–4]). За даними Європейського комітету експертів з рідкісних захворювань (EUCERD) до даної патології сьогодні відносять близько 7 тис. нозологій, з яких 5 тис. являють собою спадкові генетично детерміновані захворювання, але лише 250 з них мають свій шифр у Міжнародній класифікації хвороб (МКХ-10). Сьогодні 5400 рідкісних захворювань перераховані в базі даних Orphanet (Orphanet database) і плануються для включення до МКХ-11, яка відкрита для консультацій і буде схвалена Всесвітньою асамблеєю охорони здоров'я в 2017 році [5].

Розробка та виробництво «ліків-сиріт» є економічно не вигідним, тому розвинені країни світу прийняли відповідні закони щодо заохочення компаній до розробки та застосування таких препаратів [6–8]. Зокрема, у США та ЄС з цією метою розроблена та використовується низка правових механізмів: податкові стимули, покращання захисту патентів та маркетингових прав, фінансова підтримка клінічних випробувань, участь держави в «запуску» компаній з розробки та досліджень

таких препаратів, програми прискореного схвалення (час на схвалення FDA «ліків-сиріт» не перевищує 10 місяців проти 13 місяців для інших препаратів) та інші [8].

Важливою ініціативою, спрямованою на зниження навантаження на розробників/виробників «ліків-сиріт» та прискорення їхньої доступності для пацієнтів, є Угода між FDA та ЕМА (2007 р.) щодо процесу одночасного подання заяви до цих установ, які все-таки будуть продовжувати підтримувати, окремі одна від одної, процедури схвалення [9]. Ці та інші започатковані заходи призвели до суттєвого покращання лікування хворих на рідкісні захворювання (на 2010 р. 200 рідкісних захворювань є вилікованими [2]). До 2020 року прогнозований обсяг ринку ліків-сиріт складе близько 176 млрд доларів США [8]. При цьому «ліки-сироти» займуть 19 % ринку рецептурних препаратів.

Лідером у схваленні «ліків-сиріт» залишаються США, де з метою раннього доступу пацієнтів до нового лікування використовується низка нормативних інструментів (схвалення в першому циклі, швидкий шлях, пріоритетний розгляд та інші) [10–14]. При цьому, прагнучи підвищити ефективність розгляду та схвалення заяв на нові ліки, Центр з оцінки лікарських засобів та досліджень FDA's Center for Drug Evaluation and Research (CDER) не знижує свої високі стандарти щодо їхньої ефективності та безпеки.

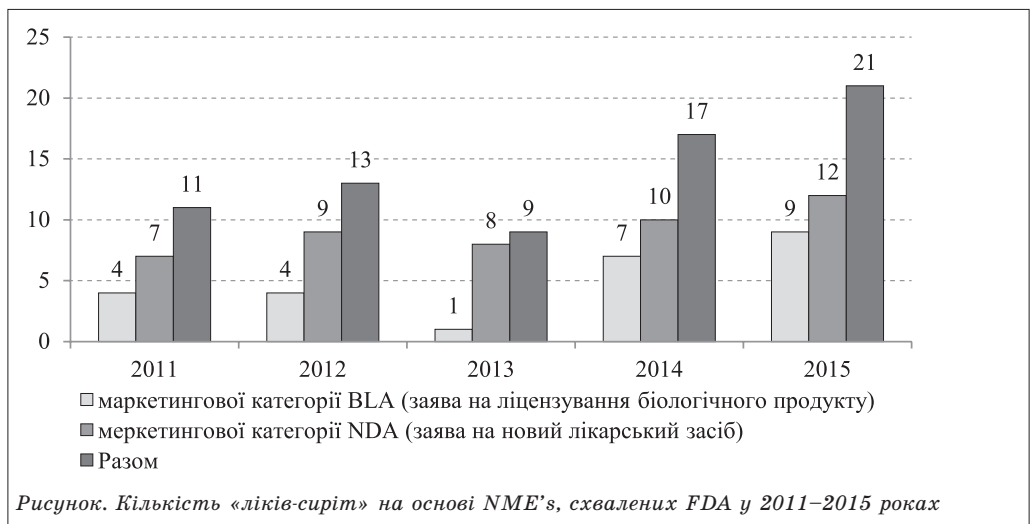
У 2011–2015 роках FDA схвалено 182 лікарські препарати на основі нових молекулярних субстанцій (NME's) як хімічного, так і біологічного/біотехнологічного походження, з яких 129 (71 %) перше схвалення отримали в

США (до схвалення в інших країнах) [10–14]. При цьому 71 продукт (40 % від загальної чисельності) – це «ліки-сироти» (рисунок), з яких 25 (35 %) – це біологічні/біотехнологічні продукти (моноклональні антитіла, імуноглобуліни, рекомбінантні білки тощо), а 46 (65 %) – продукти хімічного синтезу. Важливо, що з введених на ринок «ліків-сирит» на основі NME's як перші в класі кваліфіковані 26, прорив – 5, перші в класі/прорив – 13 (табл. 1, 2)¹. 64 % від схвалених протягом аналізованого періоду «ліків-сирит» перше схвалення отримали в США [10–14]. При цьому широко використовувалися прийняті FDA нормативні інструменти та їхні комплекси для забезпечення раннього доступу пацієнтів до нового лікування (схвалення на першому циклі, прискорене схвалення, швидкий шлях та інші) [14]. Для 7 «ліків-сирит» (Adcetris, Xalkori, Iclusig, Sirturo, Darzalex, Orcambi, Tagrisso) CDER використаний повний комплекс таких інструментів.

Найпродуктивнішими щодо впровадження інноваційних «ліків-сирит» на основі NME's стали 2014–2015 роки (рисунок).

Аналіз введених на ринок протягом досліджуваного періоду (2011–2014 рр.) «ліків-сирит» за належністю до певних фармакотерапевтичних груп свідчить, що найширше представлені протипухлинні препарати (29 з 50, або 58 %) (табл. 2). Найбільшу кількість нових засобів лікування отримали хворі з різними формами лейкемії та лімфом (12 препаратів), хворі на різні типи меланоми (6 препаратів), недрібноклітинний рак легень (4 препарати), хворобу Гоше типу 1, пацієнти з гомозиготною родиною гіперхолестеринемією та ідіопатичним фіброзом легень (по 2 препарати). Серед схвалених «ліків-сирит» на основі NME's представлені продукти як для перорального (38, або 53,5 %), так і парентерального (форми для ін'єкцій/інфузій) застосування (33, або 46,5 %).

За прогнозами [8], найпродованішими «ліками-сиротами» на основі NME's до 2020 року стануть, зокрема, схвалені FDA протягом аналізованого періоду (2011–2015 рр.), препарати Opdivo (nivolumab) компанії Bristol-Myers Squibb (8,192 млн доларів США) та Keytruda (pembrolizumab) компанії Merck & Co (5,297 млн доларів США), Imbruvica (ibrutinib), що маркетується



¹«Перший в класі» (First in class) – важливий показник інноваційної природи препарату, зокрема в зв'язку з тим, що його дія може базуватися на нових або унікальних механізмах порівняно з існуючими.

«Прорив» (Breakthrough) – використовується CDER програма для схвалення препаратів з попередніми клінічними підтвердженнями того, що їхнє використання може призвести до суттєвого покращання, у меншій мірі, однієї клінічно значущої точки (тобто результату випробування) порівняно з іншими доступними методами лікування.

компаніями AbbVie та Johnson&Johnson (5,694 млн доларів США), Esbriet (pirfenidone) компанії Roche (2,492 млн доларів США).

Високу активність у розробці «ліків-сиріт» проявляє низка компаній, зокрема, Alexion Pharmaceuticals (працюють разом з U.S.'s National Organization for Rare Disorders (NORD), Avella Specialty Pharmacy, BioMarin, Genzyme, GlaxoSmithKline, Novartis, Pfizer, Shire plc, Swedish Orphan Biovitrum, Synageva BioPharma та European Organization for Rare Diseases (EURORDIS) [15]. Суттєву допомогу невеликим компаніям з недостатнім досвідом та власними ресурсами в розробці «ліків-сиріт» надає Центр досліджень «ліків-сиріт» (Center for Orphan Drug Research) при Коледжі фармації Університету Міннесоти [16]. Keck Graduate Institute Center for Rare Disease Therapies (CRDT) у Клермонті (Каліфорнія) підтримує проекти з «відродження» потенційних «ліків-сиріт», розробка яких була призупинена з різних причин [17]. У 2011–2015 роках схвалення FDA отримали «ліки-сироти», що розроблялися, щонайменш, 39 компаніями. Найпродуктивнішими є компанії Bristol-Myers Squibb (Myalept, Yervoy, Nulojix та Opdivo); Pfizer (Eleyso, Bosulif та Xalkori); GlaxoSmithKline (raxibacumab, Tafinlar та Mekinist); AstraZeneca (Caprelsa та Lynparza); Boehringer Ingelheim (Gilotrif та Ofev); Genzyme (Cerdelga та Kynamro); Novartis (Signifor та Zykadia). До речі, компанія Bristol-Myers Squibb поставила собі на мету до 2020 року піднятися на перше місце в продажу «ліків-сиріт». Наміри піднятися в рейтингу продажу «ліків-сиріт» висловили також компанії Pharmasuclics, Vertex та Alexion Pharmaceuticals [8].

Таким чином, інноваційна активність у сегменті «ліки-сироти» протягом аналізованого періоду демонструє зростання (зі 182 схвалених FDA продуктів на основі NME's 40 % – це «ліки-сироти»), як за кількісними показниками, так і за рівнем інновацій (26 продуктів або 37 % кваліфіковані FDA як перші в класі, 5 або 7 % – як прорив: 13 або 18 % – як перші в класі/прорив).

Таблиця 1

«Ліки-сироти» на основі NME's, кваліфіковані як «перші в класі»/«прорив» і схвалені FDA у 2011–2015 роках

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Adcetris ⁵ (brentuximab vedotin) BLA	L01XC12	Seattle Genetics	Лімфома Ходжкіна, анапластична крупноклітинна лімфома	CD30 спрямований кон'югат «антитіло-лікарський засіб» (ADC), що складається з трьох компонентів: 1) хімерного антитіла IgG1 cAC10, специфічного для CD30 людини, 2) агента MMAE, що руйнує мікротрубочки, 3) протеазо-розщеплюючого лінкера, що ковалентно приєднує MMAE до cAC10	19.08.2011/ 25.08.2011

Торговельна (міжнародна) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Adempas ⁵ (riociguat) NDA	C02KX05	Bayer	Хронічна тромбоемболічна легенева гіпертензія та легенева артеріальна гіпертензія	Стимулятор розчинної гуанілатциклази (sGC). При зв'язуванні з оксидом азоту (NO) sGC каталізує синтез сигнальної молекули гуанозинмонофосфату (sGMP). Сприяє двома типами дії: підвищує чутливість до ендогенного NO шляхом стабілізації зв'язування NO-sGC та безпосередньо стимулює sGC через незалежний від NO сайт зв'язування	08.10.2013/ 08.10.2013
Alectinib ⁴ (alectinib) NDA	-	Roche	ALK-позитивний недрібноклітинний рак легень у хворих з прогресуванням захворювання на фоні лікування кризотинібом або з непереносністю кризотинібу	Інгібітор тирозинкінази для перорального застосування. У неклітинних дослідженнях гальмує ALK фосфорилування та ALK-опосередковану активацію сигнальних білків STAT3 і AKT. Основний активний метаболіт алектинібу M4 проявляє подібні ефекти	11.12.2015/ 11.12.2015
Blincyto ^{4,5} (blinatumomab) BLA	L01XC19	Amgen	Рецидивуючий або рефрактерний гострий лімфобластний лейкоз із клітин-попередників В-лімфоцитів з негативною філадельфійською хромосомою	Відноситься до класу ВіТЕ-антитіл (Vi-specific T-cell engagers), специфічних до ко-рецептора CD19, що розташований на поверхні В-лімфоцитів та білка Т-клітин CD3	03.12.2014/ 18.12.2014

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Cometriq ⁵ (carbozatinib) NDA	L01XE26	Exelixis	Метастатичний медулярний рак щитоподібної залози	Інгібітор тирозинкіназ RET, MET, VEGFR-1, -2 та -3, KIT, TRKB, FLT-3, AXL та TIE-2	29.11.2012/ 29.11.2012
Darzalex ^{4,5} (daratumumab) BLA	L01XC24	Janssen Biotech	Множинна меліома в пацієнтів, які отримали щонайменше три попередні курси лікування, яке включало інгібітор протеасом й імуномодулюючий засіб	Даратумумаб являє собою моноклональні антитіла людини (mAb), що зв'язуються з високою спорідненістю з трансмембранним ектоензимом CD38 на поверхні клітин множинної мієломи й індукує швидку загибель клітин пухлини	16.11.2015/ 16.11.2015
Empliciti ^{4,5} (elotuzumab) BLA	L01XC23	Bristol-Myers Squibb, AbbVie	Множинна мієлома (у комбінації з леналідомідом та дексаметазоном) у пацієнтів, що отримували попередньо 1–3 курси терапії	Гуманізовані IgG1 моноклональні антитіла, націлені на білок SLAMF7 (Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 7). Безпосередньо активує природні клітини-кілери як через SLAMF7, так і рецептори Fc. Опосередковує знищення клітин мієломи за допомогою антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (ADCC). У доклінічних моделях поєднання елотузумабу та леналідоміду призводило до підвищення активації клітин кілерів у більшій мірі, ніж у разі застосування препаратів окремо, та збільшення протипухлинної активності <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	30.11.2015/ 30.11.2015
Esbriet ^{4,5} (pirfenidone) NDA	L04AX05	Roche	Ідіопатичний фіброз легень	Інгібітор р38 MAP-кінази для перорального застосування. Механізм дії при ідіопатичному фіброзі легень не встановлений	15.10.2014/ 16.10.2014

Торговельна (міжнародна) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/Старт маркетингу ³
Firazyu ⁵ (icatibant) NDA	B06AC02	Shire Pharmaceuticals	Гострі напади спадкового набряку Квінке в пацієнтів 18 років та старших	Селективний конкурентний антагоніст брадикінінових V ₂ -рецепторів	25.08.2011/ 25.08.2011
Gattex ⁵ (teduglutide) NDA	A16AX08	NPS Pharmaceuticals	Синдром короткої кишки	Аналог природного глюкагон-подібного пептиду 2 (GLP-2) людини. Зв'язуючись з GLP-2 рецепторами ентероендокринних клітин кишківника, субепітеліальних міофібробластів і нейронів підслизової та м'язової оболонки кишківника, активує рецептори та призводить до вивільнення низки медіаторів, у тому числі інсуліноподібного фактора росту (IGF)-1, оксиду азоту та фактора росту кератиноцитів (KGF)	21.12.2012/ 21.12.2012
Gazyva ⁴ (obinatumumab) BLA	L01XC15	Genentech (Roche)	Нелікована хронічна лімфоцитарна лейкемія	Моноклональне антитіло, що вибірково взаємодіє з позаклітинною ділянкою трансмембранного антигена CD20, розташованою на поверхні нормальних та злоякісних зрілих В-лімфоцитів та їхніх попередників, не зв'язуючись зі стовбуровими гемопоетичними клітинами, про-В-лімфоцитами, плазматичними клітинами та клітинами інших нормальних тканин. Завдяки модифікації схеми глікозування Fc фрагмента має підвищену спорідненість до FcγRIII рецепторів на поверхні ефektorних клітин імунної системи, зокрема, натуральних кілерів, макрофагів та моноцитів порівняно з антитілами, що не були піддані такій модифікації	01.11.2013/ 01.11.2013
Imbruvica ^{4, 5} (ibrutinib) NDA	L01XE27	Janssen Biotech, Pharmaceuticals	Манткелітинна лімфома. Хронічна лімфоцитарна лейкемія	Потужний селективний низькомолекулярний інгібітор тирозинкінази Брутона (Bcrton's tyrosine kinase, Btk). Утворює ковалентний зв'язок з цистеїновим залишком (Cys 481) в активному центрі Btk, призводячи до стійкого пригнічення активності ферменту	13.11.2013/ 07.11.2013

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/Старт маркетингу ³
Impravido ⁵ (miltefosine) NDA	L01XX09	Knight Thera reutics	Вісцеральний, шкірний та слизово-шкірний лейшманіоз	Специфічний механізм дії на види Leishmania невідомий. Припускають, що він може бути пов'язаний, зокрема, з взаємодією з ліпідами (фосфоліпідами та стеринами) мембран, пригніченням цитохромом С-оксидази (мітохондрій) та апоптозом клітин	19.03.2014/ 19.09.2014
Jakafi ⁵ (ruxolitinib) NDA	L01XE18	Incyte	Мієлофіброз	Інгібітор Янус кіназ (JAKs) JAK1 і JAK2, що опосередковують передачу сигналів ряду цитокінів і факторів росту, важливих для гемопоезу та імунних функцій. У моделях JAK2V617F-позитивних мієлопроліферативних неоплазм у мишей, пероральне введення руксолотинібу запобігає спленомегалії, переважному зниженню JAK2V617F у мутованих клітинах у селезінці та зниженню циркулюючих прозапальних цитокінів (наприклад, TNF- α , IL-6)	16.11.2011/ 16.11.2011
Juxtapid ⁵ (lomitapide) NDA	C10AX12	Aegerion Pharma ceuticals	Гомозиготна родинна гіперхолестеринемія	Безпосередньо зв'язує та пригнічує мікросомальний білок-переносник тригліцеридів у просвіті ендотеліального ретикулюму, попереджуючи «збірку» апо-В вміщуючих ліпопротеїнів в еритроцитах та гепатоцитах, що призводить до пригнічення синтезу хиломікронів та ліпопротеїнів дуже низької щільності (VLDL) та зниженню рівнів холестерину ліпопротеїнів низької щільності (LDL-C) у плазмі	21.12.2012/ 03.01.2013
Kalydeco ⁵ (ivacaftor) NDA	R07AX02	Vertex Pharma ceuticals	Муковісцидоз з G551D мутацією в гені CFTR	Селективний потенціатор G551D, F508del та R117H форм регулятора трансмембранної провідності муковісцидозу людини (CFTR)	31.01.2012/ 31.01.2012
Kanuma ^{4,5} (sebelipase alfa) BLA	A16AB14	Alexion Pharma ceuticals	Замісна терапія в пацієнтів з дефіцитом кислоти ліпази лізосом (LAL)	Себеліпаза альфа – рекомбінантна кислота ліпаза лізосом людини (rhLAL), що зв'язується з рецепторами клітинної поверхні та згодом засвоюється лізосомами. Каталізує гідроліз холестеринових ефірів і тригліцеридів у лізосомах до вільного холестерину, гліцерину та вільних жирних кислот	08.12.2015/ 08.12.2015

Торговельна (міжнародна) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Keytruda ^{4,5} (pembrolizumab) BLA	L01XC18	Merck	Неоперабельна або метастатична меланома	Гуманізоване моноклональне IgG4 антитіло, яке блокує взаємодію PD-1 з його лігандами PD-L1 та PD-L2, що призводить до пригнічення проліферації Т-клітин та вироблення цитокінів	04.09.2014/ 13.01.2015
Kulamro ⁵ (mirumersen sodium) NDA	C10AX11	Genzyme	Гомозиготна родинна гіперхолестеринемія	Антисмысловий олігонуклеотид, комплексований до кодуючої ділянки мРНК apo В-100-білка. Знижує утворення холестерину ліпопротеїнів низької щільності (LDL-C), попереджує утворення атерогенних ліпопротеїнів	29.01.2013/ 29.01.2013
Lynparza ⁵ (olaparib) NDA	L01XX46	Astra-Zeneca	Раніше лікований рак яєчників з мутацією гена BRCA	Інгібітор полі (АДФ-рибозо) полімераза (PARP), включаючи ферменти PARP1, PARP2 та PARP3	04.09.2014/ 24.12.2014
Mekinist ⁵ (trametinib) NDA	L01XE25	Glaxo Smith Kline	Неоперабельна метастатична меланома з BRAF V600E або V600K мутаціями	Орально біодоступний інгібітор мітоген-активованої протеїнкінази (MEK) з потенційною протипухлинною активністю. Специфічно зв'язується з MEK 1 та 2, пригнічує їхню активність і призводить до пригнічення опосередкованої фактором росту клітинної сигналізації та клітинної проліферації в різних типах ракових клітин	29.05.2013/ 17.06.2013
Myalept ⁵ (metreleptin for injection) BLA	A16AA07	Aegerion Pharmaceuticals	Уроджена або набута генералізована ліподистрофія	Аналог гормона лептину. Активує рецептор лептину (OBR), який відноситься до класу 1 родини рецепторів цитокінів, що беруть участь у JAK/STAT шляху сигнальної трансдукції	24.02.2014 /05.03.2015
Northera ⁵ (droxidopa) NDA	C01CA27	Chelsea Therapeutics	Нейрогенна ортостатична гіпотензія	Агоніст адренорецепторів, орально біодоступний синтетичний попередник норадреналіну, що безпосередньо метаболізується в норадреналін ДОГА-декарбоксілазою. Точний механізм дії в лікуванні нейрогенної ортостатичної гіпотензії невідомий	18.02.2014/ 01.09.2014

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/Старт маркетингу ³
Nulojix ⁵ (belatacept) BLA	L04AA28	Bristol-Myers Squibb	Профілактика відторгнення нирки після трансплантації	Рекомбінантний білок, що специфічно блокує взаємодію CD 28 з CD80 та CD86, селективно пригнічуючи ключовий ко-стимулюючий сигнал, необхідний для активації Т-лімфоцитів. У результаті модифікації фрагмента СТЛА-4 більш активно зв'язується з молекулами CD80 та CD86, ніж вихідна форма СТЛА4-IgG1. У дослідженнях <i>in vitro</i> белатацепт пригнічував проліферацію Т-лімфоцитів та знижував продукцію цитокінів (інтерлейкіну-2, інтерферону- γ , інтерлейкіну-4 та фактора некрозу пухлин альфа)	15.06.2011/ 15.06.2011
Ofev ^{4,5} (nintedanib) NDA	L01XE31	Boehringer Ingelheim	Ідіопатичний фіброз легень	Інгібітор тирозинкіназ. Пригнічує рецепторні тирозинкінази (RTKs), зокрема, тромбоцитарний фактор росту рецептора (PDGFR) α та β , рецептор фактора росту фібробластів (FGFR) 1-3, рецептор фактора росту ендотелію судин (VEGFR) 1-3 та Fms-подібної тирозинкінази-3 (FLT3). Крім того, пригнічує низку нерепторних тирозинкіназ (RTKs): Lck, Lyn та Src кінази. Внесок пригнічення FLT3 та pRTK кіназ в ефективність нінтеданібу при ідіопатичному фіброзі легень не з'ясований	15.10.2014/ 28.10.2014
Opdivo ⁴ (nivolumab) BLA	L01XC17	Bristol-Myers Squibb	Неоперабельна або метастатична меланома	Імуноглобулін людини G 4 (IgG4) – моноклональне антитіло, що зв'язується з PD-1 рецептором та блокує його взаємодію з PD-L1 та PD-L2. На сингенних моделях пухлин мишей блокування PD-1 активності призводить до гальмування росту пухлини	22.12.2014/ 22.12.2014

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/Старт маркетингу ³
Orkambi ^{4, 5} (lumacaftor 200 mg/ ivacaftor 125 mg) NDA	R07AX30	Vertex Pharmaceuticals	Муковіцидоз у пацієнтів 12 років і старших з гомозиготною мутацією F508del у CFTR гені ⁷	Лумакафтор покращує конформаційну стабільність F508del-CFTR, що призводить до збільшення переробки й обігу зрілого білка на поверхні клітини. Івакафтор є потенціатором CFTR, що сприяє підвищенню транспорту іонів хлору шляхом підвищення ймовірності відкриття CFTR каналу на поверхні клітин. У дослідженнях <i>in vitro</i> лумакафтор та івакафтор діють безпосередньо на білок CFTR у первинних людських бронхіальних епітеліальних культурах та інших клітинних лініях, що несуть мутації F508del-CFTR, збільшуючи кількість, стабільність і функціонування F508del-CFTR на поверхні клітин, що призводить до збільшення транспорту іонів хлору	02.07.2015/ 06.07.2015
Praxbind ^{4, 5} (idarucizumab) BLA	V03AB37	Boehringer Ingelheim	Антидот дабігатрану. Застосовують для відміни антикоагулянтних ефектів дабігатрану (Прадакса) у пацієнтів, які отримували останній при екстрених хірургічних втручаннях з ризиком загрози життю або неконтрольованих кровотеч ⁶	Фрагмент гуманізованого моноклонального антитіла (Fab), отриманого з молекули ізотипу IgG1, мішенню якого є прямий інгібітор тромбіну дабігатран та його ацилглюковані метаболіти. Завдяки більш високій спорідненості до тромбіну, ніж така у дабігатрану, ідаруцизумаб нейтралізує антикоагулянтну дію останнього	16.10.2015/ 21.10.2015
Raxibacumab ⁵ BLA	J06BB18	GlaxoSmithKline	Легенева форма сибірки	Моноклональне антитіло, що зв'язується з протективним антигеном (PA) екзотоксину <i>B.anthraxis</i>	14.12.2012/ 14.12.2012

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/Старт маркетингу ³
Signifor ⁵ (pasireotide diaspартате) NDA	H01CB05	Novartis	Хвороба Кушинга	Ін'єкційний циклогептапептидний аналог соматостатину. Зв'язується з соматостатиновими рецепторами (SSTRs), пригнічуючи секрецію АКТГ, що призводить до зниження секреції кортизолу	14.12.2012/ 14.12.2012
Sirturo ⁵ (bedaquiline) NDA	J04AK05	Janssen Therapeutics	Полірезистентні форми туберкульозу легень в осіб, старших 18 років ⁶	Антимікобактеріальний препарат групи діарилінолонів, що пригнічує АТФ-синтазу в мікобактеріях шляхом зв'язування з субодиницею С ферменту	28.12.2012/ 28.12.2012
Strensiq ^{4,5} (asfotase alfa) BLA	A16AB13	Alexion Pharmaceuticals	Перинатальна, інфантильна та ювенільна гіпофосфатазія (ГЕС)	Засіб ферментозамісної терапії при гіпофосфатазії, яка виникає при дефіциті активності тканиннеспецифічної лужної фосфатази, що кодується геном ALPL (TNSALP)	23.10.2015/ 23.10.2015
Sylvant ⁵ (siltuximab) NDA	L04AC11	Janssen Biotech	Мультицентрична хвороба Кастельмана	Зв'язує інтерлейкін-6 (IL-6) людини та попереджує його взаємодію з розчинними та мембранозв'язаними IL-6 рецепторами	23.04.2014/ 25.04.2014
Synribo ⁵ (omacetaxine mesopresuccinate) NDA	L01XX40	Teva Pharmaceutical	Хронічна або прискорена фаза хронічної мієлоїдної лейкемії в дорослих хворих з резистентністю або толерантністю до двох або більше інгібіторів тирозинкінази	Механізм дії до кінця не з'ясований, але пов'язаний з пригніченням синтезу білка. <i>In vitro</i> , знижує рівень BCR-ABL онкобілка та MCL-1 білка	26.10.2012/ 19.11.2012

Торговельна (міжнародна) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Tagrisso ⁴ (osimertinib) NDA	L01XE35	Astra-Zeneca	Метастатичний недрібноклітинний рак легенів (NSCLC) з мутацією рецептора епідермального фактора росту (EGFR) T790M у пацієнтів з прогресуванням процесу під час або після терапії інгібіторами EGFR тирозинкінази ⁶	Інгібітор кінази рецептора епідермального фактора росту (EGFR), який необоротно зв'язується з певними мутантними формами EGFR (T790M, L858R і делеції в 19 екзоні). Пригнічує активність HER2, HER3, HER4, AXC1 і VEGFR <i>in vitro</i> у клінічно значущих концентраціях	13.11.2015/ 13.11.2015
Unituximab ⁵ (dinutuximab) BLA	L01XC16	United Therapeutics Corporation	Нейробластома групи високого ризику в дітей, у яких досягається принаймні часткова відповідь на попередньому рівні першої лінії полікомпонентної мультимодальної терапії	Динутуксимаб (також відомий як sh 14.18) є хімерним моноклональним антитілом, зібраним як комбінація ДНК миші та людини. Зв'язується з гліколіпідом GD2, що експресується на клітинах нейробластоми і на нормальних клітинах нейроектодермального походження, включаючи центральну нервову систему та периферичні нерви, й індукує лізис GD2-експресованих клітин за допомогою антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) і комплемент-залежної цитотоксичності (CDC)	10.03.2015/ 10.03.2015

Торговельна (міжнародна непатентована) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Vimizim ⁵ (elosulfase alfa) BLA	A16AB12	BioMarin	Мукополісахаридоз типу IVA	Екзогенне джерело ферменту N-ацетилгалактозамін-6-сульфатази, що захоплюється лізосомами та підвищує катаболізм глікозаміногліканів (GAG), кератансульфату (KS) та хондроїтин-6 сульфату (C6S)	14.02.2014/ 14.02.2014
Voraxaze ⁵ (glucapridase) BLA	V03AF09	BTG International	Токсичні рівні метотрексату в крові пацієнтів з нирковою недостатністю	Рекомбінантний бактеріальний фермент, що гідролізує кінцеву карбоксильну групу глутаматного залишку фолиєвої кислоти та класичного антифолату метотрексату. Перетворює метотрексат у неактивні метаболіти 4-дезоксид-4-аміно-N10-метилптероєву кислоту (DAMPA) та DAMPA глутамат, забезпечуючи альтернативний шлях виведення метотрексату нирками при його використанні у високих дозах	17.01.2012/ 01.04.2012
Xalkori ⁵ (crizotinib) NDA	L01XE16	Pfizer	ALK-позитивний (ALK+) недрібноклітинний рак легень	Інгібітор рецепторних тирозинкіназ, включаючи кіназу анаплас-тичної лімфоми (ALK)	26.08.2011/ 24.08.2012
Xuriden ^{4,5} (uridine triacetate) NDA	-	Wellstat Therapeutics	Спадкова оротова ацидурія	Уридину триацетат є ацетильованою формою уридину. Після перорального введення деацетилюється неспецифічними естеразами до уридину, який повертається до системного кровотоку	04.09.2015/ 08.09.2015
Yervoy ⁵ (ipilimumab) BLA	L01XC11	Bristol-Myers Squibb	Метастатична меланома	Моноклональне антитіло – інгібітор CTLA-4 рецепторів. Зв'язуючись з CTLA-4 рецепторами цитотоксичних Т-лімфоцитів, блокує їхню взаємодію з лігандами CD80 і CD86. Непрямий вплив на меланому може бути результатом збільшення опосередкованої Т-клітинами протипухлинної імунної відповіді	25.03.2011/ 25.03.2011

Торговельна (міжнародна) назва, маркетингова категорія	АТС код ^{1,2}	Компанія розробник	Показання для застосування ³	Механізм дії ³	Схвалення у США/ Старт маркетингу ³
Zelboraf ⁵ (vemurafenib) NDA	L01XE15	Roche	Неоперабельна або метастатична меланома з мутацією BRAF ^{V600E} , що визначена за допомогою схваленого FDA-тесту	Низькомолекулярний пероральний інгібітор серин-треонін кінрази, що кодується геном BRAF, включаючи BRAF з активуючими мутаціями в кодоні 600 (BRAF ^{V600E}). <i>In vitro</i> пригнічує низку інших кіназ (CRAF, ARAF, wild-type BRAF, SRMS, ACK1, MAP4K5 та FGR)	17.08.2011/ 17.08.2011
Zydelig ^{4, 5} (idelalisib) NDA	L01XX47	Gilead	Рецидивуюча хронічна лімфоцитарна лейкоїма, рецидивуюча фолікулярна неходжкінська В-клітинна лімфома, дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома	Інгібітор фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) дельта. Індукує апоптоз та пригнічує проліферацію клітинних ліній, отриманих зі злоякісних В-клітин та первинних клітин пухлин. Пригнічує декілька сигнальних шляхів, у тому числі В-клітинного рецептора (BCR) та рецепторів CXCR4 та CRCR5 у лімфатичних вузлах та кістковому мозку. Пригнічує хемотаксис та адгезію, знижує життєздатність клітин	23.07.2014/ 23.07.2014
Zykadia ⁴ (ceritinib) NDA	L01XE82	Novartis	Метастатичний недрібноклітинний рак легень з експресією кінази анапластичної лімфоми (ALK+) ⁶	Високоселективний інгібітор кінази анапластичної лімфоми (ALK). Пригнічує ALK-опосередковане фосфорилування сигнального білка STAT3 та проліферацію ALK-залежних ракових клітин <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	29.04.2014/ 29.04.2014

Примітка. BLA (The Biologics License Application), NDA (New Drug Application)

¹Електронний ресурс. Режим доступу: WHOCC - ATC/DDD Index/http://www.whocc.no/atc_ddd_index/; ²Community register of medicinal products for human use. Електронний ресурс. Режим доступу: <http://es.euro.ema.eu/health/documents/community-register/html/d901.htm>; ³Електронний ресурс. Режим доступу: <http://www.drugs.com/>; ⁴прорие; ⁵перший у класі; ⁶ці показання затверджені на підставі прискореного схвалення. Продовження затвердження для цих показань залежатиме від перевірки й оцінки клінічної користі в підтверджуючих випробуваннях; ⁷якщо генотип пацієнта невідомий, повинен використовуватися «FDA-cleared CF mutation test» для виявлення присутності мутації F508del на обох алелях гена CFTR.

«Ліки-сироти» на основі NME's, схвалені FDA у 2011–2015 роках, за належністю до певних фармакотерапевтичних груп

Фармакотерапевтична група	Торговельна (міжнародна непатентована) назва
Препарати, що діють на травний тракт та метаболізм	Cerdelga (eliglustat), Cholbam (cholic acid), Eleyso (taliglucerase alfa), Gattex (teduglutide) ² , Kanuma (sebelipase alfa) ^{1, 2} , Myalept (metreleptin for injection) ² , Strensiq (asfotase alfa) ^{1, 2} , Vimizim (elosulfase alfa) ² , Xuriden (uridine triacetate) ^{1, 2}
Препарати, що діють на кров та крово-творні органи	Firazyr (icatibant) ²
Препарати для лікування захворювань серцево-судинної системи	Adempas (riociguat) ² , Juxtapid (lomitapide) ² , Kynamro (mipomersen sodium) ² , Northera (droxidopa) ² , Opsumit (macitentan), Repatha (evolocumab)
Гормональні препарати для системного застосування	Natpara (parathyroid hormone), Signifor (pasireotide diaspertate) ²
Протимікробні препарати для системного застосування	Cresemba (isavuconazonium sulfate), raxibacumab ² , Sirturo (bedaquiline) ²
Протипухлинні препарати	Adcetris (brentuximab vedotin) ² , Alecensa (alectinib) ¹ , Beleodaq (belinostat), Blincyto (blinatumomab) ^{1, 2} , Bosulif (bosutinib), Caprelsa (vandetanib), Cometriq (cabozantinib) ² , Cotelllic (cobimetinib), Cyramza (ramucirumab), Darzalex (daratumumab) ^{1, 2} , Emlpiciti (elotuzumab) ^{1, 2} , Erwinaze (asparaginase Erwinia chrysanthemi), Esbriet (pirfenidone) ^{1, 2} , Farydak (panobinostat), Gazyva (obinutuzumab) ¹ , Gilotrif (afatinib), Iclusig (ponatinib), Imbruvica (ibrutinib) ^{1, 2} , Impavido (miltefosine) ² , Jakafi (ruxolitinib) ² , Keytruda (pembrolizumab) ^{1, 2} , Kyprolis (carfilzomib), Lenvima (lenvatinib), Lynparza (olaparib) ² , Mekinist (trametinib) ² , Ninlaro (ixazomib), Ofev (nintedanib) ^{1, 2} , Opdivo (nivolumab) ¹ , Pomalyst (pomalidomide), Portrazza (necitumumab), Synribo (omacetaxine mepesuccinate) ² , Tagrisso (osimertinib) ¹ , Tafinlar (dabrafenib), Unituxin (dinutuximab) ² , Xalkori (crizotinib) ² , Yervoy (ipilimumab) ² , Yondelis (trabectedin), Zelboraf (vemurafenib) ² , Zydelig (idelalisib) ^{1, 2} , Zykadia (ceritinib) ¹
Імуносупресори	Nulojix (belatacept) ² , Sylvant (siltuximab) ²
Препарати для лікування захворювань нервової системи	Hetlioz (tasimelteon), Onfi (clobazam)
Препарати для лікування захворювань дихальної системи	Kalydeco (ivacaftor) ² , Orkambi (lumacaftor 200 mg/ivacaftor 125 mg) ^{1, 2}
Інші лікарські засоби	Ferriprox (deferiprone), Praxbind (idarucizumab) ^{1, 2} , Voraxaze (glucarpidase) ²

Примітка. ¹Прорив; ²перший у класі.

Найширше представлені препарати для лікування пухлинної хвороби (58 % від загальної кількості схвалених «ліків-сиріт»). При цьому використання FDA різноманітних програм прискорення розробки та схвалення інноваційних лікарських засобів (застосовані для 64 % «ліків-сиріт») забезпечує ранній доступ пацієнтів до нового лікування при збереженні високих вимог щодо ефективності та безпеки.

За прогнозами, ринок «ліків-сиріт» дедалі зростатиме й становитиме до 2020 року близько 176 млрд доларів США, або 19 % ринку рецептурних препаратів. Найпродаванішими можуть бути препарати Opdivo та Keytruda (для лікування неоперабельної або метастатичної меланому), Imbruvica (для лікування мантиєклітинної лімфоми та хронічної лімфоцитарної лейкемії) та Esbriet (для лікування ідіопатичного фіброзу легень).

1. Rare Diseases Act of 2002. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://history.nih.gov/research/downloads/PL107-280.pdf>
2. Armstrong Walter (May 2010) "Pharma's Orphans". Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.pharmexec.com/pharmas-orphans>
3. Gaze L., Breen J. (2012) "The Economic Power of Orphan Drugs" (PDF), Thomson Reuters, retrieved 29 June 2015. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://thomsonreuters.com/content/dam/openweb/documents/pdf/pharma-life-sciences/white-paper/1001450.pdf>
4. Закон України «Про внесення змін до Основ законодавства України про охорону здоров'я щодо забезпечення профілактики та лікування рідкісних (орфанних) захворювань (№ 2461). Електронний ресурс. – Режим доступу: rada.gov.ua.
5. Aymé S., Bellet, Rath A. / Rare diseases in ICD11: making rare diseases visible in B. health information systems through appropriate coding // Orphanet Journal of Rare Diseases. 2015. DOI: 10.1186/s13023-015-0251-8. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-015-0251-8>
6. 2014 REPORT ON THE STATE OF THE ART OF RARE DISEASE ACTIVITIES IN EUROPE. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.eucerd.eu/upload/file/Reports/2014ReportStateofArtRD-Activities.pdf>.
7. Illingworth P. Orphan Drug Policies: Implications for the United States, Canada, and Developing Countries / Illingworth P.; Cohen J.; Illingworth P. // Health Law Journal. – 2004. – V. 12. – P. 83–200. PMID 16539081.
8. EvaluatePharma® Orphan Drug Report 2015. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://info.evaluategroup.com/rs/607-YGS-364/images/EPOD15.pdf>
9. The European Union and the FDA working together to create Common Application for Orphan Designation for Medicines. Електронний ресурс. – Режим доступу: http://ec.europa.eu/health/files/orphanmp/doc/annex1_announcement_en.pdf
10. The Novel New Drugs of 2011. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM293663.pdf>
11. 2012 Novel New Drugs Summary. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM337830.pdf>
12. Novel New Drugs 2013 Summary. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM381803.pdf>
13. Novel New Drugs 2014 Summary. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM430299.pdf>
14. Novel New Drugs 2015 Summary. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM481709.pdf>
15. EURODIS. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.eurordis.org/what-we-do>
16. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://www.pharmacy.umn.edu/centers-and-institutes/center-orphan-drug-research/15>
17. Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://www.kgi.edu/faculty-and-research/kgi-centers/center-for-rare-disease-therapies/about-rare-diseases>

Т. А. Бухтірова, Ю. І. Губський

«Ліки-сироти» на основі нових молекулярних субстанцій, схвалені FDA у 2011–2015 роках (аналітичний огляд)

У статті проаналізовано сегмент «ліків-сиріт» на основі нових молекулярних субстанцій (NME's), схвалених FDA у 2011–2015 роках, частка яких у загальній кількості схвалених у цей період інноваційних продуктів складає 40 %. Високий рівень інновацій у цьому сегменті підтверджується кваліфікацією FDA 26 продуктів як перших у класі, 5 – як прорив, 13 – як перших у класі/прорив. Більшість схвалених «ліків-сиріт» на основі NME's (58 %) призначені для лікування різних форм пухлинної хвороби. Використання FDA різноманітних програм прискорення розробки та схвалення

інноваційних лікарських засобів (застосовані для 64 % «лікв-сирит») забезпечує ранній доступ пацієнтів до нового лікування при збереженні високих вимог щодо їхньої ефективності та безпеки. За прогнозами, ринок «лікв-сирит» дедалі зростатиме й становитиме до 2020 року близько 176 млрд доларів США, або 19 % ринку рецептурних препаратів. Найпродаванішими можуть стати препарати Opdivo та Keytruda (для лікування неоперабельної або метастатичної меланому), Imbruvica (для лікування мантиклетинної лімфоми та хронічної лімфоцитарної лейкомії) та Esbriet (для лікування ідіопатичного фіброзу легень).

Ключові слова: «ліки-сироти», нові молекулярні субстанції, FDA

T. A. Бухтиарова, Ю. И. Губский

«Лекарства-сироты» на основе новых молекулярных субстанций, одобренные FDA в 2011–2015 годах (аналитический обзор)

В статье проанализирован сегмент «лекарств-сирот» на основе новых молекулярных субстанций (NME's), одобренных FDA в 2011–2015 годах, доля которых в общем количестве одобренных в этот период инновационных продуктов составляет 40 %. Высокий уровень инноваций в этом сегменте подтверждается квалификацией FDA 26 продуктов как первых в классе, 5 – как прорыв, 13 – как первых в классе/прорыв. Большинство одобренных «лекарств-сирот» на основе NME's (58 %) предназначены для лечения различных форм опухолевой болезни. Использование FDA различных программ ускорения разработки и одобрения инновационных лекарственных средств (применены для 64 % «лекарств-сирот») обеспечивает ранний доступ пациентов к новому лечению при сохранении высоких требований к их эффективности и безопасности. По прогнозам, рынок «лекарств-сирот» будет расти и составит к 2020 году около 176 млрд долларов США, или 19 % рынка рецептурных препаратов. Наиболее продаваемыми могут стать препараты Opdivo и Keytruda (для лечения неоперабельной или метастатической меланомы), Imbruvica (для лечения мантиклеточной лимфомы и хронической лимфоцитарной лейкомиї) и Esbriet (для лечения идиопатического фиброза легких).

Ключевые слова: «лекарства-сироты», новые молекулярные субстанции, FDA

T. Bukhtiarova, Yu. Gubsky

«Orphan drugs» on the basis of new molecular entities approved FDA in 2011–2015 (Analytical Review)

The article analyzed the segment of «orphan drugs» on the basis of new molecular entities (NME's) approved by the FDA in 2011–2015. Their share is 40 % in the total number of innovative products approved during this period. The high level of innovation in this segment was confirmed the FDA's qualification of 26 products as a first in class, 5 – as a breakthrough, 13 – as a first in class/breakthrough. Most approved «orphan drugs» on the basis of NME's (58 %) are intended for the treatment of various forms of neoplastic disease. Using FDA various programs to accelerate the development and approval of innovative medicines (used for 64 % of «orphan drugs») provides early access of patients to the new treatment while maintaining high efficiency and their safety requirements. According to forecasts, the market «orphan drugs» will continue to grow and by 2020 will amount to about 176 billion \$ US or 19 % of the market of prescription drugs. Best-selling drugs can be Opdivo and Keytruda (for the treatment of unresectable or metastatic melanoma), Imbruvica (for the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia) and Esbriet (for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis).

Key words: orphan drugs, new molecular entities, FDA

Надійшла: 20 липня 2016 р.

Контактна особа: Губський Ю. І., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Вінборон: перший український гастропротектор – агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1)

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Ключові слова: Вінборон, ванілоїдні рецептори, капсаїцин, гастропротекція

Відомо, що провідну роль у формуванні кислотно-пептичного фактора шлунка відіграє утворення соляної (хлористоводневої – HCl) кислоти. Активність факторів агресії шлункового соку забезпечує як реалізацію функції перетравлення, так і ускладнює процеси репарації в слизовій оболонці шлунка (СОШ). Саме тому в 1946 році американський професор хірургії Leonor Dagsted з метою зниження кислотності шлункового соку впровадив у широку клінічну практику денервацію HCl-продукуючих парієтальних гранулоцитів шляхом виконання ваготомії – пересічення гілок блукаючого нерва (*n. vagus*) [1–3].

Поява препаратів, які здатні знижувати секреторну активність шлунка (H₂-гістаміноблокаторів та інгібіторів протонної помпи (ІПП)), дозволила скоротити, а в 1993 році й зовсім відмовитися від виконання ваготомії [2]. Проте клінічні спостереження останніх десятиліть продемонстрували низку недоліків антисекреторних препаратів. Так, H₂-гістаміноблокатори поступаються за ефективністю ІПП, а тривала гіпоацидність шлункового соку, яка виникає на тлі регулярного застосування ІПП, як і зниження кислотності шлункового соку з будь-якої причини, призводить до розвитку мальабсорбції певних речовин з подальшим дефіцитом їх (вітамін B₁₂, Fe²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺), прогресування остеопорозу, гіпергастринемії, надмірного бактеріального росту та ін. Дисбактеріоз у свою чергу сприяє розвитку запального процесу в СОШ і товстій кишці, ознаками якого є порушення балансу між про- та протизапальними цитокінами, розвиток нітритно-оксидативного стресу та деградація колаге-

нових і неколагенових білків слизу з подальшим руйнуванням слизового бар'єра та, як наслідок, порушення резистентності та зниження інтенсивності регенераторних процесів [2, 4, 5].

Наведені дані та результати детальних досліджень регуляторних біомеханізмів підтримки структурно-функціонального гомеостазу СОШ спонукають до пошуку нових підходів до гастропротективної терапії.

У цьому аспекті привертають увагу підтверджені імуногістохімічними методами результати досліджень з нейрофізіології аферентних закінчень щодо наявності в складі первинних аферентів значної кількості нейропептидів (аргінін-вазопресин, вазоактивний інтестинальний поліпептид, гастрин-релізінг пептид, галанін, дінорфін, кальцитонін – ген споріднений пептид, кортикотропін-релізінг фактор, лей-енкефалін, мет-тирозил-лізин, нейрокінін А, нейропептид К, окситоцин, релізінг-фактор гормону росту, соматостатин, субстанція Р, фактор росту нервів, холецистокінін, еледозин та ін.), які здатні рухатися не тільки доцентрово, а й антидромно, та накопичуватись у везикулах чутливих нервових терміналей [6, 7]. Крім того, зазначені нейропептиди здатні виділятися екзоцитозом при стимуляції чутливих терміналей різноманітними хімічними та фізичними факторами, що спонукає до цілеспрямованого пошуку хімічно-активних речовин, спроможних регулювати ці процеси [6, 8].

Відомо, що іннервацію шлунково-кишкового тракту забезпечують дві мережі нервових волокон: мієнтеричне (міжм'язове, Ауєрбахівське) та підслизове (Мейснерівське) сплетення. Разом вони утворюють ентеричну нервову систему [9]. Така система в людини містить понад 100 млн сенсорних нейронів, інтер- та мотонейронів, тобто,

більше, ніж є в цілому спинному мозку, тому найліпше розглядати її як «переміщену» частину центральної нервової системи (ЦНС), яка відповідає за регулювання функцій травного тракту [9].

Нервові сплетення шлунка майже на 90–100 % представлені синаптичними закінченнями преангіліонарних волокон *n. vagus* [7, 10]. Концепція «ефекторної функції» аферентних закінчень та відомості про наявність у певної частини чутливих терміналей *n. vagus* (10–30 %) везикул, які містять нейропептиди: субстанція P (SP), кальцитонін-ген споріднений пептид (CGRP), нейрокінін А (НКА), дозволяє розглядати модуляцію активності аферентних закінчень як перспективний підхід до гастропротективної терапії [11].

У 1967 році венгерський фізіолог Jancso N. та співавт. встановили, що серед іритантів, які діють на первинні аференти, тільки активний компонент червоного гострого перцю (*Capsicum frutescens*) – капсаїцин та споріднені йому ванілоїди залежно від дози здатні крім гострого збудження викликати тривалу рефрактерність (десенситизацію) [8]. Десенситизуюча дія ванілоїдів та розгалужена система чутливих аферентів обумовили перевірене часом терапевтичне зовнішнє застосування екстракту червоного гострого перцю капсаїцину (0,025–0,250 %) у лікуванні постгерпетичної невралгії, діабетичної нейропатії, невралгії трійчастого нерва, ревматоїдного артрити, гострого первинного ідіопатичного полірадикулоневриту (синдром Гійена – Барре) [6, 12].

За даними літератури, капсаїцин взаємодіє зі специфічними рецепторами плазматичної мембрани С та Аδ (дельта) – нервових волокон, що належать до ноцицептивної аферентної системи [9, 13].

Немієлінізовані С-волокна з діаметром 0,4–1,2 мкм проводять нервовий імпульс (0,5–2,0 м/с) від хеморецепторів до вегетативних нейронів бічних рогів (синаптичний відділ нервової системи), що забезпечує відчуття хронічного нелокалізованого болю. Тонкі Аδ мієлінізовані волокна, що мають діаметр 2–5 мкм, забезпечують більш

швидке (12–30 м/с) проведення нервового імпульсу від механо- та терморецепторів до мотонейронів передніх рогів спинного мозку, чим забезпечують відчуття гострого локалізованого болю [9, 13].

Зданість цих рецепторів зв'язуватися з гомованіл-заміщеними лігандами та селективно модулювати локальну «ефекторну функцію» первинних аферентів стала передумовою появи в літературі їхнього визначення як ванілоїдних рецепторів (vanilloid receptor – VR1). VR1 належать до суперсімейства TRP (transient receptor potential) катіонних каналів та утворюють у сукупності одне з шести суперсімейств – TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) [12].

TRPV1 локалізуються на чутливих нейронах системи *n. vagus* та трійчастого нерва (*n. trigeminus*), у симпатичних нервових сплетеннях кишківника, сечового міхура, у деяких структурах ЦНС (corpus striatum, гіпокамп, ядра мозочка), а також епітеліоцитах кишківника та сечового міхура та ін. [14–16].

Новатором досліджень у галузі нейрогастроентерології, спрямованих на встановлення ролі нейропептидів (CGRP, SP, NP-Y) у регуляції моторики та функціонуванні сенсорних нейронів шлунково-кишкового тракту, став професор Грацького медичного університету (м. Грац, Австрія) P. Holzer [17].

Привертають увагу фундаментальні дослідження біомеханізмів гастропротекторної активності агоністів ванілоїдних рецепторів, зокрема, капсаїцину, професора Печського університету (м. Печ, Угорщина) G. Mozsik [18, 19]. У тому самому університеті в 2014 році А. Domotor представив виконану під керівництвом проф. G. Mozsik дисертацію, у якій були викладені результати імуногістохімічних досліджень, що підтвердили вивільнення аферентними волокнами шлунково-кишкового тракту нейропептидів (CGRP, SP) у відповідь на стимулюючий вплив капсаїцину [20].

Сьогодні регуляція функціональної активності та чутливості TRPV1 є об'єктом інтенсивних досліджень. До неспецифічних активаторів TRPV1

належать: дія термічного фактора (t від +43,0 до +52,0 °C), ацидоз ($pH < 6$), алкалоз ($pH > 8$), іонний дисбаланс, зміна трансмембранного потенціалу та ін. [21, 22]. До специфічних активаторів належать: 1) компоненти спецій (переважно пекучих): капсаїцин (червоний гострий перець («chilli») – *Capsicum frutescens* (16 млн одиниць пекучості за шкалою Сквіла (ОШС), гінгерол, зінгерон (імбир – *Zingiber officinal*, куркума – *Curcuma* – 16 тис. ОШС), ізотіоціанати (хрін звичайний – *Armoracia rusticana*, гірчиця – *Sinapis*, васабі (японський хрін) – *Eutrema japonicum*), алліцин (часник – *Allium sativum*) та ін.; 2) природні токсини: резінеферотоксин (молочай смолоносний – *Euphorbia resinifera*; 16 млрд ОШС), тиніатоксин (молочай Пуассона – *Euphorbia poissonii*; 5,3 млрд ОШС), ванілотоксини – DkTx (отрута тигрового тарантула *Tiger tarantula*), VaTx (отрута тарантула «Тринідадський шеврон» – *Trinidad chevron tarantula*; до 2 млн ОШС) та ін.; 3) ендегенні та екзогенні сполуки: анандамід (етаноламід арахідонової кислоти), H_2S , N-арахідоніламінофенол (метаболіт парацетамолу), лейкотрієн B_4 , $CuSO_4$, $FeSO_4$, кислоти ($pH < 6$) та ін. [22, 23].

Особливе місце серед ендегенних активаторів VR1 посідають N-арахідонілетаноламід та деякі продукти ліпоксигеназних перетворень арахідонової кислоти, зокрема, анандамід (арахідонілетаноламід), деградація якого веде до утворення арахідонової кислоти – субстрату біосинтезу ейкозаноїдів [14]. Це зумовлює активацію TRPV1 при розвитку запалення будь-якої етіології [24].

За даними E. Distrutti та співавт. (2006 р.), ендегенний газотрансміттер H_2S , який генерується в ентеричній нервовій системі, здатен активувати TRPV1 рецептори сенсорних нервових закінчень, призводить до інтенсифікації секреції хлоридів та моторної функції кишківника. Проте десенситизація ванілоїдних рецепторів у культурі субмукозних гангліонарних клітин товстої кишки людини шляхом перфузування розчинами капсаїцину (10 мкмоль/л) або капсаїцину (10 мкмоль/л) призво-

дить до нівелювання TRPV1-міметичної дії екзогенного донора гідроген сульфиду – NaHS (0,2–2,5 ммоль/л) [25].

Варто зазначити, що активація рилізину нейропептидів з капсаїцин-чутливих ноцицептивних терміналей може здійснюватися не тільки без ініціації больового сигналу (доцентрового потенціалу дії), але навіть без деполаризації цих терміналей (Maggi C. A., 1995; Donnerer J., Amann R., 1990) що, певно, пов'язане з прямою дією ванілоїдів на неселективні катіонні канали або іонів водню на кислотно-чутливі іонні канали [6].

Натепер одним з провідних напрямів світової фармакології є дослідження модулаторів активності TRPV1, а саме, активно вивчаються вплив агоністів та антагоністів (капсазепін, рутеній червоний та ін.) TRPV1 на функціональний стан шлунково-кишкового тракту (ШКТ), ноцицептивної аферентації та ін. [26].

Так, за даним літературних джерел, вітчизняними науковцями професором О. С. Заячківською і професором М. Р. Гжегоцьким (м. Львів) та співавт. були проведені дослідження значення ванілоїдної аферентації в ендегенній стрес-лімітуючій системі органів травлення. Було встановлено, що капсаїцинова денервація за умов кислотно-пепсинового цитолізу підсилювала прояви функціональної неспроможності епітеліального бар'єра та виснажувала компенсаторні механізми ендотеліальної ланки вазорегулювання на 30 %, зумовлюючи порушення обмінно-трофічних процесів і локального забезпечення важливими факторами, які детермінують виразкозагоєння [27].

Z. Helyes та співавт. (2004 р.) на моделі ад'ювантного артриту в щурів довели, що ванілоїдна десенситизація превентивним підшкірним введенням резінеферотоксину (200 мг/кг) спричинює інгібування екзоцитозу з первинних аферентів соматостатину. Це призводить до виснаження контррегуляторних механізмів пригнічення запалення – нівелюється здатність соматостатину інгібувати вивільнення прозапальних нейропептидів та модулювати активність імунної системи [28].

На особливу увагу заслуговують дослідження, спрямовані на пошук нової генерації лікарських засобів (ЛЗ) з гастропротективною дією серед агоністів VR1. Так, вже була доведена клінічна ефективність застосування амтолметину гуацилу (АМГ) як модифікованого нестероїдного протизапальної дією [29, 30]. АМГ представляє собою вдосконалену молекулу добре відомого на Заході «традиційного» НПЗЗ толметину. Толметин використовується в клінічній практиці понад 40 років. Це надійний анагетик з виразними протизапальними властивостями, що довів добрий терапевтичний потенціал як при купуванні гострого болю, так і при лікуванні хронічних ревматичних захворювань. Вельми показово, що в США толметин зареєстрований для використання в педіатричній практиці у дітей з 2-річного віку [29]. Модифікація толметину шляхом додавання амінокислоти валіну призвела до суттєвої зміни його фармакологічних властивостей. Особливістю новоствореного ЛЗ є його взаємодія з TRPV1 СОШ (до потрапляння в системний кровообіг), що супроводжується індукцією каскаду біохімічних перетворень, які активують NO-синтази, знижують стимулювану продукцію HCl, пригнічують перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) та ін., що вдало нівелює побічні ефекти нестероїдного антифлогістика. Проте вплив АМГ на проліферативну активність епітеліоцитів СОШ досі не досліджувався [30–32].

У 2006 р. K. Fakusima та співавт. опублікували серію робіт, присвячених дослідженню простагландин (P_g)-опосередкованої дії інноваційного H₂-гістаміноблокатора лафутидину, зумовлену активацією TRPV1. На моделі HCl/етанол (60,0 % етанол у 150 ммоль/л HCl) та індометацин-індукованої гастропатії було показано зниження площі ураження СОШ на тлі введення лафутидину (10 мг/кг) подібно до ефекту введення капсаїцину (10 мг/кг) [33]. S. Horie та співавт. у 2004 році провели порівняння гастропротективної дії лафутидину (1, 3, 10 мг/кг) та фамотидину (1, 3, 10 мг/кг) та показали, що H₂-гіста-

міноблокатор з TRPV1-міметичною дією лафутидин (АТХ: А02ВА08) у дозі 10 мг/кг втричі ефективніше зменшував площу HCl-індукованих ушкоджень СОШ порівняно з фамотидином у тій самій дозі. Також була показана здатність антагоністів VR1 – рутенію червоного (2,4 мг/кг) та капсазепіну (25 мг/кг) нівелювати захисні властивості капсаїцину (2,5 мг/кг), [6]-гінгеролу (10 мг/кг) та лафутидину (10 мг/кг) на моделі 0,6 N (моль) HCl-індукованого ураження СОШ [33–35].

A. Osama, O. Shakim та співавт. (2013 р.) експериментально встановили, що водний екстракт (300 мг/кг) червоного перцю (*Capsicum frutescens*) здатен зменшувати площу ушкоджень СОШ у щурів, викликану застосуванням аспірину (200 мг/кг) на 71,1 %; призводить до зниження об'єму шлункового соку на 50,7 % та підвищення рН на 21,8 % відносно аспірину [36].

Зважаючи на широке застосування аспірину в кардіологічній практиці, варто зазначити, що капсаїцин не тільки не послаблює антиагрегантні властивості аспірину, а й здатен інгібувати АДФ-індуковану (10 ммоль/л) агрегацію тромбоцитів [18, 37].

У дослідженнях J. K. Kang та співавт. (1995 р.) тривале (4 тижні) превентивне доповнення раціону щурів подрібненим перцем чілі (200 мг/10 г сухого корму) призводило до зменшення двічі площі уражень СОШ через 60 хв після внутрішньошлункового введення 2,0 мл 100 % етанолу та становило відповідно 21,4 та 45,9 % поверхні слизової. Внутрішньошлункове введення щурам капсаїцину (2 мг/кг) за 30 хв до введення 100 % етанолу призводить до зменшення площі ураження СОШ на 37,0 % відносно групи щурів, які отримували виключно етанол [38].

Аналогічні результати були опубліковані O. C. Заячківською та співавт. (2005 р.), які встановили, що внутрішньошлункове введення щурам капсаїцину (0,5 мг/кг) у 8 разів зменшувало площу ураження СОШ, індукованого 100 % етанолом [27].

S. S. Zaghlood та співавт. (2015 р.) довели, що двотижневе внутрішньо-

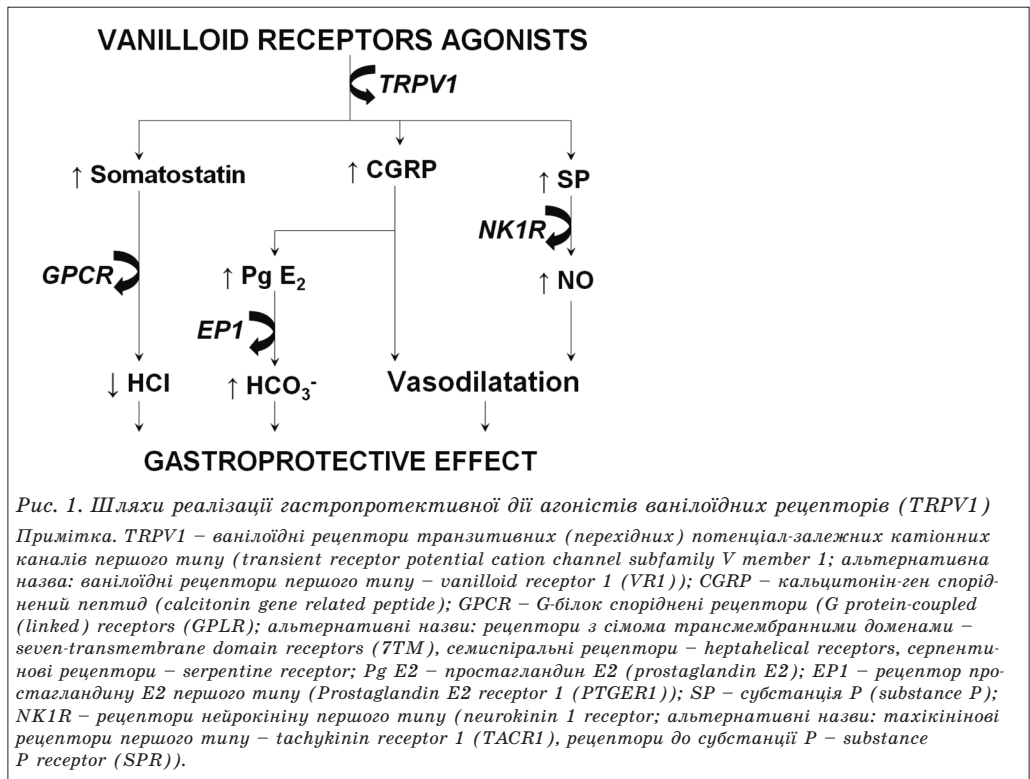
шлункове введення екстракту імбиру (100 мг/кг/добу) призводило до зменшення площі виразкових дефектів СОШ, індукованих одноразовим внутрішньошлунковим введенням індометацину (20 мг/кг), утричі та зростання концентрації NO у гомогенатах шлунка на 26,8 % [39].

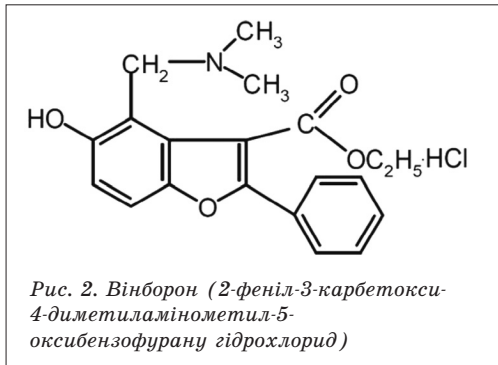
Реалізація гастропротективної дії агоністів TRPV1 (рис. 1) ґрунтується на екзоцитозі з С-аферентів нейропептидів (CGRP, SP, соматостатину та ін.). Соматостатин, впливаючи на G-білоксупряжені рецептори (GPCR), призводить до зниження продукції HCl у шлунку. Вивільнення CGRP викликає активацію P_g-опосередкованих механізмів захисту СОШ – підвищення продукції P_gE₂, який, взаємодіючи з рецепторами EP1, призводить до підвищення продукції HCO₃⁻. Важливим механізмом гастропротективного ефекту є індукція утворення NO під впливом CGRP та SP, яка взаємодіє з рецепторами нейрокініну першого типу (NK1R). Підвищення продукції NO викликає розширення судин та покращання трофіки СОШ [20, 22, 40, 41].

Зважаючи на механізми гастропротективної дії агоністів TRPV1 (підвищення утворення NO, зниження утворення HCl та підвищення продукції HCO₃⁻), постає питання дослідження ефективності їхнього застосування в лікуванні та профілактиці розвитку гастропатії, індукованої НПЗЗ [18, 22, 29].

Як гастропротектор з можливим TRPV1-опосередкованим механізмом дії привертає увагу новий вітчизняний ЛЗ з політропними фармакологічними ефектами Вінборон (рис. 2, виробник – ПАТ «НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» (ПАТ НВЦ «БХФЗ»), м. Київ), який за даними PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances)-прогнозу взаємозв'язку «молекулярна структура–активність» вірогідно може виступати агоністом ванілоїдних (TRPV1) рецепторів (P_a = 0,490; P_i = 0,008) [42].

Згідно з даними літератури, Вінборон здатен знижувати продукцію HCl у шлунку, що призводить до підвищення рН та зниження загальної кислотності. У попередніх дослідженнях на моделі ібупрофен-індукованої гастропатії, яка призводила до гіперацид-





ності шлункового соку, нами було встановлено, що порівняно з монотерапією ібупрофеном кислотність шлункового соку в щурів з ад'ювантним артритом при комбінованому застосуванні ібупрофену в дозах 73 і 218 мг/кг та Вінборону (11 мг/кг) знизилася на 8,4 та 16,7 % відповідно [43].

В експериментах на щурах доведено, що під впливом Вінборону рубцювання «ацетатних» виразок шлунка та ДПК, на відміну від ранітидину, завершується шляхом реституції СОШ без ознак запальної реакції в кінці лікування. За умов експериментальної індометацинової гастропатії в щурів Вінборон послаблює прояви ульцерогенності, співставляючись за ефективністю з ранітидином та омепразолом за величиною зазначеного ефекту [44].

Противираzkова дія Вінборону чітко проявилася за клінічних умов. Включення Вінборону (40 мг тричі на добу) до комплексної (ранітидин+де-нол+амоксицилін+метронідазол) терапії амбулаторних хворих на виразкову хворобу сприяло посиленню ступеня лікувального ефекту, що проявлялося, у першу чергу, більшим послабленням болювого та диспепсичного синдромів. Разом з цим, на тлі застосування Вінборону прискорювалися зворотний розвиток запальної реакції, рубцювання виразок та підвищувалася якість загоювання виразкового дефекту: наприкінці курсу лікування в СОШ та ДПК у 47,0 та 43,0 % пацієнтів відповідно не виявлялися ознаки запальної реакції та на 42,0 % збільшилася кількість хворих, у яких виразка зарубцювалась у вигляді «білого» рубця [44].

Наказом МОЗ України від 1 вересня 2014 року № 665 «Про державну реє-

страцію (перереєстрацію) лікарських засобів (медичних імунобіологічних препаратів) та внесення змін до реєстраційних матеріалів» (Додаток 2) Вінборон дозволений до застосування в клініці, як спазмолітик з місцевоанастезуючим ефектом при дисфункції жовчного міхура та сфінктера Одді (гіпокінетичний та гіпертонічний типи), холециститах, жовчнокам'яній хворобі, синдромі подразненого кишечника, виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки з болями спастичного характеру, у складі комплексного лікування порушень мозкового кровообігу, а також при хронічній вінцевій недостатності, яка протікає з нападами стенокардії. Препарат можна призначати також хворим з порушенням функціонального стану печінки, оскільки йому притаманна гепатопротекторна дія.

Висновки

Наведені вище дані експериментальних досліджень та клінічних спостережень про гастропротективну дію Вінборону при виразковій хворобі та НПЗЗ-індукованих гастропатіях, результати PASS-прогнозу щодо взаємодії Вінборону з ванілоїдними рецепторами вказують на можливий TRPV1-опосередкований механізм реалізації гастропротективної активності вітчизняного лікарського засобу.

Беручи до уваги розгалуженість капсаїцин-чутливих нервових закінчень ентеричної нервової системи та доведену високу спазмолітичну активність, можна зробити висновок, що Вінборон має перспективи широкого клінічного застосування в лікуванні гастроентерологічної патології.

Перспективою подальших пошуків є імуногістохімічні дослідження функціонального стану TRPV1 СОШ щурів на тлі двотижневого внутрішньошлункового введення Вінборону (11 мг/кг) та доповнення раціону щурів екстрактом гострого червоного однолітнього перцю (*Capsicum annuum L.*) сорту «Український гіркий», який за даними Ю. О. Бойко та співавт. (2014 р.) містить у своєму складі капсаїцин [45].

1. Лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в историческом аспекте / В. И. Совакин, Л. М. Смирнова, Г. Р. Бикбаева [и др.] // Архив внутренней медицины. – 2012. – № 6 (8). – С. 62–67.
2. Антоненко А. В. Особливості виникнення і прогнозування та підвищення ефективності лікування гастропатій, спричинених прийомом нестероїдних протизапальних препаратів, у хворих на остеоартроз : дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.02. «Внутрішні хвороби» / Антоніна Володимирівна Антоненко; НМУ ім. О. О. Богомольня. – Київ, 2016. – 188 с.
3. Szabo I. L. Cellular energetical actions of «chemical» and «surgical» vagotomy in gastrointestinal mucosal damage and protection: similarities, differences and significance for brain-gut function / I. L. Szabo, J. Czimmer, G. Mozsik // Curr. Neuropharmacol. – 2016. – V. 14, № 8. – DOI: 10.2174/1570159X14666160719121725
4. Kroupa R. Risk of long-term antisecretory treatment / R. Kroupa, J. Dolina // Vnitr Lek. – 2010. – V. 56, Issue 2. – P. 115–119.
5. Ito T. Association of long-term proton pump inhibitor therapy with bone fractures and effects on absorption of calcium, vitamin B₁₂, iron, and magnesium / T. Ito, R. T. Jensen // Current Gastroenterology Reports. – 2010 – № 12 (6). – P. 448–457. – DOI:10.1007/s11894-010-0141-0
6. Поленов С. А. Эффекторная функция афферентных нейронов / С. А. Поленов // Приложение № 14 к Российскому журналу гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии «Материалы XVI сессии Академической школы-семинара имени А. М. Уголева «Современные проблемы физиологии и патологии пищеварения». – 2001. – Т. 11, № 4. – С. 44–51.
7. Хропычева Р. П. Периферические механизмы вагусной регуляции секреции кислоты, пепсиногена и бикарбонатов в желудке : дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук. : спец. 03.00.13 «Физиология» / Раиса Петровна Хропычева; Институт физиологии им. И.П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2006. – 107 с.
8. Jancso N. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin / N. Jancso, A. Jancso-Gabor, J. Szolcsanyi // Br. J. Pharmacol. Chemother. – 1967. – 31 (1). – P. 138–51. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.1967.tb01984.x
9. Ганонг В. Ф. Физиология людини: Підручник; переклад з англ. : Наук. ред. перекладу М. Гжегоцький, В. Шевчук, О. Заячківська. – Львів : БаК, 2002. – 784 с.
10. Capsaicin-resistant vagal afferent fibers in the rat gastrointestinal tract: anatomical identification and functional integrity / H. R. Berthoud, L. M. Patterson, A. E. Willing [et al.] // Brain Res. – 1997. – № 746. – P. 195–206.
11. Золотарев В. А. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва / В. А. Золотарев, А. Д. Ноздрачев // Российский физиол. журнал. – 2001. – № 87 (2). – С. 182–204.
12. Sharma S. K. Mechanisms and clinical uses of capsaicin / S. K. Sharma, A. S. Vij, M. Sharma // European Journal of Pharmacology. – 2013. – № 720 (1–3). – P. 55–62. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.053
13. Geppetti P. Neurogenic Inflammation / Pierangelo Geppetti, Peter Holzer // Pub. by CRC Press Inc., U.S. – London, 1996. – 338 p.
14. Миронов Н. Ю. Ванилоидные рецепторы: структура, участие в регулировании функций организма, фармакология, терапевтический потенциал / Н. Ю. Миронов, В. В. Чурюканов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 5. – С. 55–69.
15. Holzer P. Neural emergency system in the stomach / P. Holzer // Gastroenterology. – 1998. – № 114. – P. 823–839. – DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70597-9
16. Geppetti P. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function / P. Geppetti, M. Trevisani // British Journal of Pharmacology. – 2004. – № 141. – P. 1313–1320. – DOI: 10.1038/sj.bjp.0705768
17. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides / P. Holzer // Neuroscience. – 1988. – № 24. – P. 739–768. – DOI: 10.1016/0306-4522(88)90064-4
18. Capsaicin – sensitive neural afferentation and the gastrointestinal tract: from bench to bedside / ed. by G. Mozsik, Omar M. E. Abdel-Salam and Koji Takeuchi. – Publisher: InTech, Croatia, 2014. – 320 p.
19. Mozsik G. Capsaicin as a new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination in human healthy subjects and in patients / G. Mozsik // Prog. Drug. Res. – 2014. – № 68. – P. 209–258. – DOI: 10.1007/978-3-0348-0828-6_9
20. Domotor A. Capsaicin-sensitive afferentation and human gastrointestinal tract : Doctoral (Ph.D) Dissertation. – Science of Pharmacology Doctoral School “Optimalisation of drug”; Pecs, 2014. – 66 p.
21. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain / N. Malek, A. Pajak, N. Kolosowska [et al.] // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2015. – № 65. – P. 1–10. – DOI: 10.1016/j.mcn.2015.02.001
22. Holzer P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system / P. Holzer // Pharmacol. Ther. – 2011. – № 131 (1). – P. 142–170. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.006

23. Romac J. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) / J. Romac, R. A. Liddle // *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. – 2012. – V. 1. – doi: 10.3998/panc.2012.11 – DOI: 10.1016/S0006-8993(96)01222-X
24. Role of sensory nerves in gastroprotective effect of anandamide in rats / Z. Warzecha, A. Dembinski, P. Ceranowicz [et al.] // *Journal of physiology and pharmacology*. – 2011. – № 62 (2). – P. 207–217.
25. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon / R. Schicho, D. Krueger, F. Zeller [et al.] // *Gastroenterology* – 2006. – № 131. – P. 1542–1552. – DOI: 10.1053/j.gastro.2006.08.035
26. Frias B. Capsaicin, nociception and pain / B. Frias, A. Merighi // *Molecules*. – 2016. – № 21 (6) / 797. – P. 1–33. – DOI: 10.3390/molecules21060797
27. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts / O. S. Zayachkivska, S. J. Konturek, D. Drozdowicz [et al.] // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2005. – V. 56, № 1. – P. 219 – 231.
28. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat / Z. Helyes, A. Szabo, J. Nemeth [et al.] // *Arthritis & Rheumatology*. – 2004. – V. 5, № 5. – P. 1677–1685. – DOI: 10.1002/art.20184
29. Каратеев А. Е. На пути к созданию новой генерации нестероидных противовоспалительных препаратов : амтолметин гуацил / А. Е. Каратеев // *Современная ревматология*. – 2014. – № 2. – С. 83–89.
30. Яременко О. Б. Нові можливості підвищення безпеки лікування нестероїдними протизапальними препаратами: у фокусі захист шлунково-кишкового тракту, нирок та суглобів / О. Б. Яременко, Г. М. Микитенко // *Здоров'я України*. – 2016. – № 2. – С. 56–58.
31. Amolmetin: a reappraisal of NSAID with gastroprotection / A. Garg, A. Shoeb, L. Subramanya Moodahadu [et al.] // *Hindawi Publishing Corporation. Arthritis*. – 2016. – V. 2016. – Article ID 7103705. – P. 1–5. – DOI: 10.1155/2016/7103705
32. Safety of amolmetin guacyl in comparison with celecoxib in patients with rheumatoid arthritis / Z. Jajic, K. Nekam, E. Koo [et al.] // *Gastrointestinal Clinical and Experimental Rheumatology*. – 2005. – V. 23. – № 6. – P. 809–818.
33. Gastroprotective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins / K. Fukushima, Y. Aoi, S. Kato [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – № 12 (19). – P. 3031–3037.
34. Protective role of vanilloid receptor type 1 in HCL-induced gastric mucosal lesions in rats / S. Horie, H. Yamamoto, G. J. Michael [et al.] // *Scandinavian Journal of Gastroenterology* – 2004. – № 4. – P. 303–312. – DOI: 10.1080/00365520103008647
35. Effects of vanilloid receptor agonists and antagonists on gastric antral ulcers in rats / H. Yamamoto, S. Horie, M. Uchida [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2001. – № 432. – P. 203– 210. – DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01481-9
36. Efficacy of capsicum frutescens in curing the peptic ulcer / Osama A. Shaikh Omar, Hassan M. Bukhari, Naser A. ElSawy [et al.] // *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. – 2013. – № 15 (1). – P. 43–54.
37. Inhibition of platelet aggregation by vanilloid-like agents is not mediated by transient receptor potential vanilloid-1 channels or cannabinoid receptors / S. Almaghrabi, D. Geraghty, K. Ahuja [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2016. – № 43 (6). – P. 606–611. – DOI: 10.1111/1440-1681.12569
38. Effect of capsaicin and chilli on ethanol induced gastric mucosal injury in the rat / J. Y. Kang, C. H. Teng, A. Wee [et al.] // *Gut*. – 1995. – № 36 (5). – P. 664–669. – DOI: 10.1136/gut.36.5.664
39. Protective effects of ginger and marshmallow extracts on indomethacin-induced peptic ulcer in rats / Sameh S. Zaghlool, Basim A. Shehata1, Ali A. Abo-Seif [et al.] // *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. – 2015. – V. 6, № 2. – P. 421–428. – DOI: 10.4103/0976-9668.160026
40. Calcitonin gene-related peptide released by capsaicin suppresses myoelectrical activity of gastric smooth muscle / S. Mizuguchi, T. Ohno Y. Hattori, K. Kamata [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – № 20 (4). – P. 611–618. – DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03764.x
41. Role of capsaicin sensitive afferent nerves in different models of gastric inflammation in rats / M. Larauchea, P. M. Antona, G. Peirob [et al.] // *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. – 2004. – № 110. – P. 89– 97. – DOI: 10.1016/j.autneu.2003.11.003
42. Hladkykh F. V. Experimental substantiation of effectively administration of vinboron for analgesic activity increase of ibuprofen / F. V. Hladkykh, N. H. Stepaniuk // *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. – 2016. – № 3. – P. 1–5.
43. Hladkykh F. V. The study of the gastric secretion in rats with adjuvant arthritis against the application of ibuprofen and its combination with vinboron / F. V. Hladkykh, N. H. Stepaniuk // *Pharmacology and Drug Toxicology*. – 2016. – № 3 (49). – P. 34–40.
44. Степанюк Н. Г. Ефективність вінборону при еразивно-виразкових ушкодженнях гастродуоденальної зони : дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук; спеціальність «Клінічна фармакологія» / Наталія Георгіївна Степанюк; ВДМУ ім. М. І. Пирогова. – Київ, 2002. – 184 с.
45. Определение содержания капсаицина в разных сортах *Capsicum annuum* и изучение противовоспалительной активности его спиртовых экстрактов / Ю. А. Бойко, И. А. Кравченко, Р. Б. Богомольный [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2014. – № 3. – С. 303–308.

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Винборон: перший український гастропротектор – агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1)

Концепція «ефекторної функції» аферентних закінчень та відомості про наявність у певної частини чутливих терміналей *n. vagus* везикул, які містять нейропептиди, такі як субстанція Р (SP), кальцитонін-ген споріднений пептид (CGRP) та інші, дозволяє розглядати модуляцію активності аферентних закінчень як перспективний підхід до гастропротективної терапії. Рецептори, які здатні зв'язуватися з гомованіл-заміщеними лігандами (ванілоїдами) та селективно модулювати локальну «ефекторну функцію» первинних аферентів отримали назву ванілоїдні (капсаїцинові) рецептори (vanilloid receptor). Вони належать до суперсімейства TRP (transient receptor potential) катіонних каналів та утворюють у сукупності одне з шести суперсімейств – TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1).

Аналіз результатів досліджень закордонних та вітчизняних науковців, спрямованих на вивчення впливу модуляторів активності TRPV1 на функціональний стан шлунково-кишкового тракту, показав, що агоністи ванілоїдних рецепторів (зокрема, активні компоненти пекучих спецій – капсаїцин, гінгерол, зінгерол, ізотіоціонати та ін.) мають виразну гастропротективну дію. Так активація TRPV1 призводить до екзоцитозу з С-аферентів нейропептидів (CGRP, SP, NKA, соматостатину та ін.). Соматостатин, впливаючи на G-білокспряжені рецептори (GPCR), призводить до зниження продукції HCl у шлунку. Вивільнення CGRP викликає активацію P_g-опосередкованих механізмів захисту слизової оболонки шлунка – підвищення продукції P_gE₂, який, взаємодіючи з рецепторами EP1, призводить до підвищення продукції HCO₃⁻. Важливим механізмом гастропротективного ефекту є індукція утворення NO під впливом CGRP та SP, яка взаємодіє з рецепторами нейрокініну першого типу (NK1R). Підвищення продукції NO викликає розширення судин та покращання трофіки слизової оболонки шлунка.

Натомість, застосування антагоністів ванілоїдних рецепторів (капсазепіну, рутенію червоного та ін.) чи моделювання ванілоїдної десенситизації призводить до зниження захисних властивостей слизової оболонки шлунка.

Особливу увагу привертає новий вітчизняний лікарський засіб Винборон, який за даними експериментальних досліджень та клінічних спостережень ефективності при виразковій хворобі та НПЗЗ-індукованих гастропатіях, результатами PASS-прогнозу взаємодії з TRPV1 виступає агоністом ванілоїдних рецепторів та має TRPV1-опосередковану гастропротективну дію.

Ключові слова: Винборон, ванілоїдні рецептори, капсаїцин, гастропротекція

Ф. В. Гладких, Н. Г. Степанюк

Винборон: первый украинский гастропротектор – агонист ванилоидных рецепторов (TRPV1)

Концепция «эффекторной функции» аферентных окончаний и сведения о наличии у определенной части чувствительных терминалей *n. vagus* везикул, содержащих нейропептиды, такие как субстанция Р (SP), кальцитонин-ген родственный пептид (CGRP) и др., позволяет рассматривать модуляцию активности аферентных окончаний как перспективный подход к гастропротективной терапии. Рецепторы, которые способны связываться с гомованил-замещенными лигандами (ванилоидами) и селективно модулировать локальную «эффекторную функцию» первичных аферентов, получили название ванилоидные (капсаициновые) рецепторы (vanilloid receptor). Они принадлежат к суперсемейству TRP (transient receptor potential) катийонных каналов и образуют в совокупности одно из шести суперсемейств – TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1).

Анализ результатов исследований зарубежных и отечественных ученых, направленных на изучение влияния модуляторов активности TRPV1 на функциональное состояние желудочно-кишечного тракта, показал, что агонисты ванилоидных рецепторов (в частности активные компоненты жгучих специй – капсаицин, гингерол, зингерол, изотиоционаты и др.) обладают выраженным гастропротективным действием. Активация TRPV1 приводит к экзоцитозу из С-аферентов нейропептидов (CGRP, SP, NKA, соматостатина и др.). Соматостатин, влияя на G-протеин-сопряженные рецепторы (GPCR), приводит к снижению продукции HCl в желудке. Высвобождение CGRP вызывает активацию P_g-опосредованных механизмов защиты слизистой оболочки желудка – повышение продукции P_gE₂, который, взаимодействуя с рецепторами EP1, приводит к повышению продукции HCO₃⁻. Важным механизмом гастропротективного эффекта является индукция образования NO под влиянием CGRP и SP, которая взаимодействует с рецепторами нейрокинина первого типа (NK1R). Повышение продукции NO вызывает расширение сосудов и улучшение трофики слизистой оболочки желудка.

В свою очередь, применение антагонистов ванилоидных рецепторов (капсазепина, рутенія красного и др.) или моделирование ванилоидной десенситизации приводит к снижению защитных свойств слизистой оболочки желудка.

Особое внимание привлекает новый отечественный препарат Винборон, который по данным экспериментальных исследований и клинических наблюдений эффективен при язвенной болезни и НПВП-индуцированных гастродуоденопатиях, согласно результатам PASS-прогноза взаимодействия с TRPV1 является агонистом ванилоидных рецепторов и обладает TRPV1-опосредованным гастропротективным действием.

Ключевые слова: Винборон, ванилоидные рецепторы, капсаицин, гастропротекция

F. V. Hladkykh, N. H. Stepaniuk

Vinboron: first Ukrainian gastroprotector – agonist vanilloid receptor (TRPV1)

The concept of «effector functions» of afferent endings and information about availability in certain sensitive parts of terminals *n. vagus* vesicles that contain neuropeptides such as substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) et al., gives the possibility to consider modulation of the activity of afferent endings as promising approach to gastroprotective therapy. Receptors that are able to be bound up with homovanillic substituted groups (vanilloids) and selectively to modulate local «effector function» of the primary afferent called vanilloid (capsaicin) receptors. They belong to group TRP (transient receptor potential) cationic channels and create together one of six sub-families – TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1).

Analysis of studies of foreign and domestic scientists, that aim was studying the effect of modulators of the activity of TRPV1 on the functional state of the gastrointestinal tract, has shown that agonist vanilloid receptors (including active components burning spices – capsaicin, gingerol, zingerol, isothiocyanates et al.) have distinct gastroprotective action. The activation of TRPV1 leads to exocytosis of C-afferent neuropeptides (CGRP, SP, NKA, somatostatin, etc.). Somatostatin, acting on G-protein-coupled receptors (GPCR) reduces the HCl production in the stomach. The release of CGRP induces activation of Pg-mediated defense mechanisms of the gastric mucosa – increasing production PgE2, which interacts with receptors EP1 leads to increasing production of HCO₃⁻. An important mechanism of gastroprotective effect is the induction of NO production under the influence of CGRP and SP that interacts with first type neurokinin receptors (NK1R). Increasing production of NO causes vasodilatation and improves trophic gastric mucosa.

Instead of that, the use of vanilloid receptor antagonists (capsazepine, ruthenium red, etc.) or vanilloid modeling desensitization reduces the protective properties of gastric mucosa.

Particular attention is attracted by the new national medicine vinboron that according to experimental studies and clinical observations is effective under ulcers and NSAID-induced gastropathy, results PASS-prediction interacting with TRPV1 acts as agonist of vanilloid receptor and has TRPV1-mediated gastroprotective properties.

Key words: vinboron, vanilloid receptors, capsaicin, gastroprotector

Надійшла: 13 липня 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, Україна, 21018. Тел.: +38 0 97 707 25 50. Електронна пошта: fedir.hladkykh@gmail.com

Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. В. Цивунін, В. А. Георгіянци

Гостра токсичність та ефективність 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл) піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н- піразоло[3,4-D]піридин-4-ону на моделі пентилентетразолового кіндлінгу в мишей

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: похідні піразоло[3,4-D]піридин-4-ону, протисудомні засоби, кіндлінг

Епілепсія являє собою складне за етіологією та патогенезом захворювання, що характеризується повторними судомними нападами, соматичними, когнітивними, психологічними порушеннями. На різних моделях епілепсії в тварин показано, що епілептогенез супроводжується численними метаболічними порушеннями в нейронах: змінами експресії генів, рецепторних комплексів, зокрема ГАМК- і глутаматних, провідності іонних каналів, морфологічними перебудовами, що призводять до гіперзбудливості нейрональних синапсів [1]. Тому правильний вибір лікарських засобів є необхідною ланкою раціональної терапії епілепсії. Проте лікування існуючими протиепілептичними препаратами (ПЕП) не дозволяє досягти повного контролю над хворобою та уникнути побічних ефектів, які нерідко виникають на тлі їхнього прийому [2].

Саме тому триває пошук нових ефективних та безпечних ПЕП, здатних одночасно впливати на різні патогенетичні механізми розвитку судом [3]. У попередніх дослідженнях на моделях пароксизмів різного патогенезу виявлено потужні антиконвульсивні властивості з широким діапазоном терапевтичних доз та політропним механізмом дії нового похідного піразоло[3,4-D]піридин-4-ону – 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-

ону, яке має лабораторний шифр – сполука 78553 [4–6].

Важливе значення в дослідженнях потенційних ПЕП мають експерименти на моделях судом у тварин. Одна з них ґрунтується на феномені зростання судомної активності, або так званому розгойдуванні (кіндлінг). Повторне введення субконвульсивних доз пентилентетразолу (коразолу) викликає фізіологічні та поведінкові зміни в мишей, які імітують епілепсію людини. Такі зміни виявляються, зокрема, у поступовому виникненні епілептичних нападів, зниженні когнітивних здібностей та інших характерних проявах [7, 8]. Перевага цієї моделі – можливість кількісно оцінити хронічний епілептогенез. Тому вона доцільна для поглиблення характеристики протисудомних властивостей зазначеної сполуки. Крім того, необхідно визначити клас токсичності, до якого вона належить.

Мета дослідження – визначити гостру токсичність та протиепілептичні властивості 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-ону за впливом на пентилентетразоловий кіндлінг.

Матеріали та методи. Гостру токсичність та поглиблене вивчення протисудомної активності сполуки 78553 вивчали згідно з методичними рекомендаціями [9]. Дослідження виконане на 42 білих нелінійних мишах-самцях масою 18–20 г, яких утримували в умовах віварію ЦНДЛ НФаУ відповідно до санітарно-гігієнічних норм (температура 19–24 °С, вологість повітря 50 %, режим природного освітлення «день-ніч», стандартний харчовий раціон з

вільним доступом до води та їжі). Усі досліди проводили згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідженнях» [10].

Для визначення гострої токсичності сполуки 78553 мишам (по 3 тварини у кожній експериментальній групі) внутрішньошлунково вводили суспензію цієї речовини з твіном-80 у широкому діапазоні доз (1000, 2500, 4000, 5000 мг/кг) одноразово. Об'єм суспензії становив 40 мл/кг, що відповідає 0,8 мл на 1 мишу масою 20 г. За тваринами спостерігали протягом 14 діб, оцінюючи їхній загальний стан і виживаність через 30 хв, 1 год, 3 год, 6 год, 12 год, 24 год, 7 діб та 14 діб. Розраховували LD₅₀ за методом Пастушенка та визначали клас токсичності сполуки 78553 [9, 11].

Протиепілептичні властивості досліджуваної сполуки вивчали на моделі пентилентетразолового кіндлінгу в мишей. Тварин випадковим чином розподіляли на 3 групи (n = 10): 1 – контрольна група, миші якої отримували внутрішньошлунково воду очищену в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла за 30 хв до щоденної ін'єкції пентилентетразолу; 2 – група тварин, яким вводили сполуку 78553 у вигляді суспензії з твіном-80 у дозі 200 мг/кг; 3 – група, тварини якої отримували референс-препарат натрію вальпроат («Депакін», сироп 300 мг/кг виробництва «Sanofi Winthrop Industria», Франція, серія 472) у такому самому режимі. Водний розчин пентилентетразолу («Sigma», США) вводили внутрішньоочеревинно в підпороговій дозі 30 мг/кг. Експеримент тривав 15 діб.

Доза сполуки 78553 (200 мг/кг) є максимально ефективною на моделі пентилентетразолових судом [6], ефективна доза вальпроату натрію (300 мг/кг) звичайно використовується в подібних дослідженнях [12, 13].

Кожну мишу після введення конвульсанту вміщували в окрему клітку та безперервно спостерігали за її станом протягом 30 хв. Протисудомну дію оцінювали щоденно за такими показниками: відсоток мишей з конвульсіями в кожній групі, кількість днів без пароксизмів, а також доба появи перших судом [14]. Тяжкість судом визначали за такою шка-

лою: 1 – здригання, 2 – манежний біг, 3 – клонічні напади, 4 – клоніко-тонічні судоми з боковим положенням, 5 – тонічна екстензія, 6 – тонічна екстензія, що призводить до загибелі тварин [15].

Для оцінки статистичної значущості міжгрупових відмінностей отриманих результатів використовували кутове перетворення Фішера.

Результати та їх обговорення. При оцінці загального стану тварин через 30 хв та 1 год після введення сполуки в дозах, що в 5, 12, 20 та 25 разів перевищують терапевтичну (1000, 2500, 4000 та 5000 мг/кг відповідно), виявлено тимчасове зменшення рухової активності мишей, що, вочевидь, обумовлено переважанням об'ємом уведеної рідини. Далі рухова активність відновлювалась. Протягом 2 тижнів спостереження всі тварини залишилися живими, а ознаки інтоксикації були відсутні. Отже, сполука 78553 відноситься до V класу токсичності за класифікацією Hodge та Sterner [16] – практично нетоксичні речовини (LD₅₀ > 5000 мг/кг).

Формування кіндлінгу виявляється посиленням конвульсивної активності в результаті повторної дії підпорогової дози конвульсанту. Введення першої підпорогової дози коразолу не викликало суттєвих змін поведінки мишей за винятком короткочасних періодів завмирання, кивків голови та тремору. Збільшення числа ін'єкцій коразолу призводило до поступового наростання конвульсивної активності, що виявлялось у появі клонічних судом передніх кінцівок, поєднаних з підйомом на задні лапи.

На рисунку 1 наведено динаміку розвитку пентилентетразолового кіндлінгу для кожної групи тварин. Протягом дослідження в контрольній групі 8 із 10 (80 %) мишей мали клонічні або тонічні судоми. В останній 15 день кількість мишей з судомами становила 7 (70 %), оскільки в однієї тварини, у якій судоми спостерігали напередодні, вони не виникли. Починаючи з 9 ін'єкції (9 доба), зареєстровано перші клонічні судоми в групах контролю та вальпроату натрію. У цих групах достовірно зменшення відсотку тварин з судомами спостерігали лише в останній день дослідження – на 15 добу (p < 0,05).

У тварин, які отримували досліджувану сполуку, перші судоми виникли на 14 добу. Сполука достовірно ($p < 0,05$) подовжувала латентний період появи перших клонічних конвульсій на 5 діб. Тому з 9 доби до кінця досліду відмінності між контролем і групою сполуки 78553 були статистично значущими. На 13 добу кількість мишей з судомами на тлі сполуки 78553 була достовірно меншою, ніж на тлі вальпроату натрію. Протисудомні властивості останнього на моделі кіндлінгу виражені досить слабо. Зменшення кількості тварин з судомами набувало значущого рівня відносно контрольного значення лише на 15 день.

Як видно з рисунку 2, досліджувана сполука достовірно збільшила загальну кількість днів без судом відносно як контролю, так і препарату порівняння. Вальпроат натрію не змінював цей показник, який дорівнював контрольному значенню, що, можливо, зумовлено розвитком звикання.

Рисунок 3 свідчить, що на останню добу дослідження в деяких тварин усіх груп розвинулися клонічні та тонічні судоми. У контролі спостерігали достовірно більше мишей з клонічними судомами відносно групи тварин, що отримували досліджувану речовину. Відсоток мишей, які не мали судом, у групах сполуки 78553 та вальпроату натрію був статистично значуще більшим за такий у контролі.

Отже, на моделі хронічного епілептогенезу виявлено високу протисудомну ефективність нового похідного піразоло[3,4-D]піридину – 1-(4-мето-

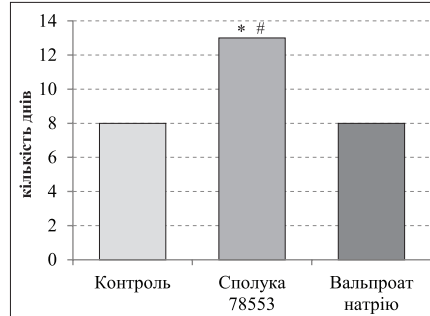


Рис. 2. Кількість днів без судом в експериментальних групах на моделі пентилентетразолового кіндлінгу під впливом сполуки 78553 та вальпроату натрію

Примітка. Статистично значущі відмінності: * відносно контролю ($p < 0,05$); # відносно групи вальпроату натрію ($p < 0,05$).

ксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-ону, яке належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини). Ці результати обґрунтовують доцільність подальших досліджень 1-(4-метокси-феніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-ону з метою розробки нового ПЕП.

Висновки

1. 1-(4-Метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-он (1000–5000 мг/кг) при одноразовому введенні в шлунок не спричиняє загибель мишей та не викликає ознак інтоксикації. Сполука належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

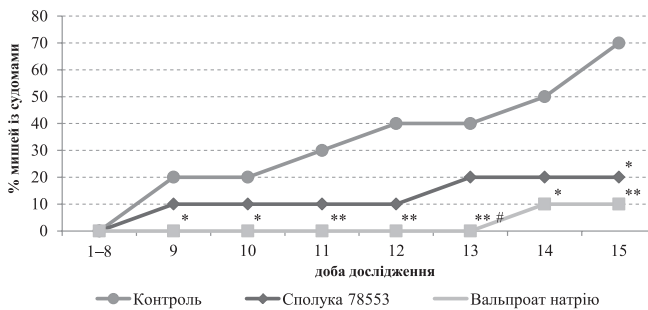
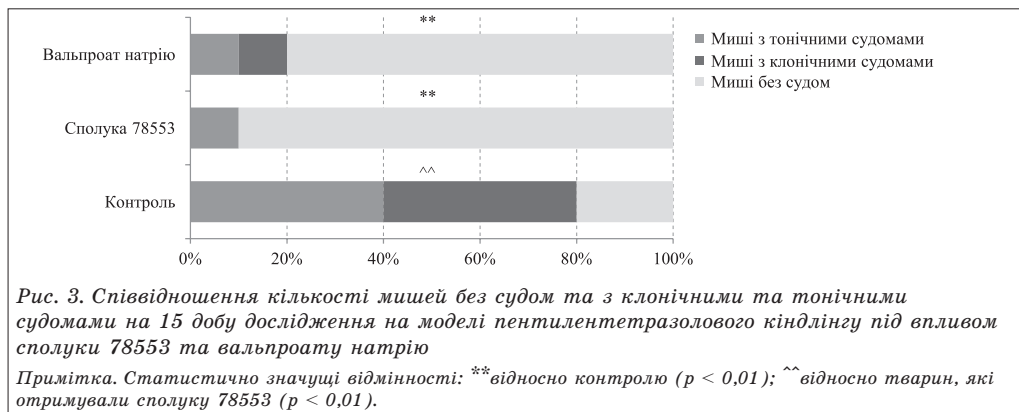


Рис. 1. Динаміка протисудомної активності сполуки 78553 та вальпроату натрію за умов пентилентетразолового кіндлінгу

Примітка. Статистично значущі відмінності відносно контролю: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; # відносно групи вальпроату натрію ($p < 0,05$).



2. На моделі пентилентетразолового кіндлінгу виявлено, що 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-

4-он (200 мг/кг) має здатність ефективніше за вальпроат натрію (300 мг/кг) попереджувати розвиток судом за умов експериментального хронічного епілептогенезу в мишей.

1. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline / B. P. Hermann, M. Seidenberg, E. J. Lee [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – V. 13. – P. 12–20.
2. Willie's Treatment of Epilepsy. Principles and Practice / E. Wyllie, G. D. Cascino, B. E. Gidal, H. P. Goodkin // Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. – 2011. – 5b Ed. – 1040 p.
3. Neurocognitive effects of brivaracetam, levetiracetam, and lorazepam / K. J. Meador, A. Gevins, P. T. Leese [et al.] // Epilepsia. – 2011. – V. 52, N 2. – P. 264–272.
4. 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. Kavrayskiy // Der Pharma Chemica J. – 2015. – V. 7, № 11. – P. 43–48.
5. Патент UA 103378 на кор. модель, МПК (2015.01) А61К31/505 (2006.01) А61Р 21/00 / 5-R-1- арил-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-онів, що виявляють протисудомну активність / Г. І. Северіна, Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. А. Георгіянц. – Власник Національний фармацевтичний університет – № u2015 06663, заявл. 06.07.2015; опубл. 10.12.2015; Бюл. № 23. – 6 с.
6. Експериментальне визначення спектру протисудомної дії нових похідних піразоло[3,4-d]піримідин-4- ону / Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. А. Георгіянц, Г. І. Северіна // Science-Rise J. – 2016. – № 1 (1). – С. 10–17.
7. The kindling model of epilepsy: a critical review / McNamara J. O., Bonhaus D. W., Shin C. [et al.] // CRC Crit. Rev. Clin. Neurobiol. – 1985. – V. 1. – P. 341–391.
8. Шандра А. А. Кіндлинг и эпилептическая активность / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. – Одесса : Атсропринт, 1999. – 270 с.
9. Головенко М. Я. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: метод. рекомендації / М. Я. Головенко, Л. О. Громов. – Київ : ВД «Авіцена», 2003. – 26 с.
10. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідях // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
11. Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ, ВД «Авіцена», 2001 – 528 с.
12. Експериментальне визначення спектру протисудомної дії перспективних антиконвульсантів рослинного походження / В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Ю. С. Прокопенко, Е. Л. Торянік // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 3 (32). – С. 45–49.
13. Пошук нових протисудомних лікарських засобів серед похідних 1,3,4-оксадіазолу / Т. Л. Рибальченко, С. Ю. Штриголь, В. А. Георгіянц [та ін.] // Фармаком. – 2013. – № 4. – С. 79–87.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
15. Штриголь С. Ю. Модуляція фармакологічних ефектів при різних солевих режимах / С. Ю. Штриголь. – Харьков : Ависта-ВЛТ, 2007. – 360 с.
16. Hodge H. C. Tabulation of toxicity classes / H. C. Hodge, L. H. Sterner // Am. Industr. Hyg. Ass. Quart. – 1943. – V. 10, № 4. – P. 93.

Д. П. Каврайський, С. Ю. Штриголь, В. В. Цивунін, В. А. Георгіянц
Гостра токсичність та ефективність 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-ону на моделі пентилентетразолового кіндлінгу в мишей

Мета дослідження – визначити клас токсичності та протіепілептичний потенціал нового похідного піразоло[3,4-D]піридину – 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-

оксоетил)-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-ону (лабораторний шифр 78553) у максимальній ефективній дозі 200 мг/кг за здатністю пригнічувати епілептогенез в умовах пентилентетразолового кіндлінгу. Для визначення гострої токсичності досліджувану сполуку вводили мишам внутрішньошлунково в дозах 1000, 2500, 4000 та 5000 мг/кг. На моделі кіндлінгу сполуку 78553 та референс-препарат вальпроат натрію (300 мг/кг) вводили в шлунок за 30 хв перед щоденною внутрішньоочеревинною ін'єкцією водного розчину пентилентетразолу в підпороговій дозі 30 мг/кг. Експеримент тривав 15 діб.

1-(4-Метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-он належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини, LD₅₀ > 5000 мг/кг), а на моделі хронічного епілептогенезу має високу протисудомну ефективність, достовірно збільшуючи латентний період появи перших судом на 5 діб, а також значно зменшуючи кількість тварин з судомами. Вальпроат натрію виявився менш ефективним: не вплинувши на латентний період, він лише зменшив кількість мишей із судомними нападами.

Ключові слова: похідні піразоло[3,4-D]піридин-4-ону, протисудомні засоби, кіндлінг

Д. П. Каврайский, С. Ю. Штрыголь, В. В. Цывунин, В. А. Георгианц
Острая токсичность и эффективность 1-(4-метоксифенил)-5-{2-[4-(4-метоксифенил)пиперазин-1-ил]-2-оксоэтил}-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4 D] пиридин-4-она на модели пентилентетразолового киндлинга у мышей

Цель исследования – определить класс токсичности и противозепилептический потенциал нового производного пиразоло[3,4-D]пиридина – 1-(4-метоксифенил)-5-{2-[4-(4-метокси-фенил)пиперазин-1-ил]-2-оксоэтил}-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4-D]пиридин-4-она (лабораторный шифр 78553) в максимально эффективной дозе 200 мг/кг по способности подавлять эпилептогенез в условиях пентилентетразолового киндлинга. Для определения острой токсичности исследуемое соединение вводили мышам внутрижелудочно в дозах 1000, 2500, 4000 и 5000 мг/кг. На модели киндлинга соединение 78553 и референс-препарат вальпроат натрия (300 мг/кг) вводили в желудок за 30 мин до ежедневной внутривентриальной инъекции водного раствора пентилентетразола в подпороговой дозе 30 мг/кг. Эксперимент длился 15 суток.

1-(4-Метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метокси-феніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-он относится к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества, LD₅₀ > 5000 мг/кг), а на модели хронического эпилептогенеза проявляет высокую противосудорожную эффективность, достоверно увеличивая латентный период появления первых судорог на 5 суток, а также значительно уменьшая количество животных с судорогами. Вальпроат натрия оказался менее эффективным: не повлияв на латентный период, он только уменьшил количество мышей с судорожными припадками.

Ключевые слова: производные пиразоло[3,4-D]пиридин-4-она, противосудорожные средства, киндлинг

D. P. Kavraiskiy, S. Yu. Shtrygol', V. V. Tsyvunin, V. A. Georgiyants
Acute toxicity and efficiency of 1-(4-metoxyphenyl)-5-{2-[4-(4-metoxyphenyl) piperazine-1-yl]-2-oxoethyl}-1,5-dihydro-4H-pyrazole[3,4-D]pyridine-4-one on pentylenetetrazol kindling model in mice

The purpose of the study – identify toxicity class and potential of novel antiepileptic pyrazolo[3,4-D]pyridine derivative – 1-(4-metoxyphenyl)-5-{2-[4-(4-metoxyphenyl) piperazine-1-yl]-2-oxoethyl}-1,5-dihydro-4H-pyrazole[3,4-D]pyridine-4-one (laboratory code number 78553) in the most effective dose 200 mg/kg for the ability to prevent epileptogenesis in a pentylenetetrazol kindling. To determine the acute toxicity compound was administered intragastrically to mice in doses 1000, 2500, 4000 and 5000 mg/kg. Compound 78553 and the reference drug sodium valproate (300 mg/kg) were administered daily 30 minutes before pentylenetetrazole injection (i.p.) in an aqueous solution in sub-threshold dose of 30 mg/kg on kindling model. The experiment lasted 15 days.

1-(4-Метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-D]піридин-4-он належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини (LD₅₀>5000 мг/кг). Сполука 78553 має продемонструвати високу антиконвульсантну ефективність на хронічному епілептогенезі моделі, значно збільшуючи латентний період судом на 5 діб, а також значно зменшуючи кількість тварин з судорогами. Натрієвий вальпроат виявився менш ефективним: не вплинувши на латентний період, він лише зменшив кількість мишей із судорожними нападами.

Key words: derivative of pyrazolo[3,4-D]pyridine, anticonvulsant drug, kindling

Надійшла: 5 серпня 2016 р.

Контактна особа: Каврайський Дмитро Павлович, аспірант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 057 706 30 69. Електронна пошта: kavraiskiy@gmail.com

С. І. Мироненко, О. Р. Піняжко, Р. Б. Лесик

Вплив оригінальних похідних 4-тіазолідинону: Les-1205 та Les-2658, леветирацетаму та діазепаму на поведінку умовно-рефлекторного активного уникнення в щурів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: умовно-рефлекторна поведінка активного уникнення, 4-тіазолідинони, леветирацетам, діазепам

За результатами віртуального (оцінка 2D подібності з використанням спеціалізованого софту PASS C&T) та первинного фармакологічного (дослідження за умов максимального електрошоку (MES), модель пентилентетразолових (ПТЗ, коразолових) судом, (scMET-тест)) скринінгу протисудомної активності комбінаторної бібліотеки оригінальних похідних 4-тіазолідинону ідентифіковано сполуки-лідери Les-2658 та Les-1205, які виявляють протисудомну дію, еквівалентну референс-препарату сибазону, та характеризуються високою протисудомною активністю за умов моделювання ПТЗ-кіндлінгу в щурів як на етапі формування кіндлінгу, так і на фоні сформованих генералізованих кіндлінгових судом [1–3]. Зважаючи на протисудомний спектр ефектів зазначених сполук, а також низькі параметри гострої (IV клас токсичності за класифікацією К. К. Сидорова) та нейротоксичності (за умов ротород-тесту, ММІ), обґрунтованим є вивчення впливу похідних Les-2658 та Les-1205 на когнітивні функції на експериментальних моделях. Також додатковим аргументом для такого дослідження є відсутність інформації щодо виконання подібних експериментів для похідних 4-тіазолідинону в науковій літературі.

Мета дослідження – вивчення впливу сполук Les-1205 та Les-2668 на показники навчання в тесті умовно-рефлекторного активного уникнення (УРАУ) та проведення порівняльної оцінки з ефектами леветирацетаму

(ЛІВР) – протисудомного препарату, який не пригнічує когнітивну функцію [4], а також діазепаму, який викликає гальмівний вплив на формування активного уникнення в інтактних щурів [5].

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження виконано в умовах гострого експерименту на щурах-самцях (кількість 90) лінії Вістар масою 180–250 г, що утримувались за стандартних умов на базі віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

На моделі УРАУ (подразнення електричним струмом на електродній підлозі) вивчали ефекти похідних 4-тіазолідинону Les-1205 та Les-2658. Тестовані сполуки застосовували в двох дозах – 50,0 та 100,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно за 30 хв до проведення УРАУ.

Перед формуванням УРАУ всіх щурів попередньо тестували для визначення їхньої здатності до навчання. Визначення щурів, які характеризувалися низькою здатністю до навчання, проводили за допомогою тестування в човниковій камері, яка містила два однакових відсіки з електродною підлогою, розділеною навпіл перегородкою з отвором, за методикою вироблення умовного рефлексу активного уникнення [6]. Безумовне аверсивне подразнення шкіри лап експериментальних тварин електричним струмом проводили після попереднього впливу умовного подразника, яким був звук фоностимулятора («DX-системи», Харків) тривалістю 4 с. Для електричного подразнення використовували електричний струм частотою 50 Гц, силою від 0,5 до 1,0 мА. При індивідуальному визначенні сили струму орієнтувалися на виникнення вокалізації та відсмикування кінцівок

з відповідним руховим патерном. Інтервал між поданням умовного подразника та електрошкірним подразненням складав 2 с; максимальна тривалість кожного електрошкірного подразнення складала 4 с; інтервал між послідовними умовно-рефлекторними подразниками складав 20 с.

Умовний рефлекс вважали завершеним, коли експериментальна тварина переходила в суміжний відсік камери протягом 6 с після подання умовно-рефлекторного подразника. У кожного щура УРАУ виробляли протягом 4 діб 30-разовим поєднанням умовного та безумовного подразників щодобово. За критерій низької здатності до навчання було обрано неспроможність демонструвати більше 10 (з 30) виконань УРАУ, яка була визначена в 20 % щурів, їх вибраковували та не використовували в подальших спостереженнях. Як інформативні показники динаміки формування УРАУ у щурів визначали число уникнень, а також латентний період уникнення [6–8]. Крім того, у групах щурів також визначали збереження навички УРАУ через 5 діб після останнього сеансу навчання.

ЛВР (УСВ, Бельгія), вводили внутрішньоочеревинно в дозах 15,0 та 50,0 мг/кг за 30 хв до тестування. Діазепам («Здоров'я народу», ХФП, ВАТ, м. Харків, Україна) вводили внутрішньоочеревинно в дозах 0,1 та 0,5 мг/кг за 30 хв до тестування. Щурам групи контролю за тих самих умов застосовували розчин «Твін-80».

Достовірність результатів досліджень визначали з використанням статистичного методу однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та критерію Newman-Keuls. Відмінності вважалися достовірними при $P \leq 0,05$. Усі експериментальні процедури виконували згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідках» і Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та з іншими науковими цілями, та ін. законодавчими актами, що регулюють дослідження на лабораторних тваринах [9–11], та схвалені комісією з питань біоетики при Львівському національному медичному

університеті імені Данила Галицького (протокол від 20 січня 2014 р. № 1).

Результати та їх обговорення. Дизайн експерименту включав наступні етапи:

1) дослідження показників числа відтворених УРАУ та динаміки тривалості латентного періоду УРАУ в процесі навчання щурів за різних умов застосування досліджуваних сполук та препаратів порівняння;

2) дослідження відтворення навички УРАУ (показників числа відтворених УРАУ та тривалості латентного періоду їхнього виникнення) після п'ятидобової перерви в групах щурів за умов застосування досліджуваних сполук та препаратів порівняння.

При виконанні першої частини дослідження встановлено, що в групі контролю чотиридобове навчання супроводжувалося збільшенням числа відтворених УРАУ з ($17,5 \pm 1,0$) на першу добу до ($21,7 \pm 1,7$) наприкінці навчання (на 14,0 %) ($P < 0,05$) (рис. 1).

Застосування похідного Les-1205 у дозі 50,0 мг/кг супроводжувалося збільшенням числа відтворених УРАУ у першу добу навчання, і число відтворених реакцій перевищувало на 14,4 % показник у групі контролю ($P < 0,05$), а в дозі 100,0 мг/кг аналогічний показник на другу добу достовірно ($P < 0,05$) перевищував значення в групі контролю на 15,4 % (рис. 1, II та III). У той час при застосуванні сполуки Les-2668 в обох досліджуваних дозах (50,0 та 100,0 мг/кг) спостерігали незначне зростання числа відтворених УРАУ, і наприкінці спостереження (4 доба) число відтворених реакцій перевищувало відповідне значення в групі контролю на 5,4 % ($P > 0,05$) та на 10,0 % ($P > 0,05$) відповідно (рис. 1, IV та V).

При застосуванні ЛВР у дозі 15,0 мг/кг число відтворених УРАУ на першу та другу добу навчання перевищувало показники в групі контролю відповідно на 17,4 % ($P < 0,05$) та на 14,7 % ($P < 0,05$) (рис. 1, VI). При застосуванні більшої дози ЛВР також спостерігали тенденцію до підвищення зазначеного показника, на четверту добу спостереження він перевищував значення групи контролю на 10,7 % ($P > 0,05$) (рис. 1, VII).

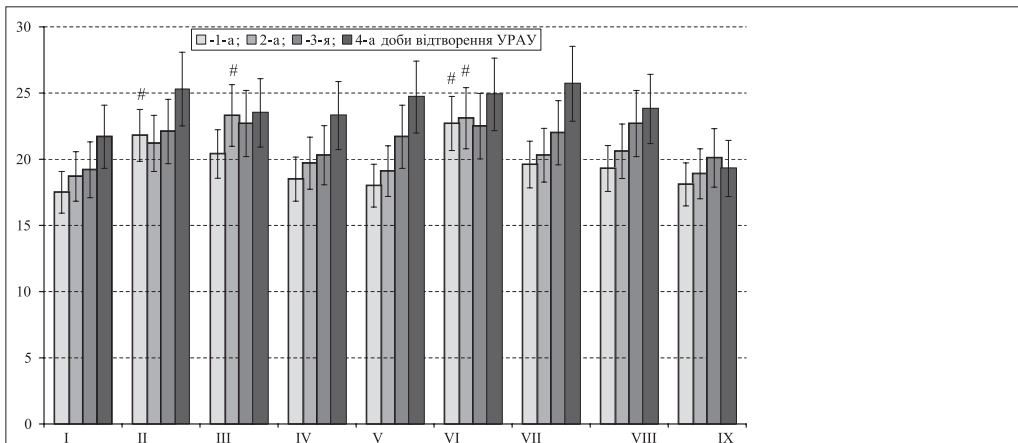


Рис. 1. Число відтворених умовно-рефлекторних реакцій активного уникнення під впливом досліджуваних сполук

Примітка. Тут і на рис. 2: Позначки: по вісі абсцис: I – контроль; II та III – сполука Les-1205 у дозах 50,0 та 100,0 мг/кг; IV та V – сполука Les-2668 у дозах 50,0 та 100,0 мг/кг; VI та VII – леветирацетам у дозах 15,0 та 50,0 мг/кг; VIII та IX – діазепам у дозах 0,1 та 0,5 мг/кг відповідно; по вісі ординат: число відтворених УРАУ; #P < 0,05 порівняно з відповідним показником у групі контролю (тест ANOVA + критерій Newman-Keuls).

На фоні застосування діазепаму в дозі 0,1 мг/кг аналогічні показники мали незначну тенденцію до збільшення порівняно з групою контролю (P > 0,05) (рис. 1, VIII). Однак застосування діазепаму в дозі 0,5 мг/кг викликало протилежну за характером динаміку, і на четверту добу навчання число відтворених УРАУ було на 8,0 % меншим, ніж у групі контролю (P > 0,05) (рис. 1, IX).

При дослідженні динаміки латентного періоду виникнення УРАУ встановлено, що зазначений показник у групі контролю становив (131,5 ± 9,2) с у першу добу і скорочувався на 10,6 % – до (117,6 ± 7,5) с у четверту добу навчання (P > 0,05) (рис. 2).

При застосуванні похідного Les-1205 у дозі 50,0 мг/кг спостерігали зменшення латентного періоду, і наприкінці спостереження (4 доба) його тривалість була на 16,6 % меншою (98,1 ± 5,7) с порівняно з такою у групі контролю (P < 0,05) (рис. 2, II). У той самий час за умов застосування Les-1205 у дозі 100,0 мг/кг латентний період УРАУ був меншим порівняно з показником групи контролю в усі дні навчання, і його скорочення на першу та четверту добу складало 20,0 % (P < 0,05) та 24,1 % (P < 0,05) відповідно (рис. 2, III). При застосуванні сполуки Les-2668 у дозі 50,0 мг/кг латентний період УРАУ на третю та четверту добу навчання був

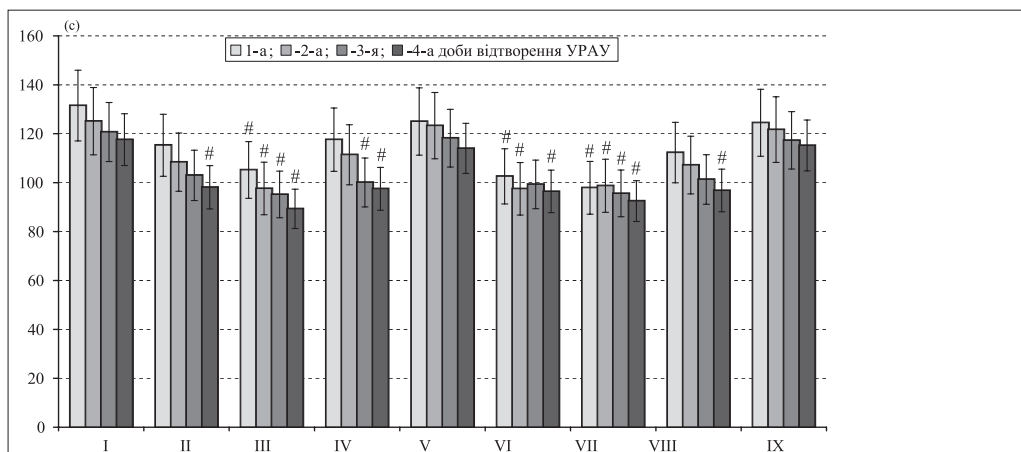


Рис. 2. Динаміка латентного періоду умовно-рефлекторних реакцій активного уникнення за умов застосування досліджуваних сполук

меншим на 17,1 та на 18,1 % відповідно ($P < 0,05$) (рис. 2, IV). Однак введення тваринам похідного Les-2668 у дозі 100,0 мг/кг практично не впливало на значення досліджуваного показника, який на четверту добу навчання був меншим порівняно з контролем на 3,1 % ($P > 0,05$) (рис. 2, V).

Латентний період УРАУ на фоні застосування ЛВР в обох досліджуваних дозах достовірно ($P < 0,05$) скорочувався порівняно з контролем протягом усього періоду спостереження. Так, наприкінці навчання (4 доба) даний показник при застосуванні ЛВР у дозах 15,0 та 100,0 мг/кг був меншим порівняно з контролем на 19,1 та 21,1 % відповідно (рис. 2, VI та VII). Застосування діазепаму в дозі 0,1 мг/кг супроводжувалося тенденцією до скорочення тривалості латентного періоду УРАУ, і наприкінці навчання цей показник був меншим на 17,7 % ($P < 0,05$) (рис. 2, VIII) порівняно з контролем, тоді як при застосуванні в дозі 0,5 мг/кг на 4 добу спостерігали зменшення лише на 2,0 % ($P > 0,05$) щодо контрольної групи (рис. 2, IX).

Таким чином, сполука Les-1205 в обох тестованих дозах (50,0 та 100,0 мг/кг) демонструє позитивний вплив на стадії навчання тварин і сприяє підвищенню відтворюваності УРАУ та скороченню латентного періоду реакції уникнення. У той час, похідне Les-2668 є ефективним лише в дозі 50,0 мг/кг і спричиняє тільки скорочення латентного періоду УРАУ.

Наступним етапом експерименту було дослідження відтворення навички УРАУ (показників числа відтворених УРАУ та латентного періоду УРАУ) після п'ятидобової перерви. Встановлено, що в групі щурів, яким вводили сполуку Les-1250 у дозі 100,0 мг/кг, латентний період виникнення УРАУ був меншим порівняно з таким у групі контролю на 24,2 % ($P < 0,01$) (таблиця). У групі щурів, яким було застосовано ЛВР у дозі 50,0 мг/кг, спостерігали достовірне ($P < 0,05$) збільшення числа відтворених УРАУ на 25,4 % та скорочення латентного періоду на 20,1 % ($P < 0,05$) (таблиця). У всіх групах, крім щурів, яким застосовували діазепам у дозі 0,5 мг/кг, число відтворених УРАУ було вищим, а його латентний період меншим порівняно з відповідними показниками в групі контролю (таблиця).

Таким чином, сполука Les-1205 при застосуванні в дозі 100 мг/кг демонструє ефект, еквівалентний дії ЛВР у дозі 50,0 мг/кг за показниками числа відтворених УРАУ та динамікою латентного періоду їхнього виникнення після п'ятидобової перерви.

Отримані результати вивчення похідних 4-тіазолідинону Les-1205 та Les-2568 демонструють подібність профілю дії до леветирацетаму – єдиного антиконвульсанта, який не знижує когнітивну функцію [4], та свідчать про перспективність та доцільність поглиблених досліджень.

Таблиця

Число відтворених умовно-рефлекторних реакцій активного уникнення та тривалість латентного періоду їхнього виникнення після п'ятидобової перерви

Група	Кількість щурів у групі	Число відтворених УРАУ	Латентний період УРАУ, с
Контроль	10	19,3 ± 1,5	129,6 ± 8,9
Les-1250 (50,0 мг/кг)	11	23,7 ± 1,8	105,8 ± 7,7
Les-1250 (100,0 мг/кг)	12	21,7 ± 1,4	98,2 ± 6,5**
Les-2668 (50,0 мг/кг)	10	21,9 ± 1,2	113,3 ± 8,2
Les-2668 (100,0 мг/кг)	10	22,2 ± 1,6	123,5 ± 9,3
Леветирацетам (15,0 мг/кг)	9	23,5 ± 1,3	108,4 ± 5,5
Леветирацетам (50,0 мг/кг)	9	24,2 ± 1,5*	103,5 ± 6,0*
Діазепам (0,1 мг/кг)	10	20,9 ± 1,5	110,7 ± 8,3
Діазепам (0,5 мг/кг)	9	18,6 ± 0,9	132,8 ± 10,7

Примітка. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно до показника в групі контролю (тест ANOVA + критерій Newman-Keuls).

Висновки

1. При дослідженні впливу оригінальних похідних 4-тіазолідину Les-1205 та Les-2668 на показники навчання в тесті умовно-рефлекторного активного уникнення (УРАУ) встановлено, що тестовані сполуки демонструють позитивний вплив на стадії навчання тварин і спричиняють підвищення відтворюваності

УРАУ та скорочення тривалості латентного періоду реакцій уникнення, а також сприяють збереженню навички після перерви в навчанні.

2. За результатами експерименту визначено, що сполука Les-1205 при застосуванні в дозі 100 мг/кг демонструє ефект, еквівалентний дії протисудомного препарату леветирацетаму в дозі 50,0 мг/кг за всіма досліджуваними параметрами.

1. Мироненко С. І. Скринінг сполук з протисудомною активністю серед похідних 4-тіазолідину / С. І. Мироненко, О. Р. Піняжко, Р. Б. Лесик // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 4–5 (45). – С. 33–38.
2. Мироненко С. І. Динаміка кіндлінг-провокованих судом у щурів за умов застосування похідних 4-тіазолідину та діазепаму / С. І. Мироненко, О. Р. Піняжко // Досягнення біології та медицини. – 2015. – № 1. – С. 63–67.
3. Пошук нових антиконвульсантних агентів в ряду 4-тіазолідинів та споріднених гетероциклічних систем / С. І. Мироненко, Д. В. Камінський, І. О. Нектегаєв [та ін.] // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація. – 2012. – № 1–2. – С. 124–131.
4. Neurocognitive effects of brivaracetam, levetiracetam, and lorazepam / K. J. Meador, A. Gevins, P. T. Leese [et al.] // *Epilepsia*. – 2011. – V. 52, № 2. – P. 264–272.
5. The effects of flumazenil on two way active avoidance and locomotor activity in diazepam-treated rats / T. Celiik, T. Deniz, T. Uzday, H. Ayhan // *European Neuropsychopharmacology*. – 1999. – V. 9, № 1–2. – P. 45–50.
6. Влияние буфотина и гутимины на выработку и сохранность условного рефлекса активного избегания у крыс линии Wistar / А. А. Миронов, В. Н. Крылов, И. В. Мухина, О. П. Тихобразова // *Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского*. – 2007. – № 6. – С. 124–128.
7. Выработка реакции активного избегания у крыс и морфологические изменения в гиппокампе при пентилентетразоловом киндлинге / А. Б. Гехт, Н. В. Гуляева, М. Ю. Степаничев, Т. В. Павлова // *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*. – 2009. – № 2. – С. 213–220.
8. Effect of age on pentylenetetrazol-kindling and kindling-induced impairments of learning performance / G. Grecksch, A. Becker, C. Rauca // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1997. – № 56 (4). – P. 595–601.
9. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. — 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
10. Закон України. Про захист тварин від жорстокого поводження [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006. – Режим доступу: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose. – Strasburg, Council of Europe, Publication and Documents Division. – Printed in France. – Edition November, 1987.

С. І. Мироненко, О. Р. Піняжко, Р. Б. Лесик

Вплив оригінальних похідних 4-тіазолідину: Les-1205 та Les-2658, леветирацетаму та діазепаму на поведінку умовно-рефлекторного активного уникнення в щурів

Мета дослідження – вивчення впливу сполук Les-1205 та Les-2668 на показники навчання в тесті умовно-рефлекторного активного уникнення (УРАУ) та проведення порівняльної оцінки з ефектами леветирацетаму та діазепаму.

У роботі використано оригінальні похідні 4-тіазолідину Les-1205 та Les-2668, леветирацетам (UCB, Бельгія), діазепам («Здоров'я народу», ХФП, ВАТ, м. Харків, Україна).

У результаті експериментального дослідження впливу оригінальних похідних 4-тіазолідину на показники навчання в тесті УРАУ порівняно з референс-препаратами леветирацетамом та діазепамом встановлено, що сполука Les-1205 в обох тестованих дозах (50,0 та 100,0 мг/кг) демонструє позитивний вплив на стадії навчання тварин і спричиняє підвищення відтворюваності УРАУ та скорочення латентного періоду реакцій уникнення. Похідне Les-2668 є ефективним лише в дозі 50,0 мг/кг і спричиняє тільки скорочення латентного періоду УРАУ. Також сполука Les-1205 у дозі 100 мг/кг демонструє ефект, еквівалентний дії леветирацетаму в дозі 50,0 мг/кг за показниками числа відтворених УРАУ та динамікою тривалості латентного періоду їх виникнення після п'ятидобової перерви.

Встановлено, що тестовані похідні 4-тіазолідину демонструють позитивний вплив на стадії навчання тварин, спричиняють підвищення відтворюваності УРАУ та скорочення латентного періоду реакцій

уникнення, а також збереження навички після перерви в навчанні. За результатами експерименту визначено, що сполука Les-1205 у дозі 100 мг/кг демонструє ефект, еквівалентний леветирацетаму в дозі 50,0 мг/кг за всіма досліджуваними параметрами, і є перспективною для поглиблених досліджень.

Ключові слова: умовно-рефлекторне активне уникнення, 4-тіазолідинони, леветирацетам, діазепам

С. І. Мироненко, О. Р. Пиняжко, Р. Б. Лесык

Влияние оригинальных производных 4-тиазолидинона: Les -1205 и Les-2658, леветирацетама и диазепама на поведение условно-рефлекторного активного избегания у крыс

Цель исследования – изучение влияния соединений Les-1205 и Les-2668 на показатели обучения в тесте условно-рефлекторного активного избегания (УРАИ) и проведения сравнительной оценки с эффектами леветирацетама и диазепама.

В исследовании использованы оригинальные производные 4-тиазолидинона Les-1205 и Les-2668, леветирацетам (UCB, Бельгия), диазепам («Здоровье народа», ХФП, ОАО, г. Харьков, Украина).

В результате экспериментального исследования влияния оригинальных производных 4-тиазолидинона на показатели обучения в тесте УРАИ в сравнении с референс-препаратами леветирацетамом и диазепамом установлено, что соединение Les-1205 в обеих тестированных дозах (50,0 и 100,0 мг/кг) демонстрирует положительное влияние на стадии обучения животных, вызывает повышение воспроизводимости УРАИ и сокращение латентного периода реакций избегания. Производное Les-2668 является эффективным только в дозе 50,0 мг/кг и вызывает только сокращение латентного периода УРАИ. Также соединение Les-1205 в дозе 100 мг/кг демонстрирует эффект, эквивалентный действию леветирацетама в дозе 50,0 мг/кг по показателям числа воспроизведенных УРАИ и динамике длительности латентного периода их возникновения после пятисуточного перерыва.

Установлено, что тестированные производные 4-тиазолидинона демонстрируют положительное влияние на стадии обучения животных, вызывают повышение воспроизводимости УРАИ и сокращение латентного периода реакций избегания, а также сохранение навыка после перерыва в обучении. По результатам эксперимента установлено, что соединение Les-1205 в дозе 100 мг/кг демонстрирует эффект, эквивалентный леветирацетаму в дозе 50,0 мг/кг по всем исследуемым параметрам, и является перспективным для углубленных исследований.

Ключевые слова: условно-рефлекторное активное избегание, 4-тиазолидиноны, леветирацетам, диазепам

S. I. Myronenko, O. R. Pinjazko, R. B. Lesyk

The influence of original 4- thiazolidinone derivatives: Les-1205 and Les-2658, levetiracetam and diazepam on behaviour conditioned reflex active avoidance in rats

The purpose of research – studying the effects of compounds Les-1205 and Les-2668 on training indicators in the test conditioned reflex of active avoidance (CRAA) and comparative assessment with the effects of levetiracetam and diazepam.

There were used original 4-thiazolidinone derivatives Les-1205 and Les-2668, levetiracetam (UCB, Belgium), diazepam («Zdorov'jia Narodu» Ltd, Kharkov, Ukraine)

As a result of experimental research of the original 4-thiazolidinone derivatives influence on training indicators in the CRAA test in comparison with reference drugs levetiracetam and diazepam, it was found that the compound Les-1205 in both tested doses (50,0 and 100,0 mg/kg) demonstrated a positive effect on animals and caused an increase in the reproducibility of CRAA and reduce the latent period of avoidance reactions. While the derivative Les-2668 was effective only at a dose of 50,0 mg/kg and entailed only a reduction in the latent period of CRAA. It was established that compound Les-1205 in a dose of 100,0 mg/kg demonstrated the effect equivalent to the effect of levetiracetam in a dose of 50,0 mg/kg in terms of the number of reproduced CRAA and dynamics of the latent period of their occurrence after a five-day break.

It was established that tested 4-thiazolidinone derivatives demonstrate a positive impact on the animals, an increase the reproducibility of CRAA and reduction of latent period of avoidance reactions, as well as preservation skills after a break in studies. The tested compound Les-1205 in dose 100,0 mg/kg demonstrates the equivalent effect to levetiracetam in dose of 50,0 mg/kg for all studied parameters and is a promising molecule for in-depth research.

Key words: conditioned reflex of active avoidance, 4-thiazolidinones, levetiracetam, diazepam

Надійшла: 16 травня 2016 р.

Контактна особа: Мироненко С. І., Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, буд. 69, вул. Пекарська, м. Львів, 79010. Тел.: + 38 0 32 275 76 32.

Т. Д. Сліпченко, С. Ю. Штриголь, О. В. Кудіна,
А. В. Таран, О. А. Рубан

Порівняльне доклінічне дослідження психотропних властивостей препаратів шоломниці байкальської

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: препарати шоломниці байкальської, поведінкові реакції, анксиолітична дія

Останнім часом зростає попит на препарати рослинного походження. Їхній терапевтичний ефект забезпечують як індивідуальні речовини, так і комплекс сполук. Уміст окремих біологічно активних речовин (БАР) у рослинній сировині залежить від багатьох факторів, а на ефективність фітопрепаратів впливають численні чинники, у тому числі біофармацевтичні.

Шоломниця байкальська (ШБ) – *Scutellaria baicalensis Georgi* (родина Lamiales) – привертає увагу як перспективне джерело БАР. Кореневища та корені ШБ містять флавоноїди байкалін, байкалейн і вогонін, дубильні речовини, крохмаль, органічні кислоти. У народній і китайській медицині корінь ШБ здавна застосовували при гіпертонічній хворобі. Препарати з коренів ШБ чинять гіпотензивну, судинорозширювальну, спазмолітичну та седативну дію, перевершуючи за лікувальним ефектом корінь валеріани [1–3]. Зокрема, використовується настойка коренів ШБ [4]. Постає питання щодо розробки інших препаратів ШБ в інших лікарських формах. У ДП «ДНЦЛЗ» під керівництвом професора В. І. Литвиненка розроблено технологію отримання екстракту ШБ, яку впроваджено у промислове виробництво.

Мета дослідження – вивчення психотропних властивостей сухого екстракту коренів та кореневищ ШБ, таблеток, що його містять, подрібнених коренів та кореневищ ШБ та твердих желатинових капсул, до складу яких вони входять.

Матеріали та методи. Використовували сухий екстракт коренів та кореневищ ШБ (СЕШБ), таблетки, що його містять (умовна назва «Скутекс»), подрібнені корені та кореневища ШБ (ПККШБ) та тверді желатинові капсули, до складу яких вони входять (умовна назва «Скутелла»), отримані на кафедрі заводської технології ліків НФаУ. Склад лікарських форм описано в роботі [5].

Субстанція СЕШБ нерозчинна у воді (екстрагент – 70 % спирт). Таблетки «Скутекс» отримано методом волого гранулювання (зволжувач – розчин полівінілпіролідону; допоміжні речовини: крохмаль кукурудзяний, натрію кроскармелоза, целюлоза мікроталічна, лактози моногідрат (гранулак 200), аеросил, тальк та кальцію стеарат). ПККШБ є діючою речовиною капсул, отриманою методом вальцювання висушених коренів та кореневищ ШБ. Для отримання сипкої маси для інкапсулювання використовували кальцію стеарат, що дозволяє зберегти нативний комплекс БАР лікарської рослинної сировини.

У дослідженні використано 191 рандомбредну білу мишу (самців) масою 20–29 г, яких утримували в стандартних умовах віварію НФаУ при температурі 19–24 °С, вологості повітря не більше ніж 50 %, природному світловому режимі «день-ніч», у пластикових клітках, на стандартному харчовому раціоні. Дослідження виконано згідно з «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.) і «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1985 р.).

СЕШБ використано в дозах 25 мг/кг (6,75 мг/кг за байкаліном), 50 мг/кг (13,5 мг/кг за байкаліном), 75 мг/кг (20,25 мг/кг за байкаліном), ПККШБ – у дозах 87 мг/кг (6,75 мг/кг за байкаліном), 173 мг/кг (13,5 мг/кг за байкаліном) та 260 мг/кг (20,25 мг/кг за байкаліном). Таблетки «Скутекс» та капсули «Скутелла» застосовували в дозах 320 мг/кг (13,5 мг/кг за байкаліном) та 260 мг/кг (20,25 мг/кг за байкаліном) відповідно.

СЕШБ, ПККШБ, подрібнену таблеткову масу «Скутекс» та вміст капсул «Скутелла» розчиняли у воді та вводили мишам крізь зонд внутрішньо-шлунково в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси 1 раз на 1 день протягом 5 днів, востаннє за 30–60 хв до дослідю. Контрольним тваринам вводили аналогічний об'єм відстояної водогінної води. Препарат порівняння – «Білобіл» (KRKA, Словенія) у дозі 100 мг/кг, який розчиняли у воді та вводили в аналогічному режимі [6]. Усі поведінкові тести проводили послідовно, синхронно з відповідним контролем, оскільки

ефекти залежать від хронофармакологічного чинника.

Вивчення СЕШБ, ПККШБ, препаратів «Скутекс» та «Скутелла» та препарату порівняння на рухову, орієнтовно-дослідницьку діяльність та емоційні реакції мишей проводили за тестом «відкритого поля» [7].

Анксіолітичну дію оцінювали за тестом «піднесеного хрестоподібного лабіринту», який базується на униканні гризунами освітлених просторів [8].

Результати обробляли статистично за допомогою програми STATISTICA 8.0, оцінюючи достовірність відмінностей між групами порівняння за параметричним критерієм Стьюдента (t) у випадках нормального розподілу, непараметричним критерієм Манна-Уїтні (U) за його відсутності. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження СЕШБ у тесті відкритого поля наведено в таблиці 1. У дозі 25 мг/кг СЕШБ виявив слабку тенденцію до зниження всіх показників, у дозах 50 мг/кг та 75 мг/кг – на рівні

Таблиця 1

Показники тесту відкритого поля під впливом сухого екстракту шоломниці байкальської та препарату «Білобіл», $M \pm t$

Показник (за 3 хв)	Контроль (n = 8)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 6)	Сухий екстракт шоломниці байкальської		
			25 мг/кг (n = 6)	50 мг/кг (n = 6)	75 мг/кг (n = 6)
<i>Локомоторна активність</i>					
Перетнуті квадрати	50,9 ± 8,1	27,5 ± 19,4 (- 46,0)	37,8 ± 7,2 (- 25,7)	26,7 ± 11,1 (- 47,5)	27,3 ± 17,9 (- 46,3)
<i>Орієнтовно-дослідницька активність</i>					
Сійки	10,0 ± 4,2	2,5 ± 1,8 (- 75,0)	5,0 ± 2,3 (- 50,0)	3,3 ± 2,0 (- 67,0)	3,7 ± 2,18 (- 63,0)
Отвори	44,5 ± 8,9	26,2 ± 12,7 (- 41,2)	38,8 ± 9,0 (- 12,8)	30,0 ± 9,4 (- 32,6)	21,3 ± 15,0 (- 52,1)
Сума	54,5 ± 11,2	28,7 ± 14,7 (- 47,3)	48,8 ± 9,7 (- 10,5)	33,5 ± 11,8 (- 38,5)	25,0 ± 18,4 (- 54,1)
<i>Емоційні реакції</i>					
Болюси	2,1 ± 1,7	1,7 ± 1,9	2,5 ± 1,9	2,7 ± 1,8	1,3 ± 1,4
Уринації	0,8 ± 0,7	0 ± 0	0,17 ± 0,40	0,17 ± 0,40	0 ± 0
Грумінг	2,6 ± 0,9	0,7 ± 0,8	0,5 ± 0,8	1,5 ± 1,5	1,80 ± 0,98
Сума	5,4 ± 2,2	2,4 ± 2,0 (- 55,6)	3,17 ± 2,30 (- 41,3)	4,3 ± 3,7 (- 20,4)	3,2 ± 2,3 (- 40,7)
Сума активностей	108,6 ± 13,2	57,7 ± 33,0 (- 46,8)	84,8 ± 12,2 (- 21,9)	64,3 ± 21,0 (- 40,8)	55,3 ± 34,6 (- 49,1)

Примітка. У дужках – зміна показника у відсотках.

препарату порівняння. У дозах 50 та 75 мг/кг СЕШБ спостерігали тенденцію до зниження кількості перетнутих квадратів у 1,90 та 1,86 разу відповідно, вертикальних стійок у 3,0 та 2,7 разу відповідно та обстежених отворів у 1,5 та 2,1 разу відповідно порівнянно з контролем. У дозі 50 мг/кг СЕШБ зменшував сумарний показник емоційних реакцій у 1,3 разу, а в дозі 75 мг/кг – у 1,7 разу. Подібний ефект чинив «Білобіл». Зменшення показників емоційності свідчить про зростання стресостійкості, однак, відсутність статистично значущих відмінностей означає лише тенденцію до седативного впливу. Для подальших досліджень обрано дози 50 мг/кг і 75 мг/кг як найефективніші в тесті відкритого поля.

Ефекти ПККШБ у тесті відкритого поля наведено в таблиці 2. У дозі 87 мг/кг ПККШБ зменшував локомоторну активність статистично незначуще на 6 % відносно контролю, у дозі 173 мг/кг та 260 мг/кг виявляв тенден-

цію до її зменшення на 13,5 та 14,2 % відповідно. Цей показник під впливом Білобілу знизився в 1,5 разу статистично незначуще. ПККШБ зменшував орієнтовно-дослідницьку активність на 39–58 % відносно контролю зі зменшенням дози. Знижується тільки кількість стійок у найменшій дозі ПККШБ 87 мг/кг (на 86,5 %, $p < 0,05$). ПККШБ у середній дозі 173 мг/кг пригнічує емоційні реакції невірогідно на 74 %. Інші дози ПККШБ (87 та 260 мг/кг) зменшують зазначений показник на 61,1 та 55,8 % відповідно, також статистично незначуще, як і препарат порівняння (на 71,8 %). Отже, ПККШБ у дозах 87 мг/кг, 173 мг/кг, 260 мг/кг та препарат порівняння слабо впливають на показники тесту відкритого поля, виявляючи лише тенденцію до седативної дії.

Результати дослідження впливу таблеток «Скутекс» на показники тесту відкритого поля наведено в таблиці 3. Скутекс достовірно збільшував локомо-

Таблиця 2

Показники тесту відкритого поля під впливом порошку коренів та кореневищ шоломниці байкальської та препарату «Білобіл», $M \pm m$

Показник (за 3 хв)	Контроль (n = 8)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 7)	Порошок коренів та кореневищ шоломниці байкальської		
			87 мг/кг (n = 7)	173 мг/кг (n = 7)	260 мг/кг (n = 7)
<i>Локомоторна активність</i>					
Перетнуті квадрати	45,1 ± 6,2	29,4 ± 13,2 (- 34,8)	42,4 ± 3,7 (- 6,0)	39,0 ± 4,5 (- 13,5)	38,7 ± 4,3 (- 14,2)
<i>Орієнтовно-дослідницька активність</i>					
Сійки	9,6 ± 3,2	2,8 ± 1,3 (- 70,8)	1,3 ± 0,5* (- 86,5)	2,4 ± 1,2 (- 75,0)	3,7 ± 1,8 (- 61,5)
Обстежені отвори	48,1 ± 9,1	22,2 ± 9,4 (- 53,8)	23,1 ± 3,8 (- 52,0)	32,3 ± 3,6 (- 32,8)	31,7 ± 3,6 (- 34,1)
Сума	57,7 ± 10,3	25,0 ± 14,7 (- 56,7)	24,4 ± 3,8 (- 57,7)	34,7 ± 3,4 (- 40,0)	35,4 ± 3,7 (- 38,6)
<i>Емоційні реакції</i>					
Болюси	2,2 ± 1,4	0,57 ± 0,20	0,86 ± 0,46	1,0 ± 0,5	0,57 ± 0,20
Уринації	1,1 ± 0,8	0,28 ± 0,14	0,14 ± 0,14	0,14 ± 0,14	0,43 ± 0,30
Грумінг	2,2 ± 0,9	0,7 ± 0,6	1,14 ± 0,34	0,29 ± 0,18	1,43 ± 0,37
Сума	5,5 ± 2,2	1,55 ± 0,98 (- 71,8)	2,14 ± 0,59 (- 61,1)	1,43 ± 0,61 (- 74,0)	2,43 ± 0,61 (- 55,8)
Сума активностей	108,3 ± 11,6	56,0 ± 24,1 (- 48,3)	69,0 ± 6,5 (- 36,3)	76,6 ± 6,0 (- 29,3)	76,4 ± 8,3 (- 29,5)

Примітка. Тут і в табл. 4: *Статистично значущі відмінності з групою контролю ($p < 0,05$); у дужках – зміна показника у відсотках.

Показники тесту відкритого поля під впливом таблеток «Скутекс» та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm m$

Показник (за 3 хв)	Контроль (n = 6)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 6)	Скутекс, 320 мг/кг (n = 6)
<i>Локомоторна активність</i>			
Перетнуті квадрати	23,7 ± 5,9	21,0 ± 3,6 (- 11,4)	50,3 ± 10,8** [^] (+ 112,2)
<i>Орієнтовно-дослідницька активність</i>			
Сстійки	1,7 ± 1,0	0,7 ± 0,3 (- 58,8)	9,8 ± 3,6** [^] (+ 476,5)
Обстежені отвори	40,0 ± 6,2	18,3 ± 3,7* (- 54,3)	33,7 ± 4,9 [^] (- 15,8)
Сума	41,7 ± 6,8	19,0 ± 3,6* (- 54,4)	43,5 ± 4,7 [^] (+ 4,3)
<i>Емоційні реакції</i>			
Болюси	5,0 ± 0,7	2,0 ± 0,7*	0,2 ± 0,2** [^]
Уринації	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,2
Грумінг	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	1,2 ± 0,5
Сума	5,2 ± 0,8	2,3 ± 0,7* (- 55,8)	1,7 ± 0,4* (- 67,3)
Сума активностей	72,0 ± 11,1	42,3 ± 5,8* (- 41,3)	95,5 ± 12,9 [^] (+ 32,6)

Примітка. Статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): * з групою контролю, [^] з групою препарату порівняння «Білобіл»; у дужках – зміна показника у відсотках

торну активність мишей більше ніж у 2 рази відносно контролю та майже в 2,5 рази відносно групи препарату порівняння, який слабо впливав на цей показник.

Скутекс статистично значуще збільшував орієнтовно-дослідницьку активність у 5 разів та пригнічував емоційні реакції (кількість фекальних болюсів, сума показників емоційності) на рівні Білобілу. За сумою всіх видів активності, яка знизилася на 41,5 % ($p \leq 0,05$), Білобіл чинив пригнічувальний вплив на ЦНС на відміну від Скутекса, який виявив тенденційний стимулювальний ефект, збільшивши інтегральний показник на 32,6 %. Таким чином, Скутекс стимулює локомоторну активність та орієнтовно-дослідницьку діяльність, вибірково пригнічуючи емоційні реакції, що свідчить про вегетостабілізуючу дію на тлі стресової ситуації. Препарат порівняння «Білобіл» має виразний седативний ефект за критеріями редукції показників орієнтовно-дослідницької діяльності та емоційних реакцій.

Капсули «Скутелла» та препарат порівняння достовірного впливу на локомоторну активність не виявили (табл. 4). Препарат ШБ лише невірогідно зменшив усі показники як орієнтовно-дослідницької діяльності, так і емоційних реакцій. Капсули «Скутелла» тенденційно зменшили суму всіх видів активності на 22 %. Білобіл чинив седативний вплив, як і у вищеписаних дослідах. Отже, капсули «Скутелла» суттєво не впливають на показники тесту відкритого поля.

Дослідження тривожності тварин свідчить (табл. 5), що під впливом СЕШБ вірогідно підвищився латентний період входу до темної камери в 3,0 рази, збільшився в 3,5 рази час перебування в освітлених рукавах, зменшився в 1,3 рази час перебування в темних рукавах, що означає виразний анксиолітичний ефект. Білобіл не знижував тривожність тварин, оскільки вірогідної зміни основних її маркерів не спричинив, за виключенням зменшення в 3,0 рази суми показників емоційних реакцій. Отже, СЕШБ у

Показники тесту відкритого поля під впливом капсул «Скутелла» та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm m$

Показник (за 3 хв)	Контроль (n = 7)	Білобіл, 100 мг/кг, (n = 6)	Скутелла, 260 мг/кг, (n = 6)
<i>Локомоторна активність</i>			
Перетнуті квадрати	41,8 ± 3,2	31,3 ± 9,2 (- 25,1)	36,5 ± 3,1 (- 12,7)
<i>Орієнтовно-дослідницька діяльність</i>			
Стіжки	8,5 ± 3,0	2,1 ± 0,9 (- 75,3)	2,5 ± 1,1 (- 70,6)
Обстежені отвори	40,0 ± 6,4	22,5 ± 4,1* (- 43,8)	32,5 ± 4,2 (- 18,8)
Сума	48,5 ± 6,8	24,6 ± 3,6* (- 49,3)	35,0 ± 4,9 (- 27,8)
<i>Емоційні реакції</i>			
Болюси	3,0 ± 0,7	1,83 ± 0,70	1,0 ± 0,2
Уринації	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Грумінг	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3
Сума	3,3 ± 0,8	2,33 ± 0,80 (- 22,3)	1,5 ± 0,4 (- 54,5)
Сума активностей	93,6 ± 9,9	58,2 ± 8,7* (- 37,8)	73,0 ± 10,0 (- 22,0)

дозі 50 мг/кг виявляє виразну анксиолітичну активність у мишей, яка перевищує дію препарату порівняння «Білобіл».

У дозі 260 мг/кг ПККШБ вірогідно збільшує латентний період входу до темної камери в 6,5 разу, у дозі 173 мг/кг спостерігали тенденцію до його зростання (табл. 6). В обох дозах ПККШБ тенденційно збільшував час перебування в освітлених та скорочував перебування в темних рукавах. Це свідчить про тенденцію до протитривожної дії ПККШБ на відміну від Білобілу, який не змінює основні маркери тривожності. Також референс-препарат вірогідно знизив кількість відвідувань освітлених рукавів (у 4,6 разу), темних рукавів (у 3,0 разу) та центрального майданчика (у 10,0 разу), що означає зменшення рухової активності. Отже, на відміну від СЕШБ, ПККШБ в обох дозах виявляє лише тенденцію до анксиолітичної дії.

Під впливом Скутексу та препарату порівняння невірогідно збільшився латентний період входу до темної камери та зменшився час перебування в

освітлених рукавах (табл. 7). Скутекс на відміну від Білобілу збільшував час відвідувань освітлених рукавів, вірогідно стимулював (у 6,6 разу) відвідування центрального майданчика, посилював (у 3,5 разу) емоційні реакції. Це свідчить про тенденцію до протитривожної дії таблеток «Скутекс», відсутню в препараті порівняння.

Капсули «Скутелла» вірогідно збільшували латентний період входу до темної камери (у 8,8 разу), тенденційно збільшували час перебування в освітлених рукавах, знижували кількість відвідувань темних рукавів (табл. 8). Отже, капсули «Скутелла» мають помірну протитривожну активність. Білобіл в 3,3 разу зменшив лише кількість відвідувань темних рукавів.

Отже, різний прояв седативної та анксиолітичної дії препаратів ШБ залежить від біофармацевтичних чинників. Допоміжні речовини таблеток, імовірно, здатні зменшувати біодоступність БАР ШБ, про що свідчать слабкі психотропні властивості таблеток «Скутекс», хоча за дозами БАР (зокрема, байкаліну) вони відповідають СЕШБ.

Показники поведінки мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту за впливу сухого екстракту шоломниці байкальської та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm t$

Показник (за 5 хв)	Контроль (n = 8)	Сухий екстракт шоломниці байкальської, 50 мг/кг (n = 8)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 6)
Латентний період входу до темної камери, с	14,75 ± 6,84	46,00 ± 12,68 ^{^^}	16,17 ± 7,40
Час перебування в освітлених рукавах, с	27,63 ± 10,77	96,63 ± 21,01 ^{^^}	21,33 ± 6,55
Час перебування в темних рукавах, с	272,37 ± 10,77	203,37 ± 21,01 ^{^^}	278,67 ± 6,55
Кількість відвідувань освітлених рукавів	0,38 ± 0,18	1,25 ± 0,59	0,67 ± 0,33
Кількість відвідувань темних рукавів	2,63 ± 0,82	4,00 ± 0,96	1,67 ± 0,33
Кількість відвідувань центрального майданчика	1,38 ± 0,68	2,38 ± 0,98	0,67 ± 0,33
Емоційні реакції:			
болюси	2,38 ± 0,63	3,00 ± 0,94	1,0 ± 0,52
уринації	0,62 ± 0,26	0 ± 0*	0 ± 0
сума	3,0 ± 0,6	3,0 ± 0,94 [^]	1,0 ± 0,52*

Примітка. Тут і в табл. 6–8: Статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): *з показником контролю, ^з показником тварин, що отримували препарат «Білобіл».

Показники поведінки мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту за впливу порошку коренів та корневищ шоломниці байкальської та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm t$

Показник (за 5 хв)	Контроль (n = 8)	Порошок коренів та корневищ шоломниці байкальської		Білобіл, 100 мг/кг (n = 7)
		173 мг/кг (n = 6)	260 мг/кг (n = 7)	
Латентний період входу до темної камери, с	8,25 ± 3,43	17,83 ± 4,74	53,71 ± 25,96 ^{^^}	10,57 ± 4,25
Час перебування в освітлених рукавах, с	42,87 ± 12,47	90,33 ± 25,29 [^]	95,71 ± 38,95	24,86 ± 11,20
Час перебування в темних рукавах, с	257,10 ± 12,47	209,70 ± 25,29	204,30 ± 38,95	275,10 ± 11,20
Відвідувань освітлених рукавів	2,63 ± 0,80	2,33 ± 0,95	0,86 ± 0,86	0,57 ± 0,30*
Відвідувань темних рукавів	5,63 ± 1,22	5,33 ± 1,43 [^]	2,71 ± 1,23	1,86 ± 0,34*
Відвідувань центрального майданчика	3,0 ± 0,73	2,17 ± 0,60 [^]	1,29 ± 0,47 [^]	0,29 ± 0,29*
Емоційні реакції:				
болюси	1,63 ± 0,60	1,67 ± 0,67	1,0 ± 0,44	1,29 ± 0,42
уринації	0	0,17 ± 0,17	0,71 ± 0,42	0,29 ± 0,18
сума	1,63 ± 0,60	1,84 ± 0,65	1,71 ± 0,68	1,58 ± 0,37

Таблиця 7

Показники поведінки мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту за впливу таблеток «Скутекс» та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm t$

Показник (за 5 хв)	Контроль (n = 6)	Скутекс, 320 мг/кг (n = 6)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 5)
Латентний період входу до темної камери, с	13,67 ± 4,97	25,67 ± 14,02	34,80 ± 22,08
Час перебування в освітлених рукавах, с	64,50 ± 31,33	38,67 ± 13,29	39,0 ± 24,54
Час перебування в темних рукавах, с	235,50 ± 31,33	261,33 ± 13,29	261,0 ± 24,54
Кількість відвідувань освітлених рукавів	0,17 ± 0,17	1,67 ± 0,60 [^]	0
Кількість відвідувань темних рукавів	1,50 ± 0,34	3,67 ± 1,33	2,0 ± 0,55
Кількість відвідувань центрального майданчика	0,33 ± 0,33	2,17 ± 0,87 [*]	1,0 ± 0,55
Емоційні реакції: болюси	0,67 ± 0,42	2,17 ± 0,54 [*]	1,20 ± 0,80
уринації	0	0,17 ± 0,17	0
сума	0,67 ± 0,42	2,34 ± 0,61 [*]	1,20 ± 0,80

Таблиця 8

Показники поведінки мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту за впливу капсул «Скутелла» та препарату порівняння «Білобіл», $M \pm t$

Показник (за 5 хв)	Контроль (n = 7)	Скутелла, 260 мг/кг (n = 6)	Білобіл, 100 мг/кг (n = 6)
Латентний період входу до темної камери, с	7,0 ± 3,69	61,83 ± 29,18 [*]	12,0 ± 4,74
Час знаходження в освітлених рукавах, с	32,57 ± 8,12	110,83 ± 42,48	26,83 ± 13,04
Час знаходження в темних рукавах, с	267,43 ± 8,12	189,17 ± 42,48	273,17 ± 13,04
Кількість відвідувань освітлених рукавів	2,57 ± 0,92	1,0 ± 1,0	0,33 ± 0,21
Кількість відвідувань темних рукавів	5,43 ± 1,39	3,0 ± 1,41	1,67 ± 0,33 [*]
Кількість відвідувань центрального майданчика	1,86 ± 0,77	1,67 ± 0,49 [^]	0,33 ± 0,33
Емоційні реакції: болюси	1,29 ± 0,57	0,67 ± 0,33	1,50 ± 0,43
уринації	0	0,83 ± 0,48 [*]	0,17 ± 0,17
сума	1,29 ± 0,57	1,50 ± 0,76	1,67 ± 0,42

Висновки

1. Проведено порівняння впливу низки препаратів шоломниці байкальської у зіставлюваних за вмістом флавоноїду байкаліну дозах на поведінкові реакції мишей у тесті відкритого поля та прояви тривожності в тесті хрестоподібного піднесеного лабіринту.
2. Сухий екстракт коренів та кореневищ шоломниці байкальської в діапазоні доз 25–75 мг/кг виявляє дозозалежну тенденцію до седативної дії в тесті відкритого поля на рівні препарату порівняння екстракту гінкго дволопатевого «Білобілу» (100 мг/кг) та на відміну від нього чинить виразну анксиолітичну дію в дозі 50 мг/кг.
3. Таблетки «Скутекс», що містять сухий екстракт коренів та кореневищ шоломниці байкальської, збіль-

шують локомоторну активність і зменшують емоційні реакції мишей у тесті відкритого поля, проте не мають виразних анксиолітичних властивостей у дозі 320 мг/кг, еквівалентній дозі сухого екстракту 50 мг/кг за вмістом байкаліну. Це може бути зумовлено зменшенням біодоступності рослинних біологічно активних речовин під впливом допоміжних речовин таблеток.

4. Подрібнені корені та кореневища шоломниці байкальської в дозах, еквівалентних сухому екстракту за вмістом байкаліну, виявляють тенденцію до седативної дії та помірні анксиолітичні властивості. Капсули «Скутелла», що містять подрібнені корені та кореневища шоломниці байкальської, у еквівалентних їм за вмістом байкаліну дозах чинять аналогічні психотропні ефекти.

1. *Ибрагимова В. С.* Китайская медицина. Методы диагностики и лечения. Лекарственные средства. Чжень-цзю терапия / В. С. Ибрагимова. – Москва : Антарес, 1994. – С. 426–429.
2. *Энциклопедия лекарственных растений / Пер. книги La Sante par les plantes // Арналь-Шнебеллен Б. П. Гетц, Э. Грассар [и др.].* – Б. м. «Ридерз Дайджест», 2004. – 352 с.
3. *Biphasic effects of baicalin, an active constituent of Scutellaria baicalensis Georgi, in the spontaneous sleep-wake regulation / H. H. Chang, P. L. Yi, C. H. Cheng [et al.] // J. Ethnopharmacol.* – 2011. – V. 135 (2), № 17. – P. 359–368.
4. *Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: Учеб. пособие; под ред. Г. П. Яковлева и К. Ф. Блиновой.* – Санкт-Петербург : Специальная литература, 1999. – 407 с.
5. *Сліпченко Г. Д.* Оптимізація складу і технології таблеток на основі сухого екстракту шоломниці байкальської / Г. Д. Сліпченко, О. А. Рубан, Н. М. Белей // *Фармацевтичний часопис.* – 2016. – № 1. – С. 50–53.
6. *Цывунин В. В.* Нейропротекторные свойства сухих экстрактов дымянки Шлейхера и базилика камфорного / В. В. Цывунин, С. Ю. Штрыголь, Ю. С. Прокопенко // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2013. – Т. 11, № 3. – С. 66–71.
7. *Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова.* – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
8. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств; под. ред. А. Н. Миронова.* – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.

Т. Д. Сліпченко, С. Ю. Штрыголь, О. В. Кудіна, А. В. Таран, О. А. Рубан **Порівняльне доклінічне дослідження психотропних властивостей препаратів шоломниці байкальської**

Мета дослідження – вивчення психотропних властивостей сухого екстракту коренів та кореневищ шоломниці байкальської, таблеток, що його містять, подрібнених коренів та кореневищ шоломниці байкальської та твердих желатинових капсул, до складу яких вони входять.

Вплив досліджуваних речовин та препарату порівняння «Білобіл» на рухову, орієнтовно-дослідницьку діяльність та емоційні реакції мишей встановлювали за тестом «відкритого поля». Анксиолітичну активність оцінювали за тестом «піднесеного хрестоподібного лабіринту».

Встановлено, що сухий екстракт шоломниці байкальської в дозі 25 мг/кг слабо впливає на показники тесту відкритого поля, у дозах 50 мг/кг та 75 мг/кг проявляє тенденцію до седативної дії на рівні препарату порівняння. Таблетки «Скутекс» чинять лише стимулювальний вплив на локомоторну активність та орієнтовно-дослідницьку діяльність, вибірково пригнічуючи емоційні реакції, поступаючись сухому екстракту шоломниці байкальської та препарату порівняння. Сухий екстракт шоломниці байкальської в дозі 50 мг/кг виявляє виразну протитривожну активність у мишей, таблетки «Скутекс» – лише тенденцію до анксиолітичної дії. Порошок коренів та кореневищ шоломниці байкальської та таблетки «Скутекс» виявили лише тенденцію до седативного ефекту. Дещо виразнішу протитривожну дію чинили капсули «Скутелла».

Таким чином, різний прояв седативної та анксиолітичної дії препаратів шоломниці байкальської залежить від біофармацевтичних чинників. Допоміжні речовини таблеток, імовірно, здатні зменшувати біодоступність біологічно активних речовин шоломниці байкальської, що підтверджується слабким впливом таблеток «Скутекс» на поведінкові реакції, хоча за дозами біологічно активних речовин вони відповідають сухому екстракту шоломниці байкальської.

Ключові слова: препарати шоломниці байкальської, поведінкові реакції, анксиолітична дія

Г. Д. Слипченко, С. Ю. Штрыголь, О. В. Кудина, А. В. Таран, Е. А. Рубан
Сравнительное доклиническое изучение психотропных свойств препаратов шлемника байкальского

Цель исследования – изучение психотропных свойств сухого экстракта корней и корневищ шлемника байкальского, таблеток, которые его содержат, измельченных корней и корневищ шлемника байкальского и твердых желатиновых капсул, в состав которых он входит.

Влияние исследуемых веществ и препарата сравнения «Билобил» на двигательную, ориентировочно-исследовательскую деятельность и эмоциональные реакции мышей определяли в тесте «открытого поля». Анксиолитическую активность оценивали по тесту «приподнятого крестообразного лабиринта».

Установлено, что сухой экстракт шлемника байкальского в дозе 25 мг/кг слабо влияет на показатели теста открытого поля, в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг проявляет тенденцию к седативному действию на уровне препарата сравнения. Таблетки «Скутекс» оказывают только стимулирующее влияние на локомоторную активность и ориентировочно-исследовательскую деятельность, избирательно угнетая эмоциональные реакции, уступая сухому экстракту шлемника байкальского и препарату сравнения. Сухой экстракт шлемника байкальского в дозе 50 мг/кг оказывает выраженное противотревожное действие у мышей, таблетки «Скутекс» проявляют лишь тенденцию к анксиолитическому действию. Порошок корней и корневищ шлемника байкальского и таблетки «Скутекс» демонстрируют тенденцию к седативному действию. Несколько более выраженное противотревожное действие оказывали капсулы «Скутелла».

Таким образом, различное проявление седативного и анксиолитического действия препаратов шлемника байкальского зависит от биофармацевтических факторов. Вспомогательные вещества таблеток, скорее всего, способны уменьшать биодоступность биологически активных веществ шлемника байкальского, что подтверждается слабым влиянием таблеток «Скутекс» на поведенческие реакции, хотя по дозам биологически активных веществ они соответствуют сухому экстракту шлемника байкальского.

Ключевые слова: препараты шлемника байкальского, поведенческие реакции, анксиолитическое действие

G. D. Slipchenko, S. Yu. Shtrygol', O. V. Kudina, A. V. Taran, O. A. Ruban
The comparative pre-clinical study of psychotropic properties of the medicines from *Scutellaria baicalensis* Georgi

The aim of the study was to compare the psychotropic properties of drugs based on *Scutellaria baicalensis* Georgi: dry extract of roots and rhizomes, tablets «Scutex» that contain dry extract of roots and rhizomes, powdered roots and rhizomes, soft gelatin capsules «Scutella», which included powdered roots and rhizomes.

The influence of these medicines and the reference drug «Bilobil» on the locomotor and exploratory activities and vegetative support of the emotional reactions in combined open field test has been investigated. Anxiolytic activity have been evaluated by the elevated plus maze test.

There were shown that *Scutellaria baicalensis* dry extract at a dose of 25 mg/kg has a weak influence on the open field test parameters and as a reference drug has a tendency to sedative effect at the doses of 50 mg/kg and 75 mg/kg. The tablets «Scutex» have only simulative effect on locomotor and exploratory activities; selectively reduce emotional reactions parameters, yielding *Scutellaria baicalensis* dry extract and the reference drug. *Scutellaria baicalensis* dry extract at a dose of 50 mg/kg has an expressed anxiolytic effect in mice while tablets «Scutex» only have a tendency to this effect. The powder of roots and rhizomes of *Scutellaria baicalensis* and «Scutex» have showed only a tendency to the sedative effect. Capsules «Scutella» have provided an expressed anxiolytic effect. This activity is expressed much brighter than the effect of the powder of roots and rhizomes of *Scutellaria baicalensis*.

Conclusion: The differences in sedative and anxiolytic effects expression of *Scutellaria baicalensis* medicines depend on the biopharmaceutical factors. Perhaps, the adjuvant components in the tablets are able to reduce the bioavailability of biologically active substances of *Scutellaria baicalensis*, as evidenced by a weak influence of the tablets "Scutex" on the behavioral reactions, although the doses of biologically active substances in tablets are equivalent to those in *Scutellaria baicalensis* dry extract.

Key words: medicines of *Scutellaria baicalensis*, behavioral reactions, anxiolytic effect

Надійшла: 30 травня 2016 р.

Контактна особа: Штрыголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: +38 057 706 30 69. Електронна пошта: shtrygol@mail.ru

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

Дослідження актопротекторної активності похідних 1,2,4-триазолу в експерименті

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: актопротекторна активність, похідні 1,2,4-триазолу

Сучасна людина кожного дня знаходиться під впливом різноманітних екстремальних факторів, зокрема, надмірних навантажень, психоемоційної напруги, порушень добової періодики сну та інших [1]. Усе це призводить до стресових перенавантажень, що в подальшому може призвести до різноманітних соматичних, неврологічних та психічних захворювань. З метою попередження останніх було створено новий клас препаратів – актопротектори, основними властивостями яких є збереження, підтримання та збільшення фізичної працездатності в звичайних та ускладнених (екстремальних) умовах [2]. Актопротектори є препаратами, які підвищують розумову працездатність та стійкість організму до фізичних напружень без збільшення споживання кисню. Також вони розглядаються як підклас адаптогенів, які мають збільшувати фізичну працездатність [3].

Основними механізмами реалізації актопротекторного ефекту є оптимізація енергозабезпечення за рахунок підвищення інтенсивності енергетично вигідних метаболічних процесів та нормалізації енергетичного балансу клітини, збільшення вуглеводного резерву органів, посилення білоксинтетичних процесів у м'язах. Одним з основних механізмів дії актопротекторних засобів, який викликає велику зацікавленість з боку дослідників усього світу, є антигіпоксичний ефект. Гіпоксія являє собою патологічний стан, при якому відбувається порушення окиснення субстратів у тканинах організму через ускладнення чи блокування транспорту електронів у «дихальному ланцюзі».

Подібні форми порушень спостерігаються при широкому спектрі захворювань (різноманітних формах дихальної та серцево-судинної недостатності, крововтратах, ішемії міокарда, порушеннях мозкового та периферичного кровообігу та ін.). Антигіпоксичний ефект актопротекторних лікарських засобів полягає в перебудові обмінних процесів, що визначають енергозабезпечення тканин, зменшення гіперкапнії, гальмування процесів перекисного окиснення ліпідів клітинних мембран та, як наслідок, посилення антиоксидантного захисту [1, 4–5].

Натепер, згідно з даними літератури, арсенал актопротекторів значно обмежений, а для наявних препаратів характерні побічні ефекти: головний біль, диспепсичні явища, гастралгія, надмірна психоактивна дія, порушення сну та інші [6].

Аналіз сучасних джерел літератури вказує на перспективність пошуку лікарських засобів з актопротекторною активністю серед похідних 1,2,4-триазолу, зокрема за рахунок антиоксидантної, антигіпоксичної та інших видів фармакологічної дії [4, 6]. Особливо велике значення при цьому мають дослідження з біодоступності, фармакологічної активності та токсичності хімічних сполук [5, 7].

Мета дослідження – виявити наявність та величину актопротекторного ефекту в похідних 1,2,4-триазолу, визначити сполуки-лідери для поглибленого вивчення їхніх фармакологічних властивостей.

Матеріали та методи. Для вивчення актопротекторної активності використовували білих лабораторних щурів-самців лінії Вістар масою 180–200 г. Були сформовані 10 груп по 7 лабораторних тварин: 1–9 групи, яким вводили

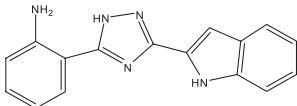
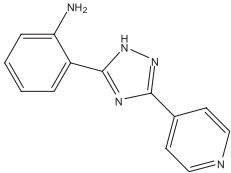
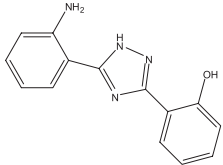
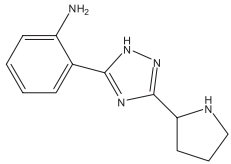
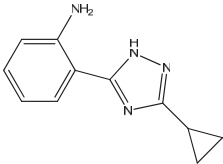
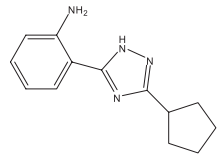
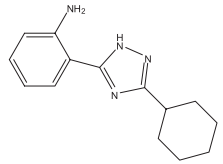
ли досліджувані речовини – похідні 1,2,4-триазолу (табл. 1) у вигляді 10 % суспензії внутрішньоочеревинно в дозі 1/10 ЛД₅₀; 10 групі вводили рибоксин у дозі 100 мг/кг у вигляді 10 % розчину (внутрішньоочеревинно).

Використовуючи експериментальні дані попередніх досліджень з вивчення

актопротекторної дії, як препарат порівняння був обраний рибоксин, який стимулював механізми біохімічної адаптації до фізичного навантаження та підвищував питому вагу окиснювального метаболізму. Це, у свою чергу, створювало умови для продукції енергії за рахунок субстратів ліпідної природи та

Таблиця 1

Структура досліджуваних похідних 1,2,4-триазолу

Шифр сполуки	Структурна формула	ЛД ₅₀ , мг/кг
ВК-32		2090
ПК-282		3340
ПК-293		1520
ПК-297		1060
ПК-354		1131
ПК-370		1250
ПК-372		1660

Тривалість плавання щурів під впливом похідних 1,2,4-триазолу, $M \pm m$

Група	Тривалість плавання, с		Збільшення тривалості плавання, %
	до введення сполук	після введення сполук	
ВК 32	903,6 ± 91,2	1482,0 ± 133,2*	63,96
ПК 274	749,4 ± 63,6	1070,4 ± 97,2*	42,80
ПК 282	745,8 ± 72,6	920,4 ± 89,4	23,40
ПК 293	756,0 ± 34,2	1275,0 ± 89,4*	68,68
ПК 297	741,6 ± 34,8	1090,8 ± 120,0*	47,12
ПК 354	924,6 ± 53,4	1188,6 ± 61,8*	28,52
ПК 369	894,0 ± 49,8	922,8 ± 43,8	3,24
ПК 370	1060,2 ± 81,6	1068,0 ± 76,2	0,76
ПК 372	899,4 ± 51,6	927,6 ± 54,6	3,15
Рибоксин	886,8 ± 52,2	1096,2 ± 33,6*	23,63

Примітка. *Достовірність відмінностей відносно групи вихідних показників, $p < 0,05$.

захищало вуглеводні резерви організму для підтримки енергетики мозку [8].

Для оцінки актопротекторної дії досліджуваних речовин використовували метод примусового плавання тварин з навантаженням 6 % від маси тіла. Плавання здійснювали до повної втоми тварин, на що вказувало 10-секундне занурення лабораторних тварин під воду. Щурів занурювали в ємність з шаром води 80 см та температурою 30–32 °С. Препарат порівняння рибоксин та досліджувані речовини вводили одноразово за 20 хв до початку плавання. Тривалість плавання реєстрували в секундах та порівнювали показники тривалості плавання до та після введення досліджуваних сполук та препарату порівняння [9].

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

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Визначення достовірності міжгрупових відмінностей встановлювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали статистично значимими при $P < 0,05$.

При виконанні експерименту, схваленого комісією з біоетики, дотримували-

ся правил і норм Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986 р.) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах.

Результати та їх обговорення. У ході проведених досліджень було виявлено (табл. 2), що найсуттєвіше підвищувалась тривалість плавання щурів після введення речовин ПК-293 та ВК-32 (на 68,68 та 63,96 % відповідно). У той самий час при введенні речовин ПК-297 та ПК-274 спостерігали помірне збільшення тривалості плавання тварин на 47,12 та 42,8 % відповідно щодо фонового вихідного показника. Сполука ПК-354 проявляла слабку актопротекторну активність, збільшуючи тривалість плавання на 28,52 %. Варто відмітити, що метаболітотропний препарат порівняння рибоксин збільшував тривалість плавання на 23,63 %.

Встановлено, що додавання 2-гідроксифенільного радикала по 3-му положенню триазолового ядра призводило до збільшення актопротекторної активності в речовини ПК-293. Наявність актопротекторної дії досліджуваних сполук ймовірно пов'язана з метаболітотропною активністю похідних 1,2,4-триазолу, формуванням більш стійкого метаболічного гомеостазу при виконанні фізичної роботи.

Висновки

Проведені дослідження довели перспективність класу похідних 1,2,4-триазолу як нових ефективних та малотоксичних речовин з актопротекторною активністю. Найактивнішими виявилися

сполуки ПК-293 та ВК-32, які за актопротекторною дією переважали препарат порівняння рибоксин у 3 рази та були рекомендовані для подальших поглиблених фармакологічних досліджень.

1. Малахов В. А. Актопротекторы / В. А. Малахов, Е. С. Ромелашвили // Неврология. – 2011. – № 4 (360). – С. 39–42.
2. Oliyuk S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance / S. Oliyuk, S. Oh // J Ginseng Res. – 2013. – № 37 (2). – P. 144–66.
3. Лук'ячук В. Д. Актопротектори: фармакологія та фармакотерапія / В. Д. Лук'ячук, І. В. Сімонова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 2 (43). – С. 14–26.
4. Гаврев А. И. Актопротекторное действие антигипоксантов триазолоиндольного ряда / А. И. Гаврев, В. В. Марышева, П. Д. Шабанов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – № 2 (73). – С. 25–30.
5. Kucheryavii Yu. M. Synthesis of 5-R-4-R1-3-alkylthio-1,2,4-triazoles and study influence of their adsorption ability on the results of toxicity and anti-hypoxic activity / Yu. M. Kucheryavii, A. G. Kaplaushenko, A. S. Korzhova // The Pharma Innovation – Journal. – 2014. – № 1 (3). – P. 69–73.
6. Щербак М. О. Вплив адсорбційних властивостей 3-алкілтіо-5-(2-,3-,4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів на їх токсичність та актопротекторну активність / М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 2 (31). – С. 68–72.
7. Руда Н. В. Актопротекторное действие калиевой соли 2-глицино-3-хлор-1,4-нафтохинона в условиях экспериментальной гипокинезии / Н. В. Руда, Г. И. Степанюк, О. П. Драчук // Curierul medical. – 2013. – № 1 (56). – С. 25–29.
8. Белай И. М. Влияние ацифена, ноотропила и рибоксина на биоэнергетические процессы и физическую работоспособность (экспериментальное исследование) : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук / И. М. Белай. – Москва, 1987. – 15 с.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.

І. М. Білай, О. В. Цис, Є. О. Михайлюк, С. І. Коваленко, К. П. Шабельник **Дослідження актопротекторної активності похідних 1,2,4-триазолу в експерименті**

Мета дослідження – виявити наявність та величину актопротекторного ефекту в похідних 1,2,4-триазолу, визначити сполуки-лідери для поглибленого вивчення їхніх фармакологічних властивостей.

Досліди проводили на білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Для оцінки актопротекторної дії досліджуваних сполук використовували метод примусового плавання тварин у воді (30–32 °С) з навантаженням 6 % від маси тіла. Реєстрували тривалість плавання тварин до повної втоми, на що вказувало занурення їх під воду протягом 10 с.

У ході проведених досліджень було виявлено, що найсуттєвіше збільшувалася тривалість плавання щурів після введення речовин ПК-293 та ВК-32 (на 68,68 та 63,96% відповідно). У той самий час при введенні речовин ПК-297 та ПК-274 спостерігали помірне збільшення тривалості плавання тварин на 47,12 та 42,8 % відповідно порівняно з фоновими (вихідними) показниками. Сполука ПК-354 проявляла слабку актопротекторну активність, збільшуючи тривалість плавання на 28,52 %. Препарат порівняння рибоксин збільшував тривалість плавання на 23,63 %.

Таким чином, проведені дослідження довели перспективність класу похідних 1,2,4-триазолу як нових високоефективних та малотоксичних речовин з актопротекторною активністю. Найактивнішими виявилися сполуки ПК-293 та ВК-32, які за актопротекторною дією переважали препарат порівняння рибоксин у 3 рази та були рекомендовані для подальших поглиблених фармакологічних досліджень.

Ключові слова: актопротекторна активність, похідні 1,2,4-триазолу

І. М. Белай, А. В. Цыс, Е. О. Михайлюк, С. И. Коваленко, К. П. Шабельник **Исследование актопротекторной активности производных 1,2,4-триазола в эксперименте**

Цель исследования – выявить наличие и величину актопротекторного эффекта производных 1,2,4-триазола, определить соединения-лидеры для углубленного изучения их фармакологических свойств.

Исследование проводили на белых лабораторных крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Для оценки актопротекторного действия исследуемых соединений использовали метод принуди-

тельного плавания животных в воде (30–32 °C) с нагрузкой 6 % от массы тела. Регистрировали длительность плавания животных до полного утомления, на что указывало погружение животных под воду в течение 10 с.

В ходе проведенных исследований было выявлено, что наиболее существенно увеличивалась длительность плавания крыс после введения веществ ПК-293 и ВК-32 (на 68,68 и 63,96% соответственно). При введении веществ ПК-297 и ПК-274 наблюдали умеренное увеличение продолжительности плавания животных – на 47,12 и 42,8% соответственно по отношению к фоновым (исходным) показателям. Соединение ПК-354 проявляло слабую актопротекторную активность, увеличивая длительность плавания на 28,52 %. Препарат сравнения рибоксин увеличивал продолжительность плавания на 23,63 %.

Таким образом, проведенные исследования доказали перспективность класса 1,2,4-триазола как новых высокоэффективных и малотоксичных веществ с актопротекторной активностью.

Наиболее активными оказались вещества ПК-239 и ВК-32, которые по актопротекторной активности превосходили препарат сравнения рибоксин в 3 раза и были рекомендованы для дальнейших углубленных фармакологических исследований.

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

I. M. Bilay, O. V. Tsys, E. O. Mykhailiuk, S. I. Kovalenko, K. P. Shabelnik **Actoprotective activity of 1,2,4-triazole derivatives in experiment**

The aim of work was to identify the presence and value of actoprotective effect of derivatives of 1,2,4-triazole and to mark the compound-leader for future in-depth study of pharmacological properties.

Experiment was performed on white Vistar rats-males with weigh 180–200 g. It was used a method of forced swimming in water (30–32 °C) with a load of 6 % of body weight of the animal to evaluate actoprotective activity of compounds. Swimming performed to fatigue, which were fixed after a 10-second immersion of laboratory animals under the water.

The results of experiment revealed that the most significant increase of endurance was recorded in rats with the introduction of substances PC-293 and VC-32, which prolonged the duration of swimming by 68,68 and 63,96 %, respectively. At the same time, the administration of substances PC-297 and PC-274 led to moderate increase of swimming duration – on the 47,12 and 42,8 % respectively, compared with the background (initial) values. PC-354 showed weak activity, increasing of swimming duration by 28,52 %. It is worth noting that comparison drug - riboxinum increased the duration of swimming on 23,63 %.

Thus, conducted study proved that the derivatives of 1,2,4-triazole are promising as a new high effective and low-toxic substances with actoprotective activity. The most active compounds were the substances PC-239 and VC-32, which were 3 times superior to comparison drug riboxinum as actoprotectors and recommended for further in-depth pharmacological studies.

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

Надійшла: 7 липня 2016 р.

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

Д. О. Дринь¹, М. І. Мельник², А. І. Соловйов²,
Ю. І. Прилуцький¹, О. В. Жолос^{1,3}

Вуглецеві наночастинки як новітні блокатори мускаринових катіонних струмів у міоцитах тонкого кишечника

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка

²Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», м. Київ

³Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України, м. Київ

Ключові слова: гладенькі м'язи, іонні канали, канали транзієнтного рецепторного потенціалу (TRP), G-білки, C₆₀ фулерени

Кальцієва сигналізація та кальцієвий гомеостаз є надзвичайно важливими для регуляції фізіологічних функцій гладеньком'язових клітин (ГМК) різних систем організму. Вони забезпечуються та підтримуються такими транспортними мембранними структурами, як іонні канали, помпи, обмінники, головними з яких є класи потенціал-залежних кальцієвих каналів та рецептор-керованих неселективних катіонних каналів. Останні в основному представлені родиною Ca²⁺-проникних катіонних каналів, що належать до надродини TRP (канали транзієнтного рецепторного потенціалу) [1–5].

TRP канали – велика родина іонних каналів, експресованих переважно в плазматичній мембрані багатьох типів клітин, збудливих і незбудливих. Вони активуються великим різноманіттям хімічних та фізичних стимулів, екзогенних і ендогенних. В організмі ссавців розрізняють 28 представників TRP каналів, які поділяють на 6 підродин [4–5]. Одні з них, TRPC4 і TRPC6 канали, експресовані в ГМК кишечника, де відіграють важливу роль у сприйнятті холінергічного збудження та формуванні сигнальних каскадів через шляхи мускаринових рецепторів M₃/G_{q/11}/PLC та M₂/G_{i/o} [6–8]. Тому селективні блокатори TRPC4/С6 каналів можуть розглядатися як перспективні модулятори

скоротливої активності кишечника. Однак наразі відомий лише один блокатор цього типу – ML204 [9].

Останнім часом значну увагу як перспективним фармакологічним агентам приділяють біосумісним та біодоступним наночастинкам різної хімічної природи, які здатні виявляти специфічну біологічну активність, зокрема, виступати активаторами або блокаторами іонних каналів. Так, раніше було показано, що наночастинки золота здатні активувати кальцій-залежні калієві канали великої провідності (BK_{Ca}) та посилювати ефект під дією опромінення зеленим лазером [10, 11]. Вуглецеві наноматеріали, зокрема одностінні вуглецеві нанотрубки (ОВНТ) блокували струм через калієві канали [12], а C₈₄ фулерени були розроблені як селективні блокатори потенціал-керованих натрієвих каналів [13]. C₆₀ фулерени з їхньою високою симетрією та специфічними фізико-хімічними властивостями [14] розглядають як перспективні наночастинки для застосування в різних галузях біомедичних технологій. Так, вони демонструють потужні антиоксидантні [15, 16] та противірусні властивості [17], є переносниками фармакологічних препаратів [18–21] та протипухлинними засобами [22–24].

Можна припустити, що C₆₀ фулерени є перспективними модуляторами іонних каналів різних типів, принаймні це передбачають результати молекулярного моделювання [13]. Можливість регуляції ними рецептор-керованих іонних каналів раніше не досліджували

експериментально. *Мета дослідження* – вивчити дію вуглецевих наночастинок фулеренів C_{60} на мускаринові катіонні струми ($mI_{\text{кат}}$) через TRPC4/6 канали в ізольованих ГМК тонкого кишечника миші.

Матеріали та методи. В експериментах використано мишей-самців лінії BALB/c середньою вагою 25–30 г. Тварин утримували за стандартних умов віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Експерименти проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Виділення ізольованих клітин гладеньких м'язів тонкого кишечника. Експерименти проводили на ізольованих клітинах тонкого кишечника миші. Тварини були піддані евтаназії шляхом асфіксії з використанням CO_2 . Черевну порожнину розтинали, виділяли саме повздожні гладенькі м'язи тонкого кишечника та поміщали в розчин Кребса (ммоль/л): 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, pH 7,4 (NaOH). Гладеньком'язові смужки нарізали на фрагменти довжиною 1 мм та поміщали в безкальцієвий розчин Кребса (ммоль/л): 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, pH 7,4 (NaOH). Ферментативна інкубація клітин відбувалася у безкальцієвому розчині Кребса з додаванням колагенази типу 1A (1 мг/мл), інгібітора трипсину (1 мг/мл) та бичачого альбуміну (1 мг/мл) (Sigma, США) упродовж 17 хв за температури 36 °C. Далі препарат відмивали тричі в безкальцієвому розчині Кребса та механічно розміщували піпеткою Пастера. До отриманої клітинної суспензії додавали звичайний розчин Кребса в пропорції 1:2. Суспензію розливали на покривельні скельця та використовували в експериментах упродовж 8 год.

Реєстрація трансмембранних струмів. Іонні струми через TRPC4 канали ізольованих ГМК реєстрували методом «петч-клемп» у конфігурації whole-cell з використанням підсилювача AxoPatch 200B та програмного забезпечення pClamp 8 (Molecular Devices, CA, США). Петч піпетки отримували з боросилікатного скла (зовнішній діаметр 1,5 мм,

а внутрішній – 0,86 мм; Harvard Apparatus, США) за допомогою мікроелектродної витяжки P-97 (Sutter Instruments, Новато, США). Після їхнього заповнення внутрішньопіпеточним розчином вони мали опір 3–5 МОм. Для реєстрації трансмембранних струмів використовували цезієвий зовнішній розчин такого складу (у ммоль/л): CsCl 120, глюкоза 12, HEPES 10, pH 7,4 (CsOH). Для ізоляції $mI_{\text{кат}}$ концентрацію внутрішньоклітинного кальцію фіксували на рівні близько 100 нмоль/л з використанням внутрішньопіпеточного розчину наступного складу (у ммоль/л): CsCl 80, MgATP 1, креатин 5, глюкоза 5, BAPTA 10, HEPES 10, $CaCl_2$ 4,6, pH 7,4 (CsOH). Для безпосередньої активації G-білка з метою отримання катіонного струму через TRPC4/6 у внутрішньоклітинний розчин додавали 200 мкмоль/л гуанозинтрифосфату- γ S (ГТФ γ S).

Приготування та характеризування водного розчину немодифікованих C_{60} фулеренів. Водний розчин немодифікованих C_{60} фулеренів, використовуваний в експериментах, був приготовлений відповідно до методики [25]. Насичений розчин C_{60} фулеренів (чистота 99,5 %) у толуолі змішували з такою самою кількістю дистильованої води. На отриману двофазну систему впливали ультразвуком до повного випаровування толуолу. Далі розчин фільтрували для видалення нерозчинених C_{60} фулеренів. Таким чином був отриманий стабільний колоїдний водний розчин немодифікованих C_{60} фулеренів з концентрацією 0,15 мг/мл ($\sim 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Стан C_{60} фулеренів у воді контролювали за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ; комерційна система «Solver Pro M»; NT-MDT, Росія).

Статистична обробка результатів. Усі експериментальні дані наведено у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Усі розрахунки проводили з використанням комп'ютерної програми OriginPro 8.5 (Microcal Software Inc., США).

Результати та їх обговорення. Отримані зображення АСМ демонструють як

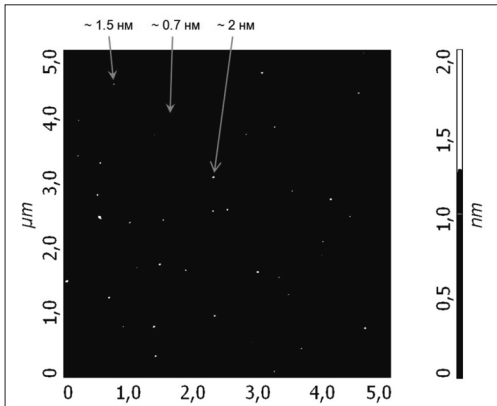


Рис. 1. Зображення наночастинок C_{60} фулеренів у воді (концентрація 10^{-6} моль/л), отримані методом атомно-силової мікроскопії, на поверхні слюди (напівконтактний режим)

окремі C_{60} молекули (діаметр $\sim 0,7$ нм), так і їхні агрегати з характерним розміром 1,5–2,0 нм (рис. 1), присутні у водному розчині, що добре узгоджується з попередніми даними [25, 26].

Рєстрєрацію струмів у ГМ клітинах кишечника проводили в розчинах з наступними концентраціями: 125 ммоль/л $[Cs^+]$ внутрішньоклітинний розчин; 125 ммоль/л $[Cs^+]$ безкальцієвий та безмагнієвий зовнішній розчини; до внутрішньопіпеточного розчину також додавали ГТФ γ S (200 мкмоль/л). Такий склад розчинів дозволяв пригнічувати струми через калієві та кальцієві канали мембрани, тобто ефективно ізолювати мускариновий катіонний струм. Ідентифікувати mI_{KAT} можливо за наявності характерної U-подібної вольт-амперної характеристики за від'ємних потенціалів мембрани та потенціалу реверсії струму, близького до 0 мВ, що є типовими характеристиками для експресованих TRPC4 каналів та нативного mI_{KAT} струму [8].

У міоцитах кишечника миші mI_{KAT} залежать від синергічної активації супряжених з мускариновими M_2 підтипу рецепторами $G_{i/o}$ і супряжених з мускариновими рецепторами M_3 підтипу $G_{q/11}$ -білків, що в свою чергу викликає активацію фосфоліпази C, яка каталізує утворення інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) та діацилгліцеролу (DAG) з фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату (PIP_2) [1, 6].

G-білки активували шляхом внутрішньоклітинної аплікації ГТФ γ S (200 мкм) через скляну петч піпетку, що спричиняло повільний розвиток mI_{KAT} після прориву мембрани під петч-піпеткою. На рисунку 2 наведено протокол експеримента (рис. 2А) і типові реєстрації mI_{KAT} з інтервалом 30 с як упродовж дії ГТФ γ S і, відповідно, поступового зростання mI_{KAT} (рис. 2Б), так і після додавання C_{60} фулеренів у концентрації (10^{-6} моль/л) (рис. 2В). Максимальна амплітуда mI_{KAT} при підтримуваному на мембрані потенціалі -40 мВ становила $(304 \pm 16$ пА при -40 мВ ($n = 4$), а час її досягнення в різних клітинах складав 3–10 хв.

Водний розчин немодифікованих C_{60} фулеренів (10^{-6} моль/л) додавали на піку активації G-білками mI_{KAT} , що викликало поступове, упродовж декількох хвилин, зменшення струму (рис. 3). Блокування mI_{KAT} було незворотним.

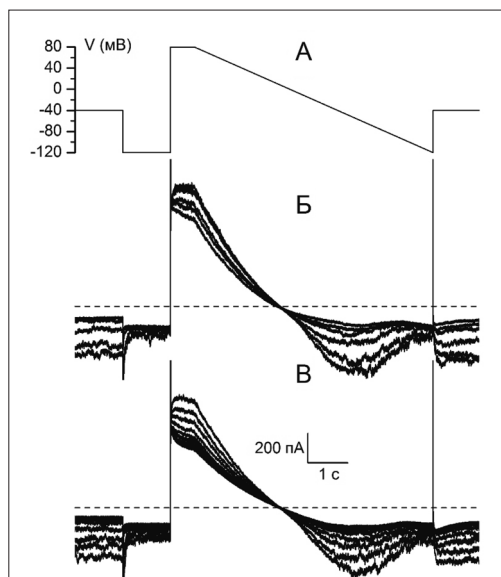


Рис. 2. Оригінальні записи струмів mI_{KAT} з інтервалом 30 с з застосуванням пилкоподібного ('gamp') звуку мембранного потенціала від 80 до -120 мВ упродовж 6 с: контроль (А); струм, викликаний аплікацією ГТФ γ S (200 мкмоль/л) від початку реєстрації й до досягнення максимальної активації з інтервалом у 30 с (Б), та реєстрація струму з інтервалом у 30 с після додавання водного розчину немодифікованих C_{60} фулеренів у концентрації (10^{-6} моль/л) (В).

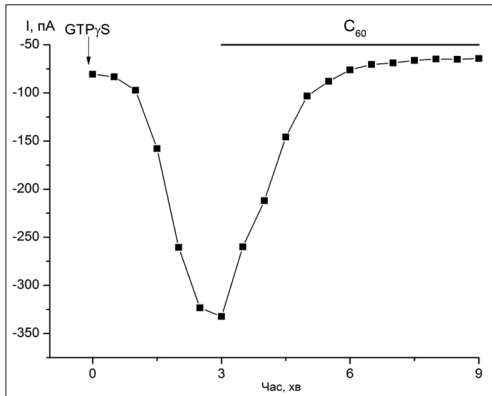


Рис. 3. Повільне інгібування $mI_{\text{КАТ}}$ при додаванні C_{60} фулеренів (10^{-6} моль/л). Наведено амплітуди $mI_{\text{КАТ}}$ струму при підтримуваному на мембрані потенціалі -40 мВ, який рестрували з інтервалом 30 с як показано на рисунку 2

Для дослідження можливої потенціал-залежної блокуючої дії C_{60} фулеренів порівняли стаціонарні вольт-амперні (I-V) характеристики $mI_{\text{КАТ}}$ до і після додавання водного розчину немодифікованих C_{60} фулеренів. I-V залежності вимірювали з використанням пілкоподібного ('ramp') зсуву мембранного потенціалу від 80 до 120 мВ упродовж 6 с (рис. 2А). За присутності C_{60} фулеренів середня амплітуда $mI_{\text{КАТ}}$ при підтримуваному потенціалі -40 мВ зменшувалася до (114 ± 16) пА ($n = 4$), тобто струм блокувався в середньому на 62 % ($n = 4$) (рис. 4). Струм при цьому зберігав свої потенціал-залежні властивості, тобто інгібуючий ефект

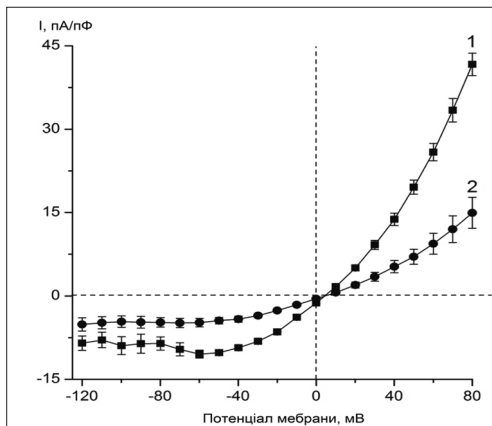


Рис. 4. Усереднені вольт-амперні криві для нормованої на ємність клітини амплітуди $mI_{\text{КАТ}}$ у контролі (1) та після досягнення повного інгібуючого ефекту C_{60} фулеренів за концентрації 10^{-6} моль/л (2) ($n = 4$)

мав місце в усьому діапазоні потенціалів.

Park та ін. [12] ідентифікували ОВНТ як новий клас блокаторів іонних каналів. Їхні експерименти довели, що ці наноструктури селективно блокують активність калієвих каналів залежно від їхньої молекулярної структури та розміру пори. В аналогічних дослідках [27, 28] встановлено, що функціоналізовані ОВНТ та багатостінні вуглецеві нанотрубки (БВНТ) впливають на активність іонних каналів у яйцеклітинах китайського хом'ячка.

Дослідження показують, що водний розчин немодифікованих C_{60} фулеренів викликає значне зменшення струму – приблизно на 60 % за низької концентрації C_{60} молекул/їхніх агрегатів – 10^{-6} моль/л ($n = 4$) (рис. 3–4). Як видно з вольт-амперних характеристик (рис. 4), струм при цьому зберігав свої потенціал-залежні властивості. За фізіологічних умов $mI_{\text{КАТ}}$ виникає за активації мускаринових холінорецепторів, що спричиняє холінергічне збудження та скорочення вісцеральних гладеньких м'язів [1, 6]. У наших експериментах струм активували шляхом внутрішньоклітинної інфузії ГТФ γ S, що безпосередньо викликає активацію G-білків, тобто без участі мускаринових рецепторів. Тому ймовірними мішенями дії C_{60} фулеренів за цих умов є G-білки і TRPC4 канали, які дають основний внесок у генерацію $mI_{\text{КАТ}}$ [7]. Ймовірно, що C_{60} фулерени/їхні агрегати накопичуються у ліпідному бішарі плазматичної мембрани клітин і перешкоджають функціонуванню сигнального каскаду через G-білки, що й пригнічує $mI_{\text{КАТ}}$ (принаймні пряме блокування пори TRPC4 є менш ймовірним з огляду на повільний розвиток інгібуючого ефекту і його незворотний характер). Крім того, інгібуючий ефект спостерігали для струмів як вхідного, так і вихідного напрямків (рис. 4).

Розробка нових селективних блокаторів TRPC4 каналів, виготовлених з біосумісних і нетоксичних наноконкомпозитів, є надзвичайно важливим завданням щодо їхнього подальшого застосування для корекції різних порушень нормальної функції кишечника. Тому

подальше дослідження TRPC4 каналів та їхньої взаємодії з C₆₀ фулеренами сприятиме практичному застосуванню останніх для фармакологічної корекції тих патологічних станів, що характеризуються гіперактивністю вісцеральних гладеньких м'язів (наприклад, синдром подразненого кишечника, нейрогенний сечовий міхур, захворювання дихальних шляхів), для яких спільним є визначальна роль M_I_{КАТ} у генерації нейрогенних скорочень за фізіологічних умов.

Отже, наразі C₆₀ фулерени можуть бути запропоновані як новий клас потенційних терапевтичних агентів для лікування захворювань і розладів органів шлунково-кишкового тракту, оскільки вони здатні блокувати поширений у вісцеральних гладеньких

м'язах мускариновий катіонний струм.

Висновки

1. Виявлено, що C₆₀ фулерени є ефективними інгібіторами M_I_{КАТ}. Цей ефект, ймовірно, зумовлений накопиченням або навіть проникненням через ліпідний бішар біологічної мембрани C₆₀ фулеренів/їхніх агрегатів [29] з наступним пригніченням активності G-білків.
2. Уперше пропонується застосовувати водорозчинні немодифіковані C₆₀ фулерени як блокатори неселективних іонних каналів TRPC4/C6, які опосередковують нейрогенне холінергічне збудження і скорочення гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту.

1. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles / Bolton T. B., Prestwich S. A., Zholos A. V., Gordienko D. V. // *Annu Rev Physiol.* – 1999. – № 61. – P. 85–115.
2. Clapham D. E. The TRP ion channel family / Clapham D. E., Runnels L. W., Strubing C. // *Nature Reviews Neuroscience.* – 2001. – № 2. – P. 387–396.
3. Minke B. TRP channels and Ca²⁺ signaling / Minke B. // *Cell Calcium.* – 2006. – № 40. – P. 261–275.
4. TRP channels / Gees M., Owsianik G., Nilius B., Voets T. // *Comp Physiol.* – 2012. – V. 2, №1. – P. 563–608.
5. Wu L. J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family/ Wu L. J., Sweet T. B., Clapham D. E. // *Pharmacol Rev.* – 2010. – № 62. – P. 381–404.
6. Zholos A. V. Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP3/Ca²⁺ system / Zholos A. V. // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2006. – № 27. – P. 833–842.
7. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility *in vivo* / Tsvilovsky V. V., Zholos A. V., Aberle T. [et al.] // *Gastroenterol.* – 2009. – № 137. – P. 1415–1424.
8. G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum / Zholos A. V., Bolton T. B. // *J. Physiol.* – 1994. – № 478. – P. 195–202.
9. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels / Miller M., Shi J., Zhu Y. [et al.] // *Biol Chem.* – 2011. – № 286. – P. 33436–33446.
10. Plasmonic gold nanoparticles possess the ability to open potassium channels in rat thoracic aorta smooth muscle in a remote control manner/ A. Soloviev, A. Zholos, I. Ivanova [et al.] // *Vasc. Pharmacol.* – 2015. – № 72. – P. 190–196.
11. Non-drug Remote Control of Maxi-K Channels in Smooth Muscle Cells with Nano-Photonics Stimuli Using Plasmonic Gold Nanoparticles / Soloviev A. I., Melnyk M. I., Ivanova I. V. [et al.] // *JSM Nanotechnol Nanomed.* – 2016. – V. 4, № 1. – P. 1037.
12. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers/ Park K. H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. // *J. Biol Chem.* – 2003. – № 278. – P. 50212–50216.
13. Hilder T. Designing a C84 fullerene as a specific voltage-gated sodium channel blocker / Hilder T., Chung S. // *Nanoscale Research Letters.* – 2013. – № 8. – P. 323.
14. Матишевська О. П. Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. I. Фізико-хімічні властивості та біодоступність / Матишевська О. П., Прилуцька С. В., Гринюк І. І. // *Біотехнологія.* – 2010. – № 3. – С. 18–26.
15. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity / N. Gharbi, M. Presac, M. Hadchouel [et al.] // *Nano Lett.* – 2005. – № 5. – P. 2578.
16. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro* / S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, O. P. Matyshevska [et al.] // *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* – 2008. – V. 16, № 5–6. – P. 698–705.
17. Antiviral activity of nano carbon fullerene lipidosome against influenza virus *in vitro* / Ji H., Yang Z., Jiang W. [et al.] // *J. Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* – 2008. – V. 28. – № 3. – P. 243–246.
18. Buckysomes: fullerene-based nanocarriers for hydrophobic molecule delivery / Partha R., Mitchell L. R., Lyon J. L. [et al.] // *ACS Nano.* – 2008. – № 9. – P. 1950–1958.

19. Water-soluble fullerene (C₆₀) derivatives as nonviral gene-delivery vectors / Sitharaman B., Zakharian T. Y., Saraf A. [et al.] // *Mol Pharm.* – 2008. – V. 5, № 4. – P. 567–578.
20. Characterization of C₆₀ fullerene complexation with antibiotic doxorubicin / Yu. I. Prylutskyi, M. P. Evstigneev, I. S. Pashkova [et al.]. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2014. – V. 16, № 42. – P. 23164–23172.
21. Structural self-organization of C₆₀ and cisplatin in physiological solution / Yu. I. Prylutskyi, V. V. Cherepanov, M. P. Evstigneev [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V. 17, № 39. – P. 26084–26092.
22. *Larocque J.* Cancer detection and treatment: The role of nanomedicines / Larocque J., Bharali D. J., Mousa S. A. // *Mol Biotechnol.* – 2009. – V. 42, № 3. – P. 358–366.
23. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy / S. V. Prylutska, A. P. Burlaka, P. P. Klymenko [et al.] // *Cancer Nanotechnol.* – 2011. – V. 2, № 1. – P. 105–110.
24. C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment / S. Prylutska, I. Grynyuk, O. Matyshevska [et al.] // *Drugs R&D.* – 2014. – V. 14, № 4. – P. 333–340.
25. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques / U. Ritter, Yu. I. Prylutskyi, M. P. Evstigneev [et al.] // *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* – 2015. – V. 23, № 6. – P. 530–534.
26. On the origin of C₆₀ fullerene solubility in aqueous solution / Yu. I. Prylutskyi, V. I. Petrenko, O. I. Ivankov [et al.] // *Langmuir.* – 2014. – V. 30, № 14. – P. 3967–3970.
27. Irreversible blocking of ion channels using functionalized single-walled carbon nanotubes / Chhowalla M., Unalan H. E., Wang Y. [et al.] // *Nanotechnology.* – 2005. – № 8. – P. 2982–2986.
28. Multi-walled carbon nanotubes suppress potassium channel activities in PC12 cells / Xu H., Bai J., Meng J. [et al.] // *Nanotechnology.* – 2009. – № 8. – P. 285102.
29. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane / S. Prylutska, R. Bilyy, M. Overchuk [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2012. – V. 8, № 3. – P. 522–527.

Д. О. Дринь, М. І. Мельник, А. І. Соловйов, Ю. І. Прилуцький, О. В. Жолос
Вуглецеві наночастинки як новітні блокатори мускаринових катіонних струмів у міоцитах тонкого кишечника

Фулерени характеризуються унікальними механічними, хімічними й електричними властивостями та мають значний потенціал застосування в різних областях. Парк та ін. ідентифікували вуглецеві нанотрубки як новий клас блокаторів іонних каналів, які можуть інгібувати струми кількох різних типів калієвих каналів.

Мета дослідження – вивчити дію вуглецевих наночастинок фулеренів C₆₀ на мускаринові катіонні струми (mI_{КАТ}) через TRPC4/6 канали в ізольованих гладенько-м'язових клітинах тонкого кишечника миші.

Активация цих каналів відбувається при зв'язуванні ацетилхоліну з мускариновими рецепторами M₂ і M₃ типу, які широко експресуються в цих клітинах. У ГМК кишечника ці канали є важливими мішенями дії збуджуючих нейротрансмітерів і подальшої каскадної сигналізації через G_{q/11} та G_{1/0} білки.

Експерименти проводили на свіжоізольованих клітинах гладеньких м'язів кишечника, для виділення та збереження клітин використовували зовнішньоклітинний модифікований розчин Кребса. Для ізоляції катіонного струму використовували безкальцієвий і безмагнієвий зовнішньоклітинні розчини, які містили 120 ммоль/л CsCl. Дослідження впливу фулеренів C₆₀ на іонні провідності каналів у міоцитах проводили в умовах фіксації потенціалу за методом patch clamp у конфігурації «ціла клітина».

Активация G-білків відбувалася шляхом внутрішньоклітинної аплікації ГТФγS (200 мкмоль/л) через петч-піпетку. Аплікацію фулеренів C₆₀ (10⁻⁶ моль/л) здійснювали на піку активації, що призводило до значного зменшення струмів у середньому на 60 % (n = 4).

Отже, вуглецеві наночастинки – фулерени C₆₀, як новий клас інгібіторів мускаринових катіонних струмів (mI_{КАТ}) через TRPC4/6 канали в ізольованих ГМК тонкого кишечника миші, є перспективними наноструктурами для вивчення модуляції функцій ГМ кишечника.

Ключові слова: гладенькі м'язи, іонні канали, канали транз'єнтного рецепторного потенціалу (TRP), G-білки, C₆₀ фулерени

Д. О. Дринь, М. И. Мельник, А. И. Соловьев, Ю. И. Прилуцкий, О. В. Жолос
Углеродные наночастицы как новейшие блокаторы мускариновых катионных токов в миоцитах тонкого кишечника

Фуллерены характеризуются уникальными механическими, химическими и электрическими свойствами и имеют значительный потенциал для их применения в различных областях. Парк и др. идентифицировали углеродные нанотрубки как новый класс блокаторов ионных каналов, которые могут ингибировать токи нескольких различных типов калиевых каналов.

Цель исследования – изучить действие углеродных наночастиц фуллеренов C_{60} на мускариновые катионные токи ($mI_{\text{КАТ}}$) через TRPC4/6 каналы в изолированных гладкомышечных клетках тонкого кишечника мыши.

Активация этих каналов происходит при связывании ацетилхолина с мускариновыми рецепторами M_2 и M_3 типа, которые широко экспрессируются в этих клетках. В ГМК кишечника эти каналы являются важными мишенями действия возбуждающих нейротрансмиттеров и последующей каскадной сигнализации через $G_{q/11}$ и $G_{i/o}$ белки.

Эксперименты проводили на свежеизолированных клетках гладких мышц кишечника, для выделения и сохранения клеток использовали внеклеточный модифицированный раствор Кребса. Для изоляции катионного тока использовали бескальциевый и безмагниевоый внеклеточные растворы, содержащие 120 ммоль/л CsCl. Исследование влияния фуллеренов C_{60} на ионные проводимости каналов в миоцитах проводили в условиях фиксации потенциала методом patch clamp в конфигурации «целая клетка».

Активация G-белков происходила путем внутриклеточной аппликации ГТФ γ S (200 мкмоль/л) через пэтч-пипетку. Аппликацию фуллеренов C_{60} (10^{-6} моль/л) осуществляли на пике активации, что приводило к значительному уменьшению токов в среднем на 60 % ($n = 4$).

Итак, углеродные наночастицы – фуллерены C_{60} , как новый класс ингибиторов мускариновых катионных токов ($mI_{\text{КАТ}}$) через TRPC4/6 каналы в изолированных ГМК тонкого кишечника мыши, являются перспективными наноструктурами для изучения модуляции функций ГМ кишечника.

Ключевые слова: гладкие мышцы, ионные каналы, каналы транзистентного рецепторного потенциала (TRP), G-белки, C_{60} фуллерены

D. Dryn , M. Melnyk , A. Soloviev , Yu. Prylutskyi , A. Zholos **Carbon nanoparticles as novel blockers of muscarinic cation currents in myocytes of the small intestine**

Fullerenes possess unique mechanical, chemical and electrical properties, thus offering considerable potential for diverse applications. Park et al. identified carbon nanotubes and C_{60} fullerenes as a novel class of ion channel blockers that can indiscriminately inhibit several diverse types of potassium channels.

The aim of the study was to investigate the action of C_{60} fullerenes on receptor-operated cation channels mainly formed by TRPC4 proteins in ileal smooth muscle myocytes. Activation of these channels subsequent to acetylcholine binding to expressed in these cells M_2 and M_3 muscarinic receptors represents the key event in the parasympathetic control of smooth muscle motility and cholinergic excitation-contraction coupling.

Experiments were performed on single collagenase-dispersed mouse ileal myocytes using patch-clamp techniques with symmetrical 125 mM Cs^+ solutions and $[Ca^{2+}]_i$ 'clamped' at 100 nM (10 mM BAPTA/ $CaCl_2$ mixture) in order to isolate the muscarinic cation current ($mI_{\text{КАТ}}$). The current was induced by intracellular infusion of 200 μ M GTP γ S, which activates G-proteins directly, i.e. bypassing the muscarinic receptors. C_{60} fullerenes applied at 10^{-6} M at peak response to G-proteins activation caused $mI_{\text{КАТ}}$ inhibition by 62 % ($n = 4$). These results suggest that C_{60} fullerenes are unlikely to cause any direct block of the TRPC4 channel; rather, they may accumulate in the membrane and disrupt G-protein signalling leading to $mI_{\text{КАТ}}$ generation. Thus, C_{60} fullerenes may represent a novel class of molecules for the treatment of disorders of gastrointestinal motility.

Key words: smooth muscle, transient receptor potential (TRP) channels, G-proteins, C_{60} fullerene

Надійшла: 1 серпня 2016 р.

Контактна особа: Мельник Марія Ігорівна, провідний інженер, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 93 919 26 21.
Електронна пошта: gribovamari@gmail.com

А. Г. Кононенко, В. М. Кравченко

Вплив спиртової настойки листеця ряски малої на морфофункціональний стан щитоподібної залози за експериментального гіпотиреозу

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: настойка листеця ряски малої, експериментальний гіпотиреоз, морфологія, морфометрія, щитоподібна залоза

Гіпотиреоз є однією з найчастіших дисфункцій щитоподібної залози, що супроводжується пригніченням багатьох функцій органів і систем організму та призводить до перебудови структури щитоподібної залози [1]. За даними деяких епідеміологічних досліджень в окремих групах населення поширеність субклінічного гіпотиреозу досягає 10–12 % [2–4].

Для лікування гіпотиреоїдних станів щитоподібної залози в основному використовують замісну терапію – тиреоїдні гормони, або терапію, що спрямована на відновлення дефіциту йоду – препарати йоду [5, 6]. Сьогодні вагому частку як європейського, так і світового фармацевтичного ринку займають препарати рослинного походження: за різними оцінками, ця частка становить 30–50 % [7–9]. Арсенал тиреотропних препаратів в Україні характеризується одноманітністю лікарських форм, переважанням імпортованих виробників і відсутністю препаратів рослинного походження [5]. У зв'язку з цим виникає потреба в розробці фармакологічних препаратів, у тому числі й на основі лікарської рослинної сировини, які мають тиреостимулюючу дію.

Однією з лікарських рослин, що використовується в традиційній та народній медицині для лікування та профілактики гіпотиреозу, є ряска мала. У результаті проведення фітохімічних досліджень у листеці ряски була встановлена наявність йоду та ще 14 елементів (кальцію, калію, кремнію, натрію та ін.). Були ідентифіковані 32

біологічно активні речовини різних хімічних груп (фітостерини, насичені вуглеводні, альдегіди та кетони, жирні кислоти та ін.) [10].

Мета дослідження – вивчити вплив 30 % спиртової настойки листеця ряски малої на морфологічний стан щитоподібної залози на тлі експериментального гіпотиреозу.

Матеріали та методи. Досліди були проведені на білих нелінійних щурах самцях масою 120–150 г. Експериментальний гіпотиреоз відтворювали щоденним введенням перхлорату натрію у вигляді 1 % розчину замість питної води протягом 20 днів [11]. Експериментальні тварини були поділені на 5 груп по 10 щурів у кожній: 1 – інтактний контроль, 2 – щури, що отримували перхлорат натрію (позитивний контроль), 3 – щури, що на фоні перхлорату натрію отримували екстрагент 30 % етанол (негативний контроль), 4 – щури, що на фоні перхлорату натрію отримували 30 % настойку листеця ряски в дозі 1 мл/100 г маси тіла, 5 – щури, що на фоні перхлорату натрію отримували препарат порівняння Йодомарин. Препарат порівняння вводили в дозі 12 мкг йоду/кг маси тіла, яку розраховували за методом Ю. Р. Риболовлева, виходячи з середньої добової дози йоду для людини 200 мкг/добу. Досліджувані засоби тваринам 3–5 експериментальних груп вводили внутрішньошлунково з 21 по 41 добу експерименту.

Після закінчення терміну дослідження тварин виводили з експерименту шляхом миттєвої декапітації під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) та вилучали обидві частки щитоподібної залози. Частки залоз фіксували в 10 % розчині формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності, заливали

в целоїдин-парафін. Зрізи товщиною 5–6 мкм фарбували гематоксиліном та еозином [12]. Для патоморфологічного аналізу щитоподібної залози були використані алгоритми гістологічного опису, розроблені О. К. Хмельницьким [13]. Для уніфікації патогістологічного дослідження та об'єктивізації оцінки відмічених змін проводили кількісні дослідження залозистої тканини. За допомогою програми Tourcam Granum вимірювали висоту фолікулярного епітелію та зовнішній діаметр фолікулів (мкм), підраховували кількість тироцитів у стінці фолікула. Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica, V. 6,0» [14–16]. Мікрофотографування зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum ДСМ 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4 GHz за допомогою програми Tour View.

Гістологічні дослідження були проведені на базі центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ кандидатом біологічних наук, доцентом Ю. Б. Лар'яновською. Досліди були проведені з дотриманням вимог комісії з біоетики НФаУ та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (м. Київ, 2001 р.), що узгоджуються з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986 р.).

Результати та їх обговорення. В інтактних щурів щитоподібна залоза

мала типову фолікулярну будову. Часточки тканини відокремлені одна від одної тонкими сполучнотканинними перегородками. Тиреоїдні фолікули – різних розмірів, переважно округлої або злегка овальної форми, з чіткими контурами. Фолікули на периферії – крупніші, ніж центральні. Інтрацелюлярний простір фолікулів заповнено помірно варіабельним за щільністю, однорідним, оксифільним колоїдом. Як правило, колоїд заповнював всю порожнину фолікула, іноді був злегка «розтрісканим» або відставав від стінок фолікулів. Тиреоїдний епітелій, що вистеляв стінку фолікулів, здебільше низької кубічної форми, у великих фолікулах – помірно сплюснений. Фолікулярні тироцити розміщені на базальній мембрані виключно в один ряд. Ядра клітин – щільні, округлі, розташовані по центру. Екстрафолікулярно епітелію – небагато, він невеликими острівками розташований між фолікулами. Щільність розташування тиреоїдних фолікулів – звичайна. Перифолікулярна капілярна сітка – нормального кровонаповнення (рис. 1).

Наведена вище морфологічна будова щитоподібної залози відповідає стану нормальної, життєздатної, помірно активної тканини, що підтверджують і морфометричні показники (таблиця).

Через 20 днів вільного споживання з питною водою перхлорату натрію були відмічені виразні зміни в структурі щитоподібної залози, які мали дифузний характер, та спостерігалися в усіх без винятку щурів з певним

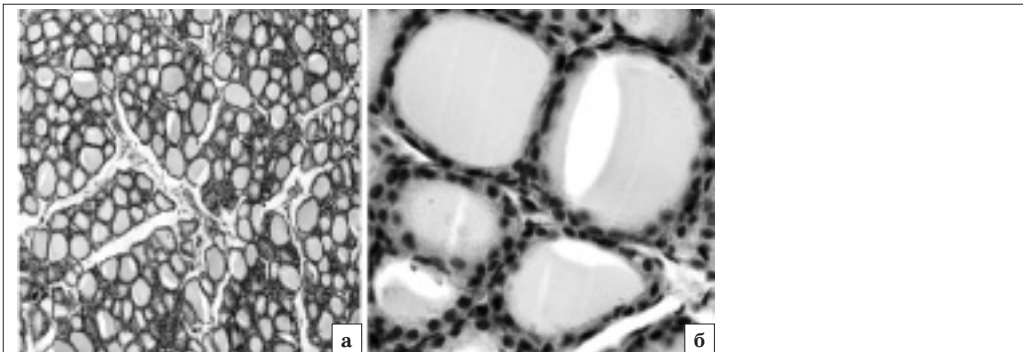


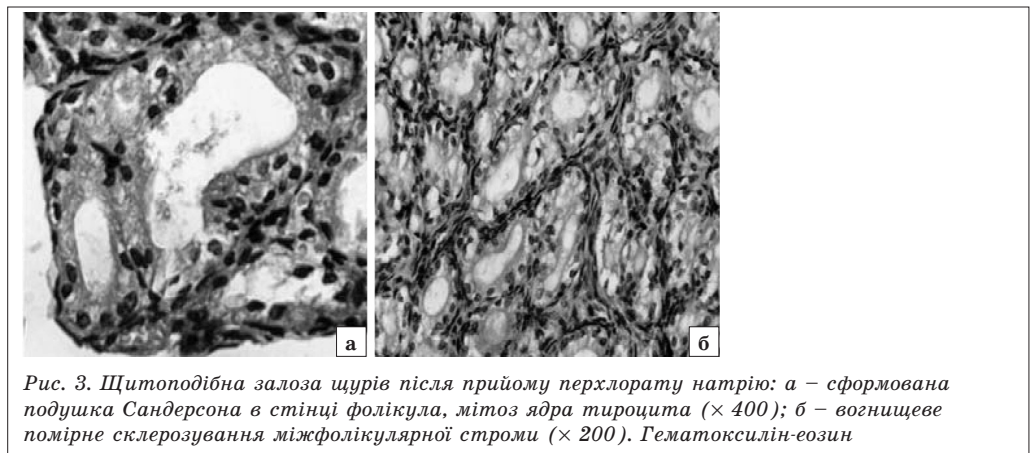
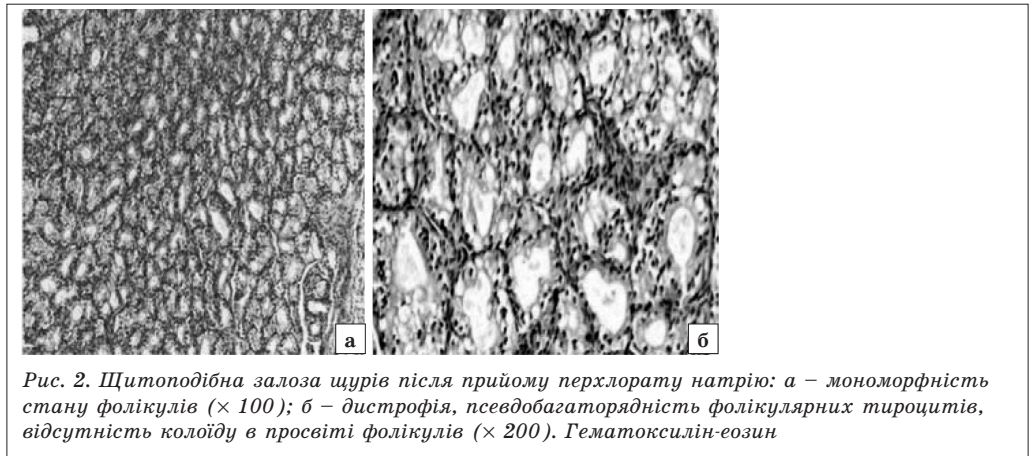
Рис. 1. Щитоподібна залоза інтактного щура: а – нормальна фолікулярна будова залозистої тканини ($\times 100$); б – тироцити, що вистеляють стінку фолікула, кубічної та низької кубічної форми, розташовані в один ряд, колоїд заповнює всю порожнину, щільний ($\times 400$). Гематоксилін-еозин

коливанням виразності гіперпластичних процесів. У більшості тварин (67 %) фолікули в різних зонах часточок були монорморфні за станом, щільно прилягали один до одного. Колоїд у просвіті фолікулів – відсутній, подекуди зустрічаються його залишки. Тироцити – збільшені в розмірі, часто апікальний контур тироцитів розмитий, клітинні межі затушовані. Просвіт низки фолікулів викривлений, зменшений або відсутній. Дуже часто відсутнє чітке однорядне розташування тироцитів у стінці фолікула (псевдобагаторядність). Ядра багатьох тироцитів не є типової форми, гіпохромні, знаходяться на різних етапах лізису, пікнозу. Доволі рідко спостерігали гіпертрофію ядер та фігури мітозу. Цитоплазма переважної кількості клітин настільки вакуолізована, що змінено сам вигляд фолікула. У стінках багатьох фолікулів видно різного ступеня сформованості подушки Сандер-

сона. Екстрафолікулярний епітелій також проліферував, часто з утворенням дрібних та мікрофолікулів. Усе це візуально дуже утруднювало визначення меж ряду фолікулів, спотворювало рисунок. У різних зонах часточок простежено помірне склерозування міжфолікулярної стріми, вогнищеву гіперемію перифолікулярної капілярної сітки (рис. 2, 3).

У решти тварин процес структурної перебудови та гіперплазії також мав дифузний характер, але була відмічена певна варіабельність розміру та форми фолікулів, виразності повнокровності тканини (рис. 4).

Візуальні зміни в стані фолікулів корелювали зі змінами їхніх морфометричних характеристик. Середній зовнішній діаметр фолікулів збільшився на 22,16 %, висота тироцитів збільшилася в 2,13 разу, а самих тироцитів у стінці фолікула ставало більше в 1,72 разу (таблиця).



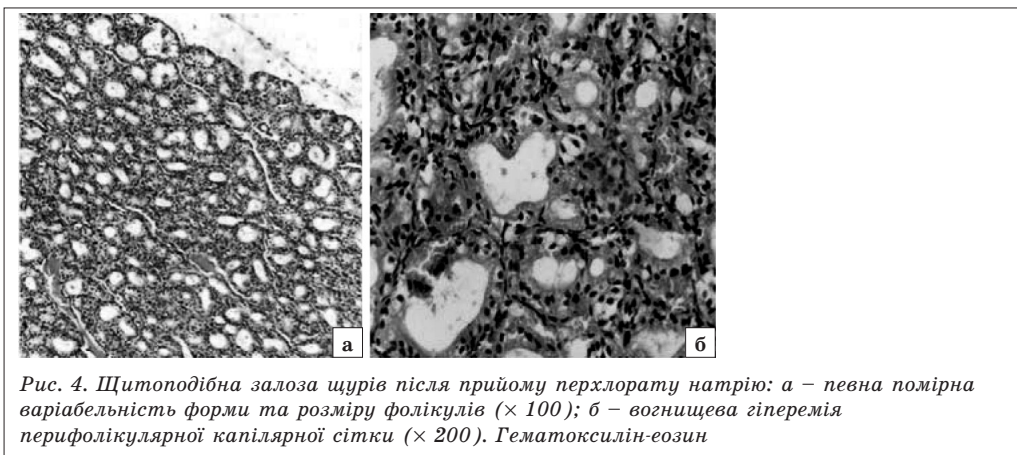


Рис. 4. Щитоподібна залоза щурів після прийому перхлорату натрію: а – певна помірна варіабельність форми та розміру фолікулів ($\times 100$); б – вогнищева гіперемія перифолікулярної капілярної сітки ($\times 200$). Гематоксилін-еозин

Таким чином, довготривале споживання щурами перхлорату натрію призвело до виразних морфологічних та морфометричних змін щитоподібної залози тварин, які відповідають гіпотиреоїдному стану з виразним стромогенним ефектом.

Введення 30 % розчину спирту етилового на фоні експериментального гіпотиреозу порівняно з модельною патологією не спричинило жодних якісних та кількісних змін у морфофункціональному стані щитоподібної залози щурів. Навіть, на відміну від позитивного контролю, практично в усіх тварин групи відмічено монормфність стану фолікулів та фолікулярних тироцитів (рис. 5, таблиця).

Після введення препарату порівняння Йодомарину на тлі перхлорату натрію в 67 % тварин мікроскопічна

картина щитоподібної залози свідчила про збільшення її функціональної активності порівняно з індукованою патологією. Більшість фолікулів коливалися за розміром у межах «допустимої» норми, форма наближалася до типової. Колоїд визначався не в усіх фолікулах і мав різний вигляд – від блідо еозинофільного сітчастого до доволі «типового». Повнота заповнення порожнини фолікулів також різнилася. Фолікулярні тироцити в стінці фолікулів мали здебільше високу кубічну форму, достатньо чітко розташовані в ряді. Дистрофію, виразну гіпертрофію та гіперплазію тиреоїдного епітелію спостерігали у відносно невеликій кількості фолікулів. Гіперпластичні прояви екстрафолікулярного епітелію зменшені та мали осередковий характер (рис. 6).

Таблиця

Морфометричні показники, що характеризують функціональний стан щитоподібної залози щурів, $M \pm t$

Група тварин	Показник		
	Зовнішній діаметр фолікул, мкм	Висота тироцита, мкм	Кількість тироцитів у стінці фолікула
Інтактний контроль	37,33 \pm 1,74	5,51 \pm 0,25	9,06 \pm 0,26
Позитивний контроль	47,96 \pm 1,87*	11,72 \pm 0,10*	15,56 \pm 0,80*
Негативний контроль (30 % етанол)	48,70 \pm 1,23*	11,14 \pm 0,30*	15,74 \pm 0,58*
Настойка листя ряски малої	36,61 \pm 2,26**	5,28 \pm 0,29**	10,54 \pm 0,32**
Йодомарин	44,91 \pm 1,75*	8,86 \pm 0,49*/**	13,62 \pm 0,53*/**

Примітка. *Відмінності статистично значущі порівняно з групою інтактного контролю, $p < 0,05$; **відмінності статистично значущі порівняно з групою позитивного контролю, $p \leq 0,05$.

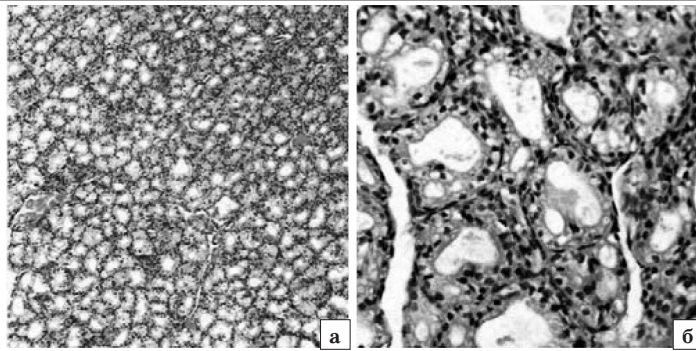


Рис. 5. Щитоподібна залоза щурів, які отримували 30 % розчин спирту етилового на фоні перхлорату натрію: а – виразна мономорфність стану фолікулів ($\times 100$); б – дистрофія, гіперплазія фолікулярних тироцитів, відсутність колоїду в просвіті фолікулів ($\times 250$). Гематоксилін-еозин

У 33 % щурів мікроскопічна картина структури щитоподібної залози візуально не змінилася порівняно з групою позитивного контролю: така сама дифузна мономорфність фолікулів, відсутність колоїду, дистрофія, гіпертрофія та гіперплазія тироцитів, вогнищева гіперемія перифолікулярної кровоносної сітки (рис. 7).

Такий розбіг у структурній організації щитоподібної залози відбився на середніх показниках, що характеризували її функціональний стан у групі. Зовнішній діаметр фолікулів зменшено проти позитивного контролю лише на 6,79 % (не вірогідно), чисельність фолікулярних тироцитів у стінці фолікулів вірогідно зменшені на 14,24 %, висота клітин також вірогідно зменшена на 32,28 % (таблиця).

На відміну від Йодомарину, в усіх щурів після прийому 30 % спиртової

настойки листеця ряски малої на тлі перхлорату натрію практично повністю відновлена мікроструктура щитоподібної залози. Відновлювалися не тільки типовий розмір та форма фолікулів і фолікулярних тироцитів, щільність розташування фолікулів, наявність островків екстрафолікулярного епітелію, а й здатність до секреції та накопичення колоїду. Колоїд повністю заповнював інтрацелюлярний простір фолікулів, мав гомогенний рівномірний еозинофільний колір, нормальну щільність, і, навіть, у деяких фолікулах був «розтрісканий» (рис. 8). Морфометричні характеристики щитоподібної залози цих щурів підтвердили мікроскопічну картину: зовнішній діаметр фолікула, висота тироцита та кількість тироцитів у стінці фолікула зменшувалися порівняно з групою позитивного контролю на 23,67; 54,95

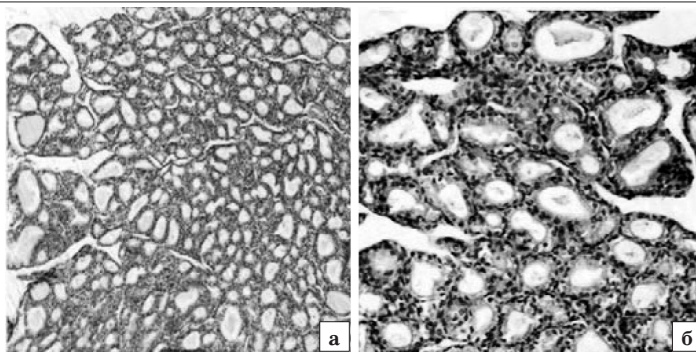


Рис. 6. Щитоподібна залоза щурів, які отримували Йодомарин на тлі перхлорату натрію: а – структура залози більше наближена до нормальної ($\times 100$); б – фолікулярні тироцити в більшості фолікул мають більш типовий стан, ступінь щільності колоїду, наявність його в різних фолікулах різниться ($\times 200$). Гематоксилін-еозин

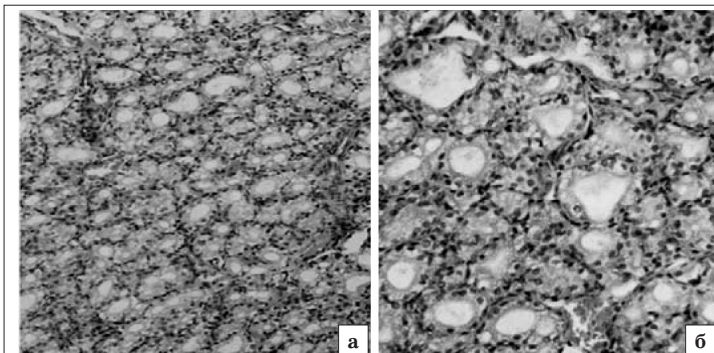


Рис. 7. Щитоподібна залоза щурів, які отримували Йодомарин на тлі перхлорату натрію: а – дифузна монормфність фолікулів ($\times 100$); б – дистрофія, гіпертрофія та гіперплазія фолікулярних тироцитів, відсутність колоїду в просвіті фолікулів ($\times 200$). Гематоксилін-еозин

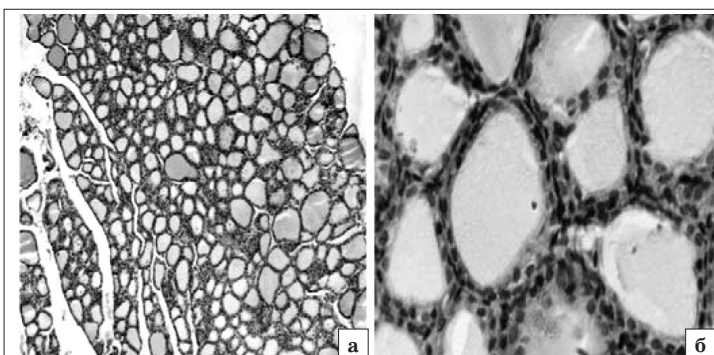


Рис. 8. Щитоподібна залоза щурів, які отримували 30 % спиртову настойку ряски малої на тлі перхлорату натрію: а – нормальна фолікулярна структура ($\times 100$); б – відновлення нормального стану фолікулярних тироцитів та колоїду ($\times 250$). Гематоксилін-еозин

і 32,26 % відповідно, і наближувалися до рівня інтактного контролю (таблиця).

Висновки

1. Перхлорат натрію в щурів виразно пригнічує функціональну активність щитоподібної залози тварин, внаслідок чого виникають морфологічні ознаки, притаманні стану йодного дефіциту. Гіпотиреоїдний стан ускладнюється виразним стромогенним ефектом.

2. Спиртова настойка листця ряски малої в умовах експериментального гіпотиреозу проявляє виразний коригуючий вплив на стан щитоподібної залози, що виявлялося в зменшенні зовнішнього діаметра фолікула, висоти тироцита та кількості тироцитів у стінці фолікула.

3. За виразністю коригуючого впливу на морфологічні прояви гіпофункціонального стану, індукованого перхлоратом натрію, спиртова настойка ряски малої перевищує препарат порівняння Йодомарин.

1. Волков В. П. Новый подход к оценке морфофункционального состояния эндокринных желез / Волков В. П. // Universum: Медицина и фармакология: электрон. научн. журн. – 2014. – № 9 (10). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://7universum.com/en/med/archive/item/1589>.
2. Валдина Е. А. Заболевания щитовидной железы : рук. / Е. А. Валдина. – 3-е изд. – Санкт-Петербург : Питер, 2006. – 368 с.
3. Кравченко В. І. Динаміка захворюваності на патологію щитоподібної залози в Україні / В. І. Кравченко, С. В. Постол // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 3 (35). – С. 26–31.

4. Delange F. World Status of Monitoring Iodine Deficiency Disorders Control Programs / F. Delange // Thyroid. – 2002. – V. 12, № 10. – P. 915–924.
5. Владимирова І. М. Аналітичний огляд сучасних тиреотропних препаратів / І. М. Владимирова, В. А. Георгіянець // Фармацевтичний часопис. – 2010. – № 4. – С. 90–93.
6. Фадеев В. В. Проблемы заместительной терапии гипотиреоза: современность и перспективы / В. В. Фадеев // Клиническая и экспериментальная тиреологическая. – 2012. – Т. 8, № 3.
7. Лесюк М. Траволікування захворювань щитовидної залози / М. Лесюк. – Львів : СП БаК, 1999. – 32 с.
8. Филатова С. В. Лечение болезней щитовидной железы традиционными и нетрадиционными способами / С. В. Филатова. – Москва : РИПОЛ классик, 2010. – 256 с.
9. Thyroperoxidase gene mutation in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification deficiency / A. C. Nascimento, D. R. Guedes, C. S. Santos [et al.] // Thyroid. – 2003. – V. 13, № 12. – P. 1145–1151.
10. Владимирова И. Н. Биологическиактивные соединения Lemnaminor S. F. gray / И. Н. Владимирова, В. А. Георгіянець // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 11. – С. 29–31.
11. The pharmacokinetics of perchlorate and its effect on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the male rat / Yu K., Narayanan L., Mattie D. [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2002. – V. 182, № 2. – P. 148–159.
12. Меркулов Г. А. Курс патолого-гистологической техники / Г. А. Меркулов. – Москва : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
13. Хмельницкий О. К. Гистологическая диагностика неопухолевых заболеваний щитовидной железы: Пособие для врачей; под ред. проф. Г. Б. Ковальского / О. К. Хмельницкий. – Санкт-Петербург, 1999. – 56 с.
14. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – 2001. – 320 с.
15. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
16. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / А. А. Халафян. – Москва : ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.

А. Г. Кононенко, В. М. Кравченко

Вплив спиртової настойки листя ряски малої на морфофункціональний стан щитоподібної залози за експериментального гіпотиреозу

Мета дослідження – вивчити вплив 30 % настойки листя ряски малої на морфологічний стан щитоподібної залози на тлі експериментального гіпотиреозу. Дослідження проводили на щурах самцях масою 120–150 г, у яких експериментальний гіпотиреоз відтворювали щоденним введенням перхлорату натрію у вигляді 1% розчину замість питної води протягом 20 діб. Введення перхлорату натрію щурам призводило до змін морфофункціональної картини щитоподібної залози, які характеризувалися проявами гіперпластичної проліферації тканини та відповідали гіпофункціональному стану. Морфометричні показники також підтверджують прояв гіпофункції.

Встановлено, що введення 30 % настойки листя ряски малої протягом 20 діб чинить позитивний вплив на структурну перебудову щитоподібної залози в щурів з гіпотиреозом, підвищуючи її функціональну активність. Спостерігали зменшення проліферативних процесів з боку екстрафолікулярного епітелію та тироцитів у фолікулах. Зовнішній діаметр та висота фолікулярних тироцитів зменшуються порівняно з патологією на 23,67 та 54,95 % відповідно. Препарат порівняння Йодомарин проявляє ефект, подібний до настойки ряски, але менш виразний. Отримані результати мають практичну значимість для створення лікарських препаратів з тиреостимулюючою дією.

Ключові слова: настойка листя ряски малої, експериментальний гіпотиреоз, морфологія, морфометрія, щитоподібна залоза

А. Г. Кононенко, В. Н. Кравченко

Влияние спиртовой настойки листя ряски малої на морфофункціональное состояние щитовидной железы при экспериментальном гипотиреозе

Цель исследования – изучить влияние 30 % настойки листя ряски малої на морфологическое состояние щитовидной железы в условиях экспериментального гипотиреоза. Исследования проводили на крысах самцах массой 120–150 г, у которых экспериментальный гипотиреоз воспроизводили ежедневным введением перхлората натрия в виде 1 % раствора вместо питьевой воды в течение 20 дней. Введение перхлората натрия крысам приводило к изменениям морфофункциональной картины щитовидной железы, которые характеризовались проявлениями гиперпластической пролиферации ткани и соответствовали гипофункциональному состоянию. Морфометрические показатели также подтверждают проявление гипофункции.

Установлено, что введение 30 % настойки листеца ряски малой в течение 20 суток оказывает положительное влияние на структурную перестройку щитовидной железы у крыс с гипотиреозом, повышая ее функциональную активность. Наблюдалось уменьшение пролиферативных процессов со стороны экстрафолликулярного эпителия и тироцитов в фолликулах. Внешний диаметр и высота фолликулярных тироцитов уменьшались по сравнению с патологией на 23,67 та 54,95 % соответственно. Препарат сравнения Йодомарин проявлял эффект, подобный настойке ряски, но менее выраженный. Полученные результаты имеют практическую значимость для создания лекарственных препаратов с тиреостимулирующим действием.

Ключевые слова: настойка листеца ряски малой, экспериментальный гипотиреоз, морфология, морфометрия, щитовидная железа

A. G. Kononenko, V. N. Kravchenko

Influence of tincture from lemna minor frond on morphofunctional state of thyroid gland in experimental hypothyroidism

This work was aimed to study the effect of 30 % tincture from Lemna minor frond on morphological state of the thyroid gland in the hypothyroidism conditions. The study was conducted on male rats weighing 120–150 g with the experimental hypothyroidism induced by daily administration of sodium perchlorate as a 1 % solution with drinking water for 20 days. The administration of sodium perchlorate in rats led to morphological and functional changes in the structure of the thyroid gland, accompanied by hyperplastic tissue proliferation and hypofunctional state. Morphometric indicators firmly confirmed the hypofunction development.

It was established that administration of 30 % tincture from Lemna minor frond had a positive effect on the restructuring of the thyroid gland tissue in rats with hypothyroidism increasing its functional activity. There is a decrease of proliferative processes by extrafollicular epithelium and thyrocytes in the follicles. The outer diameter and height of follicular thyrocytes was reduced by 23,67 and 54,95 %, respectively, compared to control. The reference drug Jodomarin showed the effect similar to tinctures from Lemna minor frond, but was expressed in smaller degree. The data obtained have practical significance for drugs development with possible thyroid-stimulating action.

Key words: tincture from Lemna minor frond, experimental hypothyroidism, morphology, morphometry, thyroid gland

Надійшла: 18 квітня 2016 р.

Контактна особа: Кононенко Алевтина Геннадіївна, кандидат фарм. наук, доцент, кафедра фізіології та анатомії людини, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Куліковська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 73.
Електронна пошта: alevtina_kononen@mail.ru

О. О. Нагорна¹, Н. О. Горчакова¹, І. Ф. Бєленічев², І. С. Чекман¹

Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на систему оксиду азоту в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ²Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, ірбесартан, квінаприл, ангіолін, оксид азоту

Роль ендотеліальної дисфункції у виникненні та прогресуванні серцево-судинних захворювань, таких як артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, серцева недостатність, порушення мозкового кровообігу [1] вимагає включення в фармакотерапію цих захворювань лікарських засобів, здатних покращувати функцію ендотелію [2]. Серед сучасних антигіпертензивних лікарських засобів доведена ендотеліопротекторна дія інгібіторів АПФ та блокаторів рецепторів ангіотензину II [3], у тому числі ірбесартану [4] та квінаприлу [5]. Ендотеліопротекторний вплив дозволяє реалізувати цим засобам, крім антигіпертензивної дії, інші фармакологічні ефекти, а саме: поліпшувати показники систолічної та діастолічної функції лівого шлуночка, підвищувати толерантність до фізичного навантаження тощо [6, 7]. Одним з завдань сучасної фармакології є пошук малотоксичних лікарських засобів зі спрямованим ендотеліопротективним ефектом, які можуть бути включені в комплексну фармакотерапію серцево-судинних захворювань. До таких сполук належить похідне триазолу під умовною назвою ангіолін [8]. Головним механізмом, що лежить в основі ендотеліальної дисфункції, є пониження утворення та біодоступності оксиду азоту [9]. У свою чергу, оксид азоту синтезується з аргініну під впливом ендотеліальної NO-синтази [10]. Після активації останньої оксид азоту виступає як вазодилатуючий агент, а після

активації індукцибельної NO-синтази – як токсичний агент [11]. При патологічних станах спостерігається пониження активності загальної NO-синтази [12], розвивається нітрозуючий стрес, накопичуються продукти перетворення, такі як нітротирозин і нітрити [13].

Мета дослідження – встановити вплив ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на показники системи оксиду азоту в цитозольній та мітохондріальній фракціях гомогенату міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією.

Матеріали та методи. Маніпуляції з тваринами проведено згідно з положенням про використання тварин у біомедичних дослідках (м. Страсбург, 1986 р., зі змінами, внесеними в 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (м. Київ, 2001 р.), які узгоджені з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою» [14]. Експерименти проведено на 7 нормотензивних інтактних білих щурах-самцях лінії Wistar, 10 щурах-самцях зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR) масою 320 г (АТ – 180 мм рт. ст.) – контроль, а також 40 щурах з (SHR) масою 320 г (АТ – 180 мм рт. ст.), яким вводили досліджувані препарати внутрішньошлунково протягом 3 місяців. Експериментальні тварини були розподілені на 7 груп: 1 – нормотензивні щури; 2 – щури з SHR; 3 – щури з SHR, яким вводили ангіолін (100 мг/кг); 4 – щури з SHR, яким вводили квінаприл (10 мг/кг); 5 – щури з SHR, яким вводили квінаприл (10 мг/кг) та ангіолін (100 мг/кг); 6 – щури з SHR, яким вводили

ірбесартан (30 мг/кг); 7 – щури з SHR, яким вводили ірбесартан (30 мг/кг) та ангіолін (100 мг/кг). Усіх тварин отримано з розплідника Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Тварин виводили з експерименту під етамінал натрієвим наркозом (40 мг/кг) [15]. Серце промивали охолодженою 0,15 моль/л KCl (4 °C) 1:10. Відмите серце очищали від жиру, сполучної тканини, вирізали судини, з внутрішніх порожнин видаляли згустки крові і ще раз відмивали 0,15 моль/л KCl (4 °C) 1:10. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошокподібного стану й гомогенізували в 10-разовому об'ємі середовища (при 2 °C), що містить (у ммоль/л): сахарози – 250, трис-HCl-буфера – 20, EDTA – 1 (pH 7,4) [16]. При температурі + 4 °C методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну та цитозольну фракції. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітритів у реакції з реактивом Грісса [17]. Активність загальної NOS визначали за різницею між швидкістю окиснення NADPH, яку реєстрували флюориметрично в двох паралельних зразках, як у тому, що не містить, так і в тому, що містить інгібітор NOS-N-нітро-L-аргінін [18]. Нітрогрозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвіч-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. № НК 501-02) фірми Nuncult Biotech і визначали в нмоль/г тканини. Концентрацію в цитоплазматичній фракції ендотеліальної NOS і індукцибельної NOS у мітохондріальній фракції гомогенату міокарда визначали методом Вестерн-блот аналізу. Білки розділяли в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) шляхом електрофорезу при напрузі 100–200 V [17]. Використовували первинні антитіла та вторинні антитіла (1: 1000) (біотинізовані анти-мишачі IgG, SIGMA, USA, кат. № 051M4885). Для візуалізації комплексу використовували ExtrAvidin-пероксидази (SIGMA, USA, кат. № 051M4885) і AEK (Sigma, USA, кат. № a6926). Детекцію NOS-2 і NOS-1 здійснювали за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop,

артеріальний тиск (АТ) у тварин вимірювали методом плетизмометрії. Результати дослідження розраховували з застосуванням 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 представлені у вигляді середнього значення. Вірогідність різниць між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента за нормального розподілу. У разі розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann-Whitney. Для порівняння незалежних змінних у більше ніж двох вибірках виконували 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. Попередніми біохімічними дослідженнями встановлено, що в цитозольній і мітохондріальній фракціях міокарда в групі спонтанно гіпертензивних щурів виявлені ознаки оксидативного стресу [19]. Показана депресія утворення оксиду азоту, про що свідчить достовірне зменшення вмісту його стабільного метаболіту – нітрит-аніона на фоні пониження активності загальної NO-синтази як у мітохондріях, так і в цитозолі міокарда щурів лінії SHR (табл. 1, 2). Методом імуноблотингу було встановлено значне підвищення експресії iNOS у мітохондріях SHR щурів порівняно з нормотензивними тваринами. Також методом імуноблотингу було визначено пониження експресії eNOS у цитозольній фракції міокарда SHR щурів порівняно з аналогічними показниками інтактної групи. Визначено дискоординацію між активністю загальної NOS у мітохондріях і утворенням стабільних метаболітів NO у міокарді за умов артеріальної гіпертензії, що може бути пов'язано з інтенсифікацією «паразитарних реакцій», коли NOS і, особливо її індукцибельна

Таблиця 1

Показники системи NO у мітохондріальній фракції гомогенату міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією за впливу ангіоліну, квінаприлу, ірбесартану та їхніх комбінацій, $M \pm m$, $n = 7-8$

Група тварин	Активність NOS, мкмоль НАДФ/хв · г білка	Нітротирозин, нмоль/г білка	Нітриди, мкмоль/г тканини	Концентрація iNOS, у. о./г білка
Інтактні (n = 7)	4,37 ± 0,26	1,04 ± 0,33	16,30 ± 1,06	0,11 ± 0,02
Спонтанна артеріальна гіпертензія (контроль) (n = 8)	1,87 ± 0,08*	2,56 ± 0,15*	6,0 ± 0,85*	1,88 ± 0,16*
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг (n = 8)	2,20 ± 0,02**	1,62 ± 0,07**	7,70 ± 0,03**	1,21 ± 0,07**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + квінаприл, 10 мг/кг (n = 8)	1,84 ± 0,07	2,60 ± 0,14	6,7 ± 1,0	1,91 ± 0,14
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг + квінаприл, 10 мг/кг (n = 8)	2,35 ± 0,12**	1,48 ± 0,05**	8,2 ± 0,5**	1,10 ± 0,05**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ірбесартан, 30 мг/кг (n = 8)	2,88 ± 0,05*	2,46 ± 0,11	8,8 ± 1,2**	1,80 ± 0,12
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг + ірбесартан, 30 мг/кг (n = 8)	3,72 ± 0,10**	1,10 ± 0,07**	14,8 ± 0,4**	0,54 ± 0,02**

Примітка. Тут і в табл. 2: *зміни достовірні порівняно з показниками тварин інтактної групи ($p < 0,05$), **зміни достовірні порівняно з показниками тварин контрольної групи ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Показники системи NO у цитозольній фракції гомогенату міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією за впливу ангіоліну, квінаприлу, ірбесартану та їхніх комбінацій, $M \pm m$, $n = 7-8$

Група тварин	Активність NOS, мкмоль НАДФ/хв · г білка	Нітриди, мкмоль/г тканини	Концентрація eNOS, у. о./г білка
Інтактні (n = 7)	11,75 ± 0,75	17,23 ± 0,84	15,20 ± 0,73
Спонтанна артеріальна гіпертензія (контроль) (n = 8)	5,15 ± 0,64*	6,76 ± 0,67*	4,10 ± 0,21*
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг (n = 8)	6,54 ± 0,11**	8,11 ± 0,15**	6,0 ± 0,20**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + квінаприл, 10 мг/кг (n = 8)	5,21 ± 0,31	7,31 ± 0,42	6,0 ± 0,20**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг + квінаприл, 10 мг/кг (n = 8)	7,72 ± 0,37**	10,70 ± 0,46**	11,0 ± 0,52**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ірбесартан, 30 мг/кг (n = 8)	7,21 ± 0,21**	9,61 ± 0,37**	7,20 ± 0,43**
Спонтанна артеріальна гіпертензія + ангіолін, 100 мг/кг + ірбесартан, 30 мг/кг (n = 8)	10,11 ± 0,48**	16,10 ± 0,81**	14,30 ± 0,71**

форма, продукує не тільки NO, а також супероксидрадикал. Це призводить до значного підвищення цитотоксичних дериватів NO – пероксинітриту, іона нітрозонію тощо, й ініціації нітрозуючого стресу. Подібні реакції можуть відбуватися в умовах дефіциту L-аргініну, антиоксидантної недостатності, дисфункції мітохондрій, підвищеній експресії iNOS під дією прозапальних факторів. Неконтрольоване утворення цитотоксичних дериватів NO веде до S-, N-, O-нітрузування найактивніших ділянок структур іонних каналів, рецепторів, трансмембранних пор, сигнальних молекул, тобто розвитку нітрозуючого стресу. Підтвердженням даного припущення є визначення в мітохондріях міокарда SHR щурів вмісту маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину, що збільшився в 2,46 рази ($p < 0,05$) порівняно з нормотензивними тваринами на фоні підвищеної експресії в мітохондріях iNOS. У цитозолі міокарда SHR-щурів також був виявлений низький рівень стабільного метаболіту NO (зменшення в 2,7 разу) порівняно з нормотензивними щурами на фоні пригнічення активності загальної NOS та низької експресії ендотеліальної NOS. У групі SHR щурів у цитозольній фракції активність загальної NOS була в середньому в 2 рази нижчою, ніж у цитозолі нормотензивних тварин. Особливості змін активності закисної NOS у мітохондріях та цитозолі спонтанно гіпертензивних щурів можна пояснити локалізацією різних ізоензимів NOS у різних клітинах та клітинних органелах. У цитозолі міокарда, як і в судинах, методом імуноблотингу головним чином визначають eNOS, активність якої прямо корелює з концентрацією внутрішньоклітинного кальцію, та їй належить головна роль у забезпеченні постійного базисного рівня NO та фізіологічній регуляції артеріального тиску [20]. Саме в цитозолі нами була визначена значна депривація активності NOS, пропорційна підвищенню АТ. В останніх роботах показана наявність NOS у мітохондріях. Було показано, що ця ізоформа NOS локалізована у внутрішній мітохондріальній мембрані. mtNOS дуже схожа з

макрофагальною iNOS і визначається первинними антигенами до цього ізоензиму [21]. Поки не ясно, чи вважати mtNOS окремою ізоформою, або це iNOS, що містить посттрансляційні модифікації, які ведуть до іншої субклітинної локалізації. Показано, що mtNOS при дефіциті L-аргініну здатна продукувати супероксидрадикал [21]. Логічно припустити участь mtNOS у регуляції апоптозу через порушення тіол-дисульфідної рівноваги білків мітохондріальної пори в реакції нітрузування та окиснення. Крім того, отримані дані щодо ролі mtNOS у регуляції рівня кальцію в мітохондріях. У нормі mtNOS перешкоджає надходженню надлишку кальцію в мітохондрію, за умов ішемії при підвищенні активності mtNOS відбувається підвищення внутрішньомітохондріального кальцію і відкриття мітохондріальної пори. Можливо на початкових стадіях патологічного процесу ця реакція відіграє захисну роль, тому що регулюючи кальцій-залежні механізми відкриття гігантської пори, mtNOS здатна активувати компенсаторні енергетичні шунти [22]. Надалі наростаюча активність mtNOS призводить до неконтрольованого відкриття пори мітохондрій. Відомо, що mtNOS експресується під впливом прозапальних цитокинів, активних форм кисню, й її активність, у першу чергу, впливає на функціонування самих мітохондрій, а також бере безпосередню участь в індукції і регуляції апоптичної загибелі клітин [9–11]. У той самий час ефекти NO у клітині не слід розглядати тільки з позиції їхніх негативних, ушкоджуючих впливів. Саме дія NO у поєднанні з відповідним редокс-статусом мітохондрій обумовлює захисні ефекти, які підвищують резистентність клітини до несприятливих впливів. У зв'язку з цим важливо визначити той фактор, що сприяє проявам цитопротективних або цитотоксичних властивостей NO на певному етапі молекулярно-біохімічного каскаду. Напевно у міокарді спонтанно гіпертензивних тварин відбувається депривація активності eNOS, що призводить до дефіциту NO і підвищення експресії мітохондріальної iNOS, у зв'язку з чим

сприяє перетворенню мітохондрії на джерело цитотоксичних дериватів NO й ініціатора нітрозуючого стресу. Крім того, цитотоксичні деривати NO, що утворюються в надлишку, продовжують пригнічувати активність ендотеліальної NO-синтази, що в свою чергу призводить до подальшого підйому артеріального тиску та інтенсифікації механізмів пошкодження органів-мішеней. Саме в цитозолі визначали виражену депривацію активності загальної NOS, яка зворотно пропорційна значенню артеріального тиску. Встановлено коригуючу дію досліджуваних засобів (крім квінаприлу при монотерапії) щодо показників системи оксиду азоту в цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату міокарда щурів з артеріальною гіпертензією. Найбільший нормалізуючий ефект щодо вмісту нітритів як у мітохондріях, так і в цитозолі гомогенату міокарда був визначений у щурів, яким вводили ірбесартан з ангіоліном. Уведення ірбесартану з ангіоліном ефективно знижувало інтенсивність нітрозуючого стресу, про що свідчить зниження в 2,4 разу концентрації ніротирозину в мітохондріях міокарда. Комбінація ангіоліну з ірбесартаном сприяла нормалізації співвідношення eNOS / iNOS у міокарді і достовірно підвищувала активність загальної NOS у цитозолі міокарда. Подібна дія ангіоліну узгоджується з нашими попередніми дослідженнями, якими показано, що препарат не чинить прямої стимулюючої дії на активність NOS (але може впливати на її експресію), але підвищує біодоступність NO за рахунок збереження відновлених тіолів [20]. Крім того, ми припускаємо, що ангіолін сам може бути переносником NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси. Ангіолін при монотерапії, особливо при сполученні з блокаторм рецепторів ангіотензину II, у більшому ступеню зменшував інтенсивність

нітрозуючого стресу, ніж у комбінації з квінаприлом. На підставі даних літератури [3] можна припустити, що ангіолін підвищував експресію ендогенної кардіопротекції за рахунок зростання вмісту білків теплового шоку в мітохондріях та цитозолі гомогенату міокарда щурів, що було нами попередньо встановлено [16]. Отримані дані свідчать про здатність ірбесартану, ангіоліну та їхніх сполучень впливати на показники системи NO. Квінаприл не змінював показники NO в мітохондріальній фракції, а в цитозольній лише достовірно підвищував концентрацію ендотеліальної NO-синтази. Результати досліджень свідчать про більш виражений вплив ірбесартану на метаболізм NO-системи в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією порівняно з квінаприлом. Таким чином, на підставі отриманих молекулярно-біохімічних досліджень нітроксидергічної системи міокарда в SHR щурів були отримані докази ендотеліопротекторної дії ангіоліну [8], а також виявлено посилення цього виду активності при комбінуванні з модуляторами ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС).

Висновки

1. У цитозольній і мітохондріальній фракціях міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією зменшувалась активність загальної NO-синтази та концентрація нітритів, у цитозольній фракції – концентрація ендотеліальної NO-синтази. У мітохондріальній фракції міокарда щурів зростала концентрація індукбельної NO-синтази та ніротирозину.
2. Ангіолін, ірбесартан, сполучення ангіоліну з ірбесартаном та квінаприлом відновлювали показники NO системи в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією при внутрішньошлунковому введенні протягом 3 місяців.

1. Роль ендотеліальної дисфункції та системного імунного запалення у виникненні ішемії міокарда при фізичному навантаженні у хворих з гемодинамічно незначущим атеросклерозом вінцевих артерій серця / К. М. Амосова, О. Т. Стременик, Є. В. Андреев [та ін.] // Укр. кардіол. журнал. – 2011. – № 4. – С. 14–19.
2. Корекція дисфункції ендотелію як актуальний напрямок превентивної судинної медицини / Л. Г. Воронков, І. Д. Мазур, М. Р. Ільницька, Л. С. Вайда / Кровообіг та гомеостаз. – 2015. – № 1. – С. 5–8.

3. The effects of strentiny on shear stress: Relevance to endothelial injury and repair / K. Van der Heiden, F. J. Gijzen, A. Narraco [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2013. – V. 99. – P. 269–275.
4. Прусакова О. Ю. Коррекция эндотелиальной дисфункции, легочной гипертензии у больных с артериальной гипертензией в сочетании с бронхиальной астмой / О. Ю. Прусакова // *Совр. проблемы науки и образования.* – 2011. – № 6. – С. 13–20.
5. Канорский С. Г. Преимущества терапии квинаприлом у пациентов с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью I–II функционального класса и сохранной фрикцией фиброза левого желудочка / С. Г. Канорский, В. Г. Трегубов, В. М. Покровский // *Кардиология.* – 2012. – Т. 5., № 4. – С. 18.
6. Подзолков А. И. Значение ирбесартана в клинической практике / А. И. Подзолков, А. И. Тарзианова // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* – 2014. – Т. 10, № 6. – С. 659–664.
7. Pleiotropic effects of the acute and chronic inhibition of the renin-angiotensin system in hypertensives / K. Stamatelopoulos, D. Bramos, E. Manios [et. al] // *J Hum Hypertens.* – 2014. – № 28. – P. 378–383.
8. *Belenichev I. F.* The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate(s)-2,6-diaminohexanoic acid(Lysinium) effect on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the characteristics of animals with cerebral ischemia / I. F. Belenichev, I. A. Mazur, N. V. Bukhtiyarova // *Neurochemical journal.* – 2013. – V. 7, № 4.–P. 296–303.
9. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
10. Nitric oxide metabolism / E. Kowalczyk, A. Kopff, M. Kopff [et al.] // *Wiad. Lek.* – 2006. – V. 59, № 11–12. – P. 889–893.
11. *Garaliene V.* Endothelium and nitric oxide / V. Garaliene // *Medicina.* – 2008. – V. 44, № 7.–P. 564–569.
12. Intermittent pneumatic compression regulates expression of nitric oxide synthases in skeletal muscles / X. Tan, W. Nqi, X. Gu [et al.] // *J. Biomechanics.* – 2006. – V. 13, № 39. – P. 2430–2437.
13. Механизмы развития эндотелиальной дисфункции и перспективы коррекции / С. Г. Дзучков, И. В. Можаева, Е. А. Такоева [и др.] // *Фундаментальные исследования.* – 2014. – № 4. – С. 198–204.
14. 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.
15. Доклинические исследования лекарственных средств : метод. рекомендации; под ред. А. В. Стефанова. – Киев : Авиценна, 2002. – 560 с.
16. Доклиническое изучение специфической активности эндотелиопротективных препаратов. Методические рекомендации / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Н. А. Горчакова [и др.]. – Киев, 2014. – 60 с.
17. Доклінічне вивчення специфічної активності потейційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції. Методичні рекомендації / І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, О. О. Нагорна [и др.]. – Київ : ТОВ «Видавництво «Юстон», 2016. – 80 с.
18. Патент № 13132 України Спосіб визначення активності ферменту NO-синтази в гомогенатах тканин / І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова, МПК JOIN 33/48. – (UA). – № 200509119. – Заявл. 27.09.2005.
19. Вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх комбінацій на вміст аденілових нуклеотидів, білків теплового шоку та мітохондріальну функцію / О. О. Нагорна, І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова / *Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».* – 2015. – Т. 15, Вип. 3, ч. 2. – С. 240–246.
20. Functional nitric oxide conjugate systems state / restored heart thiols of rats in modeling isadrine-pituitrin's myocardial infarction using metabolite-tropic cardioprotector «Angiolin» / I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko, E. A. Nagornaya // *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology.* – 2015. – V. 4, № 1. – P. 12–23.
21. *Belenichev I. F.* The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / Belenichev I. F., Gorbacheva S. V., Bukhtiyarova N. V. // *Neurochemical Journal.* – 2014. – V. 8, № 1. – P. 24–27.
22. Підвищена чутливість мітохондріальної пори до Ca²⁺ у серці щурів зі спонтанною гіпертензією / Н. А. Стругинська, Н. О. Дорофеева, Г. Л. Вавілова, В. Ф. Сагач // *Фізіол. журнал.* – 2012. – Т. 52, № 6. – С. 3–8.

О. О. Нагорна, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова, І. С. Чекман

Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на систему оксиду азоту в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

Ендотеліальна дисфункція має значення в патогенезі артеріальної гіпертензії. Можливість впливу на ендотелій визначена в ірбесартану, квінаприлу та нового похідного триазолу – ангіоліну.

Мета дослідження – встановити вплив ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на показники системи NO у цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією.

Протягом 3 місяців внутрішньошлунково щурам зі спонтанною артеріальною гіпертензією вводили ірбесартан (30 мг/кг), квінаприл (10 мг/кг), ангіолін (100 мг/кг), а також комбінації ірбесартану з ангіоліном та квінаприлу з ангіоліном. У цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату міокарда щурів визначали загальну активність NO-синтази флюориметричним методом, вміст нітритів, які є стабільними метаболітами оксиду азоту, спектрофотометрично за Гріссом, у мітохондріальній фракції також – концентрацію нітротирозину імуноферментним методом кількісного вимірювання нітрозилітичних протеїнів. Концентрацію індукційної NO-синтази в мітохондріальній фракції та ендотеліальної NO-синтази в цитозольній фракції гомогенату міокарда щурів ідентифікували методом вестернблотингу.

У щурів з артеріальною гіпертензією в цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату міокарда щурів понизилася активність загальної NO-синтази. У цитозольній фракції гомогенату щурів зменшилася концентрація ендотеліальної NO-синтази, у мітохондріальній фракції – підвищилася концентрація індукційної NO-синтази та вміст нітротирозину, що свідчить про розвиток нітрозуючого стресу.

Ірбесартан, ангіолін, їхня комбінація, а також сполучення квінаприлу з ангіоліном відновлюють показники NO-системи в цитозольній і мітохондріальній фракціях міокарда, що свідчить про наявність у них ендотеліопротекторної дії. Квінаприл не впливав на показники NO-системи в мітохондріальній фракції гомогенату міокарда щурів, у цитозольній фракції – лише підвищував концентрацію ендотеліальної NO-синтази. Це свідчить про те, що за ендотеліопротекторною активністю квінаприл поступається ірбесартану та ангіоліну.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, ірбесартан, квінаприл, ангіолін, оксид азоту

Е. А. Нагорная, И. Ф. Беленичев, Н. А. Горчакова, И. С. Чекман
Действие ирбесартана, квинаприла, ангиолина и их комбинаций на систему оксида азота в миокарде крыс со спонтанной артериальной гипертензией

Эндотелиальная дисфункция имеет значение в патогенезе артериальной гипертензии. Возможность влияния на эндотелий выявлена у ирбесартана, квинаприла и нового производного триазола – ангиолина.

Цель исследования – установить влияние ирбесартана, квинаприла, ангиолина и их комбинаций на показатели системы NO в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената сердца крыс со спонтанной артериальной гипертензией.

В течение 3 месяцев внутрижелудочно крысам со спонтанной артериальной гипертензией вводили ирбесартан (30 мг/кг), квинаприл (10 мг/кг), ангиолин (100 мг/кг), а также комбинации ирбесартана с ангиолином и квинаприла с ангиолином. В цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената миокарда крыс определяли общую активность NO-синтазы флюориметрическим методом, содержание нитритов, которые являются стабильными метаболитами оксида азота, спектрофотометрически по Гриссу, в митохондриальной фракции также – концентрацию нитротирозина иммуноферментным методом количественного измерения нитрозилитических протеинов. Концентрацию индукционной NO-синтазы в митохондриальной фракции и эндотелиальной NO-синтазы в цитозольной фракции гомогената миокарда крыс идентифицировали методом вестернблоттинга.

У крыс с артериальной гипертензией в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената миокарда снизилась активность общей NO-синтазы. В цитозольной фракции гомогената крыс уменьшились концентрация эндотелиальной NO-синтазы, в митохондриальной фракции – повысилась концентрация индукционной NO-синтазы и содержание нитротирозина, что свидетельствует о развитии нитрозирующего стресса. Ирбесартан, ангиолин, их комбинация, а также сочетания квинаприла с ангиолином восстанавливают показатели NO-системы в цитозольной и митохондриальной фракциях миокарда, что свидетельствует о наличии у них эндотелиопротекторного действия. Квинаприл не влияет на показатели NO-системы в митохондриальной фракции гомогената миокарда крыс, в цитозольной фракции – только повышает концентрацию эндотелиальной NO-синтазы. Это свидетельствует о том, что по эндотелиопротекторной активности он уступает ирбесартану и ангиолину.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, ирбесартан, квинаприл, ангиолин, оксид азота

Е. А. Nagornaya, I. F. Belenichev, N. A. Gorchakova, I. S. Chekman
Action of irbesartan, quinapril, angiolin and their combinations on NO system in rat myocardium with spontaneous hypertension

Endothelial dysfunction is important in the pathogenesis of arterial hypertension. The ability of irbesartan, quinapril, and derivatives of triazole – angiolin to influence the endothelium function was detected.

The aim of the study was to determine the effect of irbesartan, quinapril, angiolin, and their combinations on NO metabolism in the cytosolic and mitochondrial fractions of hearts homogenate obtained from spontaneous hypertensive rats.

Within 3 months the rats with spontaneous arterial hypertension were intragastrically treated with irbesartan (30 mg/kg), quinapril (10 mg/kg), angiolin (100 mg/kg) and the combinations of irbesartan with angiolin and quinapril with angiolin. In the cytosolic and mitochondrial fractions of rat myocardium homogenate the general activity of NO-synthase was determined by fluorimetric method, the nitrite content (stable metabolite of nitric oxide) was estimated by Griess spectrofluorimetric method: in the mitochondrial fraction the concentration of nitrotyrosine was also determined by enzyme immunoassay of nitrosyl proteins. The concentrations of inducible NO-synthase in the mitochondrial fraction and endothelial NO-synthase in cytosolic fraction of rat myocardium homogenate were identified by Western blotting method.

In rats with arterial hypertension in the cytosolic and mitochondrial fractions of myocardium homogenate the activity of general NO-synthase had decreased. Concentration of endothelial NO-synthase appeared to be decreased in the cytosolic fraction of rat homogenate while in the mitochondrial fraction concentration of inducible NO-synthase and nitrotyrosine content increased, indicating the development of nitrosating stress. Irbesartan, angiolin, a combination of both, as well as the combination of quinapril with angiolin restore the parameters of NO-system in the cytosolic and mitochondrial myocardium fractions, indicating their endothelium action. Quinapril does not affect the NO-system parameters in the mitochondrial fraction of rat myocardium homogenate, but increases the concentration of endothelial NO-synthase in cytosolic fractions, indicating that its endothelium activity is weaker than angiolin and irbesartan have been demonstrated.

Key words: arterial hypertension, irbesartan, quinapril, angiolin, nitric oxide

Надійшла: 24 березня 2016 р.

Контактна особа: Нагорна О. О., кандидат медичних наук, доцент, кафедра фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 97 922 88 88. Електронна пошта: E.nagornaya@ukr.net

С. В. Павлов, К. В. Левченко

Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: кардіоміоцити, гіпоксія *in vitro*, селективні модулятори естрогенових рецепторів

Захворюваність на ішемічну хворобу серця в Україні, зокрема на гострий інфаркт міокарда, неухильно зростає впродовж останніх років. За даними В. М. Коваленка частота ішемічної хвороби серця в структурі смертності в Україні становить близько 60 %, що дає підстави вважати розвиток та дестабілізацію цього захворювання провідною проблемою сучасної медицини. Щорічно в Україні реєструють 50 тисяч випадків інфаркту міокарда [1], з них вмирає 30 % пацієнтів, не дивлячись на те, що більшість з них отримували терапію. Тому вивчення та створення нових кардіопротективних лікарських засобів є актуальним [1, 2]. Сьогодні пошук нових кардіо- та нейропротекторів проводиться серед так званих «природних модуляторів», а саме нейроактивних стероїдних гормонів [3, 4]. Виявлення великої кількості естрогенових рецепторів у тканинах, які не є класичними мішенями естрогенів, причому в індивідів як жіночої, так і чоловічої статі, свідчить про те, що естрогени регулюють в організмі не тільки репродуктивні процеси [4–7]. Звертає увагу велика щільність естрогенових рецепторів обох типів (α та β типів) у серці, а також ендотелії коронарних судин [8]. Все це зумовлює перспективність подальшого вивчення кардіопротективних властивостей естрогенів. Однак впровадження в клініку естрогенів як кардіопротективних препаратів обмежується їхньою прямою гормональною активністю, а також неоднозначним впливом на систему згортання крові.

У зв'язку з цим перспективним видається застосування як агоністів

естрогенових рецепторів так званих селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM). Селективні модулятори естрогенових рецепторів – хімічні сполуки з вибірковою, як естроген-агоністичним, так і естроген-антагоністичним впливом на різні органи та тканини, це залежить від дози та типу ER-рецепторів [7, 9, 10].

Мета дослідження – вивчення цитопротективної дії SERM за умов моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*.

Матеріали та методи. Експериментальну частину виконано на статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях масою 190–230 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Усі маніпуляції з тваринами виконували під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньочеревинно) [11, 12]. Гіпоксію *in vitro* моделювали шляхом внесення в суспензію кардіоміоцитів роз'єднувача тканинкового дихання – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФП) у концентрації 0,6 мкмоль/л. З цією метою подрібнені шматочки міокарда розміром 1–2 мм³ вносили в буферний розчин об'ємом 7 мл, який містить 0,3 моль/л сахарози, 250 мкмоль/л ЕДТА, 5 ммоль/л трис, рН 7,4; додавали 0,6 мкмоль/л МФП та інкубували – 120 хв при 20 °С. Досліджувані препарати – тамоксифену цитрат (серія № 52093Д) та референс-препарат – естрадіолу валерат (серія № EF3300) в інкубаційне середовище вносили в концентрації 10⁻⁷ моль/л. Кардіопротективні ефекти досліджуваних препаратів оцінювали за їхньою здатністю впливати на енергетичний метаболізм, зменшувати явища оксидативного стресу та вміст у суспензії кардіоміоцитів гомоцистеїну [11, 12].

Експериментальні серії суспензій:

- інтактна (інкубація суспензії кардіоміоцитів 120 хв без додавання МФП), (n = 10);
- контрольна (120-хв інкубація з МФП), (n = 10);
- МФП-гіпоксія + естрадіолу валерат (120-хв інкубація з МФП з додаванням 10^{-7} моль/л естрадіолу), (n = 10);
- МФП гіпоксія + тамоксифену цитрат (120-хв інкубація з МФП з додаванням 10^{-7} моль/л тамоксифену), (n = 10).

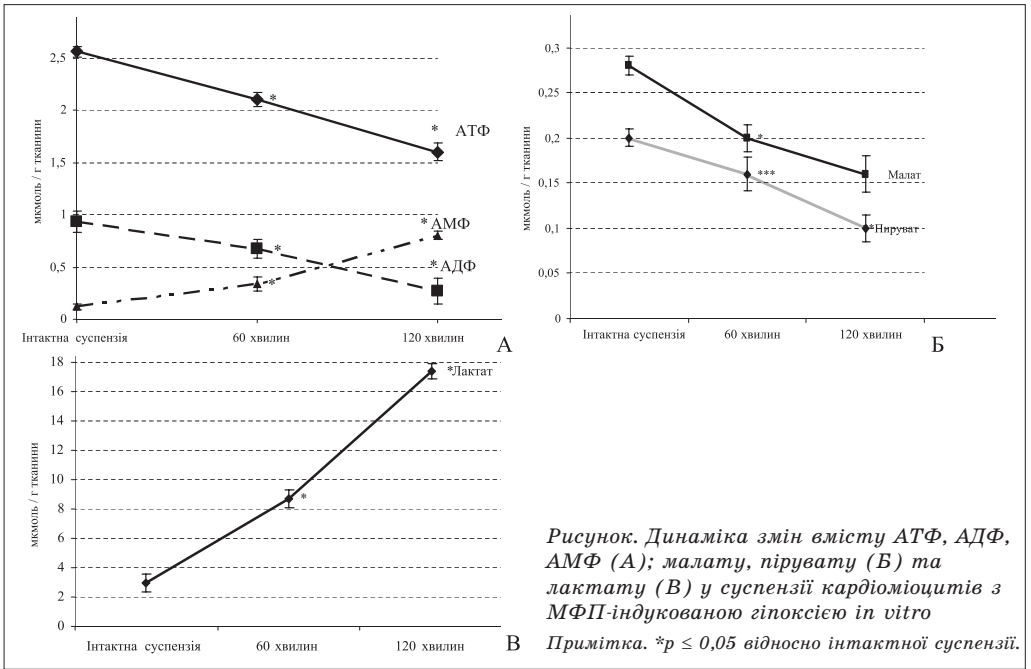
Стан енергетичного метаболізму визначали за рівнем макроергічних фосфатів (АТФ, АДФ, АМФ), а також лактату, малату та пірувату; інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за допомогою імуоферментного визначення нітротирозину (НТЗ) та гомоцистеїну (ГЦ) [12].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність відмінностей проводили з використанням t-критерію Стьюдента [13].

Результати та їх обговорення. Розроблені натепер методи моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro* дозволяють отримати якісно нову та достовірну інформацію про стан кардіоміоцитів за умов патологічних процесів та

вплив на них медикаментозних препаратів, що досліджуються. З літературних джерел відомо, що модель МФП-індукованої гіпоксії відображає патологічні процеси в клітині, що відбуваються за умов ішемії *in vivo* [7, 12, 14].

Дійсно, внесення в інкубаційне середовище 0,6 мкмоль/л МФП призвело до каскаду патобіохімічних змін кардіоміоцитів, характерних для гіпоксичного пошкодження тканин. Так, на 120 хв МФП-індукованої гіпоксії було зареєстровано виражений енергодефіцит, який є невід'ємною частиною гіпоксії, оскільки виникає внаслідок порушення трофіки тканини [3]. Енергодефіцит проявлявся дисбалансом умісту в клітинах макроергічних фосфатів, а саме, статистично вірогідно зменшувалися концентрації АТФ та АДФ на тлі збільшення концентрації АМФ. Крім того, внаслідок гальмування аеробного окиснення виникла компенсаторна активація гліколізу та порушення функціонування циклу Кребса, що спричиняло значний перерозподіл його проміжних продуктів. Результатом цих процесів було значне падіння вмісту пірвиноградної кислоти та малату на тлі значного накопичення концентрації лактату, як «тупікового» продукту енергетичного метаболізму кардіоміоцитів (рисунок, А-В).



Для повноти уявлення про метаболічні порушення, що виникають у кардіоміоцитах за умов гіпоксії *in vitro*, було досліджено вміст деяких маркерів оксидативного стресу, а саме нітротирозину та гомоцистеїну. Проведені дослідження показали, що на 120 хв гіпоксії в кардіоміоцитах інтенсифікуються процеси вільнорадикального окиснення, внаслідок чого реєструвалося накопичення цито- та геномотоксичних маркерів окисного стресу – НТЗ та ГЦ (табл. 1).

Звертає увагу значне накопичення цитотоксичної сполуки – ГЦ (на 83 %), що відіграє провідну роль у порушенні енергопродукуючої функції мітохондрій, виснаженні енергетичних запасів клітини; призводить до посилення оксидативного пошкодження функціонально-активних білків [15, 16]. Дійсно, паралельно зі збільшенням вмісту ГЦ відбувалося значне підвищення вмісту маркера окисної деструкції білкових молекул – НТЗ (табл. 1), що є також однією з основних ланок розвитку енергодефіциту за гіпоксії, враховуючи те, що нітрозуючому стресу під-

давалися не тільки білки мембрани кардіоміоцитів та їхніх органел, але й білки дихального ланцюга мітохондрій.

Внесення до інкубаційного середовища тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л) призводило до певного обмеження оксидативного стресу, що проявлялось у статистично вірогідному зменшенні концентрації як нітротирозину, так і гомоцистеїну. Дія досліджуваних препаратів була односпрямованою, однак, різного ступеня. Так, тамоксифен більш ефективно, ніж естрадіол впливав на вміст гомоцистеїну, зменшуючи його концентрацію на 76 та 65 % відповідно. Зменшення вмісту НТЗ у суспензії кардіоміоцитів за внесення тамоксифену та естрадіолу в середньому складало 50 %.

Встановлений вплив тамоксифену та естрадіолу на прояви оксидативного стресу певною мірою пояснює їхню здатність покращувати енергетичний метаболізм кардіоміоцитів за умов гіпоксичного пошкодження. Як видно з таблиці 2, естрадіол та, особливо, тамоксифен призводять до збільшення концентрації АТФ на 11 та 20 % відповідно, АДФ у

Таблиця 1

*Уміст нітротирозину та гомоцистеїну в кардіоміоцитах за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* та впливу тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л), $M \pm m$, $n = 10$*

Суспензія кардіоміоцитів	Гомоцистеїн, ммоль/л	Нітротирозин, ум. од./г білка
Інтактна	0,81 ± 0,07	0,47 ± 0,02
Контрольна (МФП-гіпоксія)	4,76 ± 0,21	1,50 ± 0,21
МФП-гіпоксія + естрадіол	1,66 ± 0,18*	0,730 ± 0,036*
МФП-гіпоксія + тамоксифен	1,096 ± 0,014**	0,70 ± 0,04*

Примітка. Тут і в табл. 2: * $p \leq 0,05$ відносно контрольної суспензії; ** $p \leq 0,05$ відносно естрадіолу.

Таблиця 2

*Показники енергетичного метаболізму в кардіоміоцитах за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* та впливу тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л), $M \pm m$, $n = 10$*

Показник	Контрольна суспензія (МФП)	МФП-гіпоксія + естрадіол	МФП-гіпоксія + тамоксифен
АТФ, мкмоль/г тканини	1,60 ± 0,07	1,80 ± 0,09*	2,0 ± 0,11**
АДФ, мкмоль/г тканини	0,30 ± 0,02	0,70 ± 0,04*	0,80 ± 0,03*
АМФ, мкмоль/г тканини	0,90 ± 0,025	0,60 ± 0,03*	0,40 ± 0,02**
Малат, мкмоль/г тканини	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,03*	0,25 ± 0,05**
Піруват, мкмоль/г тканини	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,04*	0,180 ± 0,015*
Лактат, мкмоль/г тканини	18,90 ± 1,56	11,50 ± 0,74*	8,56 ± 0,70**

середньому на 63 % та зменшення вмісту АМФ на 33 та 55 % відповідно. Важливо відзначити, що паралельно з відновленням внутрішньоклітинного балансу макроергів, досліджувані препарати достовірно підвищували кількість пірувату та малату на фоні зниження концентрації молочної кислоти (на 39 та 54 % відповідно), що обмежувало розвиток лактат-ацидозу за умов гіпоксії.

Таким чином, проведеними експериментами було встановлено кардіопротективну дію естрадіолу та селективного модулятора естрогенових рецепторів – тамоксифену цитрату за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro*, що проявлялося їхньою здатністю обмежувати розвиток оксидативного стресу та нормалізувати енергетичний обмін клітин. На нашу думку, подібні ефекти досліджуваних препаратів реалізуються за рахунок, перш за все, їхньої прямої антиоксидантної дії [5, 6, 8]. По-друге, естрадіол та тамоксифену цитрат здатні впливати на експресію глобальних факторів транскрипції, зокрема AP-1, який є відповідальним за синтез ключових ензимів антиоксидантної та тіол-дисульфідної систем [5, 7, 14]. Крім того, досліджувані

препарати за рахунок геномних та поза-геномних ефектів здатні збільшувати за умов гіпоксії вміст у клітинах факторів ендогенної цитопротекції, особливо HSP- та HIF-білків, що було показано нами в попередніх роботах [7, 14, 15, 17].

Встановлені нами кардіопротективні ефекти SERM обумовлюють перспективність подальших досліджень у цьому напрямі з метою впровадження даних препаратів у клінічну практику як кардіопротекторів.

Висновки

1. Встановлено цитопротективну дію естрадіолу та селективного модулятора естрогенових рецепторів – тамоксифену цитрату за умов МФП-індукованої гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*, що проявлялося їхньою здатністю обмежувати розвиток оксидативного стресу та нормалізувати енергетичний обмін клітин.
2. Встановлені цитопротективні ефекти SERM обумовлюють перспективність подальших досліджень у цьому напрямі з метою впровадження даних препаратів у клінічну практику як кардіопротекторів.

1. Коваленко В. М. Хвороби системи кровообігу у структурі смертності населення України: міфи і реальність / В. М. Коваленко, Ю. М. Сіренко А. П. Дорогой // Матеріали XIV Національного конгресу кардіологів України. – Київ, 2013.
2. Красуля О. І. Дослідження сучасного стану надання лікарської допомоги хворим на інфаркт міокарда в країнах світу та в Україні / О. І. Красуля, А. А. Котвіцька, О. О. Суриков // Запорозький медичинський журнал. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 8–10.
3. Мойбенко О. О. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / О. О. Мойбенко, В. Э. Досенко, О. М. Пархоменко. – Киев : Наук. думка, 2008. – 520 с.
4. Шимановский Н. Л. Комплексное влияние женских половых гормонов на сердечно-сосудистую систему: польза и риск / Н. Л. Шимановский // Международный медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 51–55.
5. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies / J. L. Turgeon, M. C. Carr, P.M. Maki [et al.] // Endocrine reviews. – 2006. – V. 27. – P. 575–605.
6. The role of estrogen in cardiovascular disease / L. Baler, K. Meldrum, M. Wang [et al.] // J. Surg. Res. – 2003. – V. 115 (2). – P. 325–44.
7. Pavlov S. Molecular and Biochemical Aspects of the Neuroprotective Effect of the Selective Estrogen Receptor Modulator Tamoxifen in a Model of Acute Cerebral Ischemia / S. Pavlov, I. Belenichev // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 28–32.
8. Беленичев И. Ф. Модуляторы эстрогеновых рецепторов – перспективные нейропротекторы / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, А. С. Красняк // Патология. – 2009. – Т. 6, № 2. – С. 11–13.
9. Токмаков А. А. Внегеномные механизмы действия прогестерона / А. А. Токмаков, Я. Фуками // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 5. – С. 403–416.
10. Harris H. A. Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues *in vivo* through the use of an ERalpha-selective ligand / H. A. Harris, J. A., B. S. Katzenellenbogen // Endocrinology. – 2002. – № 143. – P. 4172–4177.
11. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
12. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – Киев : ДФЦ МЗ Украины, 2010. – 81 с.

13. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : МОРИОН, 2002. – 640с.
14. The Neuroprotective Activity of Tamoxifen and Tibolone during Glutathione Depletion *in vitro* / I. Belenichev, O. Odnokoz, S. Pavlov [et al.] // *Neurochemical Journal*. – 2012. – V. 6, № 3. – P. 202–212.
15. Павлов С. В. Вплив тіольних антиоксидантів на розвиток мітохондріальної дисфункції при моделюванні гострої ішемії головного мозку / С. В. Павлов // *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. – 2013. – № 1 (18). – С. 112–115.
16. Giulivi C. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by protease / C. Giulivi, V. J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 12, № 11. – P. 8759–8762.
17. Беленичев И. Ф. Нейропротективная активность модуляторов эстрогеновых рецепторов при депривации системы глутатиона *in vitro* / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти*. – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 12–17.

С. В. Павлов, К. В. Левченко

Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*

Сьогодні пошук нових кардіо- та нейропротекторів проводиться серед так званих «природних модуляторів», а саме нейроактивних стероїдних гормонів. Виявлення великої кількості естрогенових рецепторів у тканинах, які не є класичними мішенями естрогенів, причому в індивідів як жіночої, так і чоловічої статі, свідчить про те, що естрогени регулюють в організмі не тільки репродуктивні процеси. У зв'язку з цим перспективним напрямом є застосування як агоністів естрогенових рецепторів так званих селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM).

Мета дослідження – вивчення цитопротективної дії SERM за умов моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*.

Експериментальну частину виконано на статтевозрілих білих нелінійних щурах – самцях масою 190–230 г. Гіпоксію *in vitro* моделювали шляхом внесення в суспензію кардіоміоцитів роз'єднувача тканового дихання – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФП) у концентрації 0,6 мкмоль/л. Час інкубації – 120 хв. Досліджувані препарати (тамоксифену цитрат та референс-препарат – естрадіолу валерат) в інкубаційне середовище вносили в концентрації 10^{-7} моль/л. Кардіопротективні ефекти досліджуваних препаратів оцінювали за їхньою здатністю впливати на енергетичний метаболізм; зменшувати явища оксидативного стресу.

Внесення в інкубаційне середовище 0,6 мкмоль/л МФП призвело до каскаду патобіохімічних змін кардіоміоцитів, характерних для гіпоксичного пошкодження тканин. Так, на 120 хв МФП-індукованої гіпоксії було зареєстровано виражений енергодефіцит, який проявлявся дисбалансом умісту в клітинах макроергічних фосфатів, а саме, статистично вірогідно зменшувалися концентрації АТФ та АДФ на тлі збільшення концентрації АМФ. Паралельно з цим на 120 хв гіпоксії в кардіоміоцитах інтенсифікувалися процеси вільнорадикального окиснення, внаслідок чого реєструвалося накопичення цито- та геномотоксичних маркерів окисного стресу – нітротирозину (НТЗ) та гомоцистеїну. Внесення до суспензій кардіоміоцитів з моделлю гіпоксії *in vitro* тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л) призводило до певного обмеження оксидативного стресу, що проявлялося в статистично вірогідному зменшенні концентрації як нітротирозину, так і гомоцистеїну. Дія досліджуваних препаратів була односпрямованою, однак різного ступеня. Так, тамоксифен більш ефективно ніж естрадіол впливав на вміст гомоцистеїну, зменшуючи його концентрацію на 76 та 65 % відповідно. Зменшення НТЗ у суспензії кардіоміоцитів з внесенням тамоксифену та естрадіолу в середньому складало 50 %. За рахунок високої антиоксидантної активності досліджувані препарати покращували енергообмін клітини, збільшуючи вміст у суспензії кардіоміоцитів АТФ, АДФ та зменшуючи вміст АМФ.

Встановлені цитопротективні ефекти тамоксифену цитрату та естрадіолу валерату є експериментальним обґрунтуванням актуальності та перспективності подальших досліджень у цьому напрямі.

Ключові слова: кардіоміоцити, гіпоксія *in vitro*, селективні модулятори естрогенових рецепторів

С. В. Павлов, Е. В. Левченко

Цитопротективные эффекты селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов в условиях гипоксии кардиомиоцитов *in vitro*

На сегодняшний день поиск новых кардио- и нейропротекторов проводится среди так называемых «природных модуляторов», а именно нейроактивных стероидных гормонов. Обнаружение большого количества эстрогеновых рецепторов в тканях, которые не являются классическими мишенями эстрогенов, причем у индивидов как женского, так и мужского пола, свидетельствуют о том, что эстрогены регулируют в организме не только репродуктивные процессы. В связи с этим, перспективным направлением является применение в качестве агонистов эстрогеновых рецепторов так называемых селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (SERM).

Цель исследования – изучение цитопротективных свойств SERM в условиях моделирования гипоксии кардиомиоцитов *in vitro*.

Экспериментальная часть выполнена на половозрелых белых нелинейных крысах-самцах массой 190–230 г. Гипоксию *in vitro* моделировали путем внесения в суспензию кардиомиоцитов разоб-

шителя тканевого дыхания – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФП) в концентрации 0,6 мкмоль/л. Время инкубации – 120 мин. Исследуемые препараты (тамоксифена цитрат и референс-препарат эстрадиола валерат) в инкубационную среду вносили в концентрации 10^{-7} моль/л. Кардиопротективные эффекты исследуемых препаратов оценивали по их способности влиять на энергетический метаболизм; уменьшать явления оксидативного стресса.

Внесение в инкубационную среду 0,6 мкмоль/л МФП приводило к каскаду патобиохимических изменений кардиомиоцитов, характерных для гипоксического повреждения тканей. Так, на 120 мин МФП-индуцированной гипоксии был зарегистрирован выраженный энергодефицит, который проявлялся дисбалансом содержания в клетках макроэргических фосфатов, а именно, статистически достоверно уменьшались концентрации АТФ и АДФ на фоне увеличения концентрации АМФ. Параллельно с этим, на 120 мин гипоксии в кардиомиоцитах интенсифицировались процессы свободнорадикального окисления, в результате чего регистрировалось накопление цито- и геномотоксичных маркеров окислительного стресса – нитротирозина (НТЗ) и гомоцистеина. Внесение в суспензию кардиомиоцитов с моделью гипоксии *in vitro* тамоксифена (10^{-7} моль/л) и эстрадиола (10^{-7} моль/л) приводило к определенному ограничению оксидативного стресса, что проявлялось в статистически достоверном уменьшении концентрации как нитротирозина, так и гомоцистеина. Действие исследуемых препаратов было однонаправленным, однако выражено в различной степени. Так, тамоксифен эффективнее, чем эстрадиол влиял на содержание гомоцистеина, уменьшая его концентрацию на 76 и 65% соответственно. Уменьшение НТЗ в суспензии кардиомиоцитов с внесением тамоксифена и эстрадиола в среднем составляло 50%. За счет высокой антиоксидантной активности исследуемые препараты улучшали энергообмен клетки, увеличивая содержание в суспензии кардиомиоцитов АТФ, АДФ и уменьшая содержание АМФ. Установленные цитопротекторные эффекты тамоксифена цитрата и эстрадиола валерата являются экспериментальным обоснованием актуальности и перспективности дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: кардиомиоциты, гипоксия *in vitro*, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов

S. V. Pavlov, K. V. Levchenko

Cytoprotective effects of selective modulators of estrogen receptors in hypoxia of cardiomyocytes *in vitro*

Today, the search of new cardio- and neuroprotectors are held among the so-called «natural modulators», namely neuroactive steroid hormones. Detection of a large number of estrogen receptors in tissues that are not classic targets of estrogen in individuals both female and male, indicates that estrogens regulate not only the reproductive processes in the body. The use of so-called selective estrogen receptor modulators (SERM) as agonists of estrogen receptors is an interesting direction.

The aim of research is to study the cytoprotective action of SERM on the cardiomyocytes' hypoxia model *in vitro*.

Experimental part was made on nonlinear mature white rats – males weighing 190–230 g. Hypoxia *in vitro* was modeled by introducing into the suspension of the cardiomyocytes of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MFD) at a concentration of 0,6 mM as tissue respiration uncoupler. Incubation time was 120 min. The studied drugs (tamoxifen citrate and reference-drug estradiol valeras) were added to the incubation medium at a concentration of 10^{-7} M. Cardioprotective effects of studied drugs were evaluated for their ability to influence on energy metabolism; to reduce the effects of oxidative stress.

Adding 0,6 mM of MFD to the incubation medium has led to a cascade of pathobiochemical changes of cardiomyocytes characteristic for hypoxic tissue damage. Thus, for 120 min of hypoxia-induced MFD were registered the pronounced energy deficit which expressed by imbalance of macroergic phosphates content in the cells, namely statistically significant decrease in the concentration of ATP and ADP against the background of increasing of AMP concentration. Parallel to this in 120 min of hypoxia the processes of free radical oxidation were intensified in cardiomyocytes, therefore, the accumulation of cyto- and genotoxic markers (nitrotyrosine and homocysteine) of oxidative stress were recorded. Adding of tamoxifen (10^{-7} M) and estradiol (10^{-7} M) to the cardiomyocytes suspension with modeling of hypoxia *in vitro* has resulted in some extent the limitation of oxidative stress, which manifested in a statistically significant decrease of nitrotyrosine and homocysteine concentrations. Action of studied drugs was unidirectional, but with different degree of action. So, tamoxifen better than estradiol affects to the content of homocysteine, reducing its concentration respectively to 76 and 65%. The reduction of nitrotyrosine in suspension of cardiomyocytes with the introduction of tamoxifen and estradiol averaged 50%. Due to the high antioxidant activity studied drugs have improved the energy exchange of cells, increasing the content of ATP, ADP in cardiomyocytes suspension and reducing AMP content. Determined effects of tamoxifen citrate and estradiol valeras are an experimental substantiation of relevance and perceptivity for further research in this area.

Key words: cardiomyocytes hypoxia *in vitro*, selective estrogen receptor modulators

Надійшла: 29 червня 2016 р.

Контактна особа: Павлов Сергій Васильович, доктор біологічних наук, доцент, кафедра клінічної лабораторної діагностики, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: +38 0 97 797 08 84. Електронна пошта: zsmu.smu@yandex.ua.

О. А. Фалюш, Л. І. Полякова, О. В. Сачинська, О. Г. Резніков

Зміни епітеліально-стромального співвідношення у трансплантатах раку передміхурової залози людини при застосуванні наночастинок золота

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», м. Київ

Ключові слова: наночастинок золота, рак передміхурової залози, ксенографти, миші

Передміхурова залоза (ПЗ) належить до андрогензалежних органів, що підтверджується її атрофією після кастрації. Таку саму гормональну залежність виявляє й більшість випадків раку ПЗ (РПЗ), що стало підґрунтям широкого застосування антиандрогенної фармакотерапії як методу паліативного лікування хвороби, зокрема, за наявності метастазів [1].

За останні десятиліття медицина збагатилася новими знаннями про механізми злоякісної трансформації клітин і досвідом лікування цієї хвороби. Але через деякий час після початку гормональної терапії настає рецидив внаслідок втрати чутливості злоякісних клітин до андрогенів, а отже і до застосованих гормональних препаратів. Тому продовжуються пошуки альтернативних методів терапії злоякісної пухлини ПЗ, спираючись на уявлення про патогенез РПЗ і сучасні новітні технології [2].

Останніми роками швидкими темпами розвивається наномедицина, яка використовує особливі властивості нанорозмірних частинок металів та інших матеріалів. Чільне місце серед нанорозмірних матеріалів, що застосовуються для діагностичних і терапевтичних цілей, посідають наночастинок золота (НЧЗ), які застосовують як медіатор при фототермічній та фотодинамічній терапії пухлин [3, 4], або як діагностичний онкомаркер на поверхні чи всередині клітини [5]. Наразі залишається відкритим питання щодо можливості самостійного використання НЧЗ як протипухлинних препаратів.

Продемонстровано цитотоксичний ефект НЧЗ на моделях клітинних культур РПЗ ліній LNCaP [6] та PC-3 [7]. Раніше нами було виявлено гальмування росту ксенографтів РПЗ людини в мишей та патоморфологічні зміни в них під впливом полідисперсного колоїдного розчину НЧЗ [8]. Зважаючи на те, що РПЗ походить з ацинарних епітеліальних клітин ПЗ, було доцільним дослідити селективність впливу НЧЗ саме на ці структурні елементи пухлини. *Мета дослідження* – кількісна характеристика співвідношення епітелію та стромы у трансплантованих мишам тканинах РПЗ людини за умов введення НЧЗ.

Матеріали та методи. Використовували полідисперсний колоїдний розчин НЧЗ, стабілізованих полівінілпіролідом (ПВП), із середнім розміром частинок 26,4 нм з переважанням середнього розміру 21,8 нм (42,5 % від загальної кількості наночастинок), наданий Науково-дослідним інститутом нанотехнологічної індустрії Відкритого міжнародного університету розвитку людини «Україна» (канд. мед. наук О. В. Усатенко). НЧЗ синтезовані цитратним методом відновлення з золотохлористоводневої кислоти [9]. Розмірні характеристики вихідного розчину підтверджено лазерно-кореляційною спектроскопією [10].

Досліди проведено на статевозрілих самцях мишей лінії СВА (20–25 г). Тварин, розподілених на групи методом рандомізації, утримували за однакових умов віварію на стандартному раціоні харчування та вільному доступі до води. Утримання та використання тварин проводили згідно з біоетичними вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких вико-

ристовують в експериментальних та інших наукових цілях (м. Страсбург, 1986 р.).

Використано пухлини, видалені доктором медичних наук В. М. Григоренком під час планової радикальної простатектомії в трьох хворих на РПЗ у ДУ «Інститут урології НАМН України» (за інформованою згодою пацієнтів). Хворі не отримували попередньої гормональної або хіміотерапії. При патоморфологічному дослідженні пухлини ідентифіковані як аденокарциноми і мали оцінку 6 балів за індексом Глісона.

Тестування протипухлинної активності проводили нефро-субкапсулярним методом [11]. Фрагменти пухлини, відібрані в стерильних умовах, доставляли в лабораторію в охолодженому середовищі MEM (Serva), що містило сольову суміш Хенкса і буфер HEPES. Пухлину нарізали на шматочки масою 1 мг і підсаджували під капсулу нирки мишей (по 2 ксенографти). Після триденного періоду вільного росту трансплантата мишам вводили підшкірно ізотонічний розчин НЧЗ у дозах 0,64 мг/кг, 1,7 мг/кг або 6,4 мг/кг маси тіла, а контрольним тваринам – розчинник впродовж подальших трьох днів. Об'єм уведеного розчину не перевищував максимально допустимий для підшкірного введення [12]. Через 24 год після останнього введення препарату тварин декапітували під легким ефірним наркозом, ксенографти і сім'яники видаляли і зважували. Протипухлинний ефект оцінювали за ступенем гальмування зростання маси ксенографтів, порівнюючи величини приросту їхньої маси в дослідній і контрольній групах, а також за гістологічними ознаками. Для гістологічного дослідження ксенографтів і сім'яників виготовляли зрізи товщиною 5–6 мкм і фарбували їх гематоксиліном та еозином.

Кількісну оцінку співвідношення площі епітелію та строми проводили на серійних зрізах ксенографтів, фарбованих за оригінальною методикою Малорі [13]. Після фарбування ядра епітеліальних клітин та лейкоцити забарвлюються в червоний з відтінками колір; слиз, колагенові та ретикулінові волокна строми – у темно-синій з відтінка-

ми; м'язеві волокна – в яскраво оранжевий; секреторні гранули епітеліальних клітин – у червоний. На фотографіях препаратів за допомогою програми Adobe Photoshop CS6 підраховували кількість пікселів червоного та синього кольорів у широкій смузі спектра, що дало можливість врахувати всі відтінки у сполучній тканині та епітелію. Статистичну обробку даних виконували в комп'ютерній програмі Excel з використанням критерію t Стьюдента. Різниця між дослідною та контрольними групами вважалася вірогідною при рівні значимості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Чутливість до андрогенів, використаних для трансплантації пухлин, перевіряли шляхом підсадки ксенографтів попередньо кастрованим мишам-реципієнтам і спостереженням за їхнім ростом. У всіх випадках мала місце зупинка росту ксенографтів, що в умовах відсутності тестикулярного тестостерону в крові свідчило про їхню гормонозалежність.

Маса ксенографтів у контрольній групі в середньому збільшувалася на 39 % ($P < 0,05$). Будова ксенографтів відображала будову первинної пухлини. Незважаючи на однаковий індекс Глісона, пухлини мали особливості в розміщенні та щільності розташувань епітеліальних утворень. У всіх трансплантатах, як контрольних, так і дослідних, на 7 день спостерігали помірну лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 1).

Введення розчину НЧЗ спричиняло повне гальмування росту ксенографтів і навіть регрес пухлин порівняно з вихідними величинами маси у відповідних групах (таблиця). У всіх дослідних групах кінцева маса ксенографтів достовірно відрізнялася від такої в групі контролю.

Результати вимірювання епітеліально-стромального співвідношення в ксенографтах у групі кастрованих тварин-реципієнтів показали зменшення в 2 рази площі епітеліальних клітин (на 49 %) порівняно з контрольною групою.

При дослідженні впливу різних доз НЧЗ дозозалежного ефекту стосовно епітеліально-стромального співвідношення не виявлено. Мінімальна досліджена

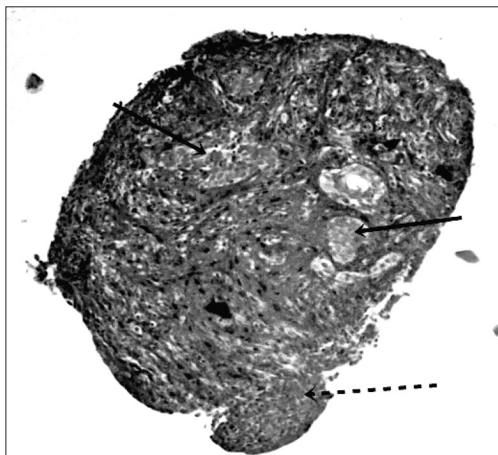


Рис. 1. Мікрофотографія ксенографта аденокарциноми передміхурової залози людини. Забарвлені епітеліальні клітини (суцільна стрілка) та скупчення лейкоцитів (пунктирна стрілка). Забарвлення за оригінальною методикою Малорі, $\times 100$

доза (0,64 мкг/кг) не спричиняла змін. При дозі 1,7 мкг/кг зменшення майже сягало рівня достовірності ($0,1 > P > 0,05$), а при збільшенні дози до 6,4 мкг/кг відбувалось достовірне зменшення відносної площі епітелію порівняно з контрольною групою (рис. 2). Проте між дозами 1,7 мкг/кг і 6,4 мкг/кг не спостерігали достовірної різниці змін площі епітелію.

Маса сім'яників у контрольній та дослідних групах не відрізнялася, і при гістологічному дослідженні залоз патологічних змін морфологічної будови клітин Лейдига та сперматогенного

епітелію не виявлено. Отже, немає підстав вважати, що гальмування росту ксенографтів та зменшення епітеліально-стромального співвідношення в наших експериментах відбувалося за рахунок послаблення секреції тестостерону сім'яними залозами, маючи на увазі андрогенну залежність ксенографтів. Таким чином, скоріш за все протигухлинний ефект НЧЗ зумовлений безпосереднім впливом препарату на пухлинну тканину.

Відсутність впливу НЧЗ на масу та гістологічну будову сперматогенного епітелію сім'яників може пояснюватись нездатністю наночастинок використаного розміру проникати через гематотестикулярний бар'єр. За даними літератури, шкідливий вплив на гонади виявлено для НЧЗ дуже малих розмірів – 2,5 та 5,0 нм [14–15].

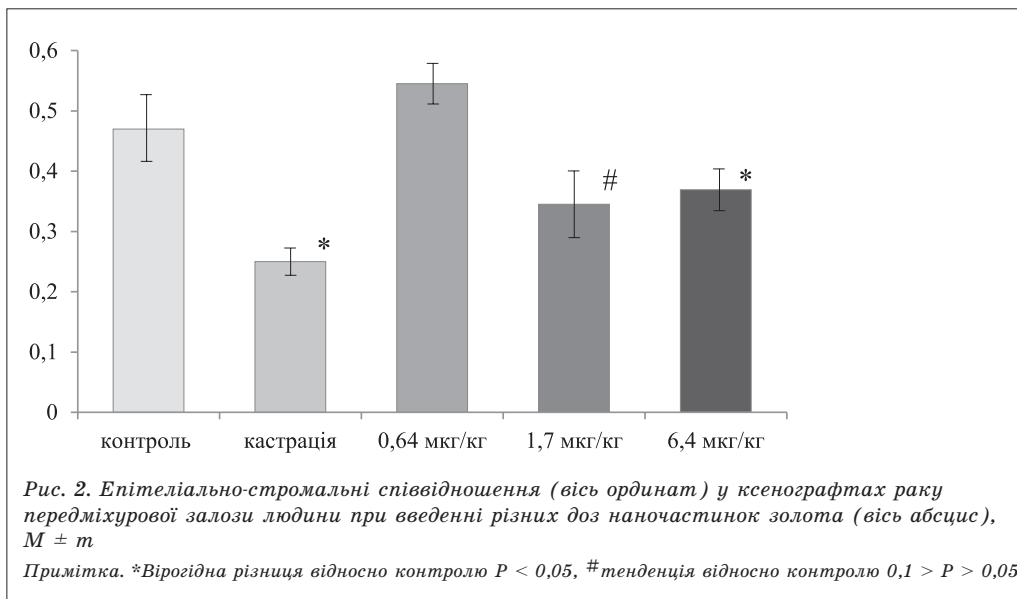
Необхідно взяти до уваги, що зменшення епітеліально-стромального співвідношення може відбуватися за рахунок збільшення площі строми внаслідок її набряку. Проте набряк, за даними гістологічного дослідження, був помірно виражений і спостерігався лише в третині ксенографтів. Ймовірно, що зменшення відносної площі епітелію є наслідком його атрофії та деструкції, які відбуваються завдяки селективному накопиченню НЧЗ у злоякісних клітинах [16]. Цей феномен пояснюють порушенням проникності клітинних мембран і зміною електрохімічних властивостей наночастинок при контакті зі

Таблиця

Маса ксенотрансплантатів аденокарциноми передміхурової залози людини, підсаджених під капсулу нирки мишей СВА, за впливу наночастинок золота, $M \pm m$

Умова досліджу	Кількість ксенографтів	Маса ксенографтів, мг		Зміна маси, % від	
		початкова	кінцева	початкової	контролю
Контроль	26	1,0 ± 0,01	1,39 ^б ± 0,09	39,0	100
Кастрація	24	1,03 ± 0,01	0,90 ^а ± 0,04	-12,6	-32,3
Наночастинки золота – 0,64 мкг/кг	14	1,0 ± 0,01	0,91 ^а ± 0,03	-9,0	-23,1
Наночастинки золота – 1,7 мкг/кг	16	1,0 ± 0,01	0,73 ^а ± 0,04	-27,0	-69,2
Наночастинки золота – 6,4 мкг/кг	16	1,0 ± 0,01	0,88 ^а ± 0,06	-12,0	-30,8

Примітка. $P < 0,05$ – вірогідна різниця відносно: ^аконтролю; ^бпочаткової маси.



злюкисними клітинами [17]. Можливо, не останню роль відіграє здатність НЧЗ впливати на функціонування потенціал-залежних калієвих каналів, що було продемонстровано на моделі гладеньком'язових клітин аорти при застосуванні НЧЗ розміром 5 нм [18].

Хоча дані вимірювання маси ксенографтів та епітеліально-стромального співвідношення не продемонстрували дозозалежного ефекту НЧЗ, результати наших попередніх гістологічних досліджень свідчать про посилення деструк-

тивної реакції при збільшенні дози препарату [8, 19].

Висновок

1. Епітеліально-стромальне співвідношення в ксенографтах РПЗ людини, трансплантованих мишам, зменшувалося після триденного введення полідисперсного колоїдного розчину НЧЗ, проте дозозалежного ефекту не виявлено.
2. Зазначений ефект зумовлений безпосереднім впливом НЧЗ на пухлинну тканину.

1. Возианов А. Ф. Эндокринная терапия рака предстательной железы / А. Ф. Возианов, А. Г. Резников, И. А. Клименко. – Киев : Наукова думка, 1999. – 277 с.
2. Резников А. Г. Гормоны и рак: механизмы канцерогенеза, роста и резистентности к эндокринной терапии / А. Г. Резников // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 4. – С. 426–438.
3. Pekkanen A. M. Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer / A. M. Pekkanen, M. R. DeWitt, M. N. Rylander // J. Biomed Nanotechnol. – 2014. – V. 10, № 9. – P. 1677–1712.
4. Bioproduction of gold nanoparticles for photothermal therapy / C. O. Silva, P. Rijo, J. Molpeceres [et al.] // Ther. Deliv. – 2016. – V. 7, № 5. – P. 287–304.
5. Nanostructured plasmonic sensor / M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson [et al.] // Chem. Rev. – 2008. – V. 108, № 2. – P. 494–521.
6. Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging / D. J. Javier, N. Nitin, M. Levy [et al.] // Bioconjugate Chem. – 2008. – V. 19. – P. 1309–1312.
7. Arnida. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres / Arnida, M. Malugin, H. Ghandehari // J. Appl. Toxicol. – 2010. – V. 30. – P. 212–217.
8. Дослідження впливу різних доз наночастинок золота на ксенографти раку передміхурової залози / О. Г. Резников, О. А. Салівоник, О. В. Сачинська [та ін.] // Урологія. – 2014. – Т. 18, № 4. – С. 17–22.
9. Пат. 87744 U UA, МПК А61К 31/79, А61К 33/00. Композиція, що містить наночастинок золота, та спосіб її одержання / О. В. Усатенко, О. Б. Щербачков, Н. Ф. Куцевська, Г. В. Повх; заявник і патентовласник О. В. Усатенко – № а200712612; заявл. 14.11.2007; опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.
10. Assessment of gold nanoparticle effect on prostate cancer LNCaP cells / A. G. Reznikov, O. A. Salivonyk., A. G. Sotkis [et al.] // Exp Oncol. – 2015. – V. 37, № 2. – P. 100–104.
11. Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse six day subrenal capsule / A. E. Bogden, W. R. Cobb, D. J. Lepage [et al.] // Cancer. – 1981. – V. 48, № 1. – P. 10–20.

12. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
13. Волкова. О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – Москва : Медицина, 1982. – 304 с.
14. Влияние наночастиц золота на сперматогенез мышей / О. В. Дементьева, Ю. М. Евдокимов, С. Т. Захидов [и др.] // Известия РАН. Серия биол. – 2012. – № 3. – С. 279–287.
15. Почепцов А. Я. Влияние наночастиц золота на пролиферативную активность половых клеток крыс / А. Я. Почепцов, Ю. И. Великородная, Б. Н. Филатов // Вест. Волг. ГМУ. – 2012. – Т. 42, № 2. – С. 47–50.
16. Резніченко Л. С. Біохімічні ефекти впливу наночастинок золота на прокаріотичні та еукаріотичні клітини / дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / Л. С. Резніченко. – Київ, 2010. – 148 с.
17. Капля А. А. Изоферменты Na⁺, K⁺-АТФ-азы и Ca²⁺- АТФ-азы в злокачественных новообразованиях / А. А. Капля, С. В. Хижняк, А. Г. Кудрявцева // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 29–41.
18. Plasmonic gold nanoparticles possess the ability to open potassium channels in rat thoracic aorta smooth muscles in a remote control manner / A. Soloviev, A. Zholo, I. Ivanova [et al.] // Vascular Pharmacology. – 2015. – V. 72. – P. 190–196.
19. Наночастишки золота виявляють протипухлинну активність у гетеротрансплантатах андрогензалежного раку передміхурової залози людини / О. Г. Резніков, Л. І. Полякова, О. В. Усатенко [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – Т. 34, № 3. – С. 58–62.

О. А. Фалюш, Л. І. Полякова, О. В. Сачинська, О. Г. Резніков
Зміни епітеліально-стромального співвідношення у трансплантатах раку передміхурової залози людини при застосуванні наночастинок золота

У попередніх дослідженнях продемонстровано пошкоджуючий вплив полідисперсного колоїдного розчину наночастинок золота (НЧЗ) на ксенографти раку передміхурової залози (РПЗ) людини та гальмування проліферації культури клітин лінії LNCaP.

Мета дослідження – кількісна характеристика співвідношення епітелію та строми у трансплантованих мишам тканинах РПЗ людини за умов введення НЧЗ.

Використовували полідисперсний колоїдний розчин наночастинок золота, стабілізованих полівінілпіролідом, з середнім розміром частинок 26,4 нм. Тестування протипухлинної активності проводили нефро-субкапсулярним методом, підсаджуючи ксенографти статевозрілим самцям мишей лінії СВА. Для трансплантації використано фрагменти пухлин, які були видалені під час планової простатектомії в трьох хворих на РПЗ. Розчин НЧЗ вводили підшкірно впродовж трьох днів у дозах 0,64 мг/кг, 1,7 мг/кг або 6,4 мг/кг маси тіла. Протипухлинний ефект оцінювали за ступенем гальмування зростання маси ксенографтів у контрольній та дослідних групах, а також за гістологічними ознаками ксенографтів. Кількісну оцінку співвідношення площі епітелію та строми проводили на серійних зрізах ксенографтів, фарбованих за методикою Малорі, з використанням програми Adobe Photoshop CS6, де підраховували кількість пікселів червоного та синього кольорів.

Маса сім'яників у контрольній та дослідних групах не відрізнялася. При гістологічному дослідженні статевих залоз патологічних змін не виявлено. Уведення розчину НЧЗ спричинило повне гальмування росту ксенографтів і навіть регрес пухлин порівняно з вихідними величинами маси у відповідних групах. Епітеліально-стромальне співвідношення в ксенографтах РПЗ людини, трансплантованих мишам, зменшувалось після триденного введення полідисперсного колоїдного розчину НЧЗ, проте дозозалежного ефекту не виявлено.

Отримані результати вказують на можливість застосування досліджуваного розчину НЧЗ як потенційного протипухлинного препарату.

Ключові слова: наночастишки золота, рак передміхурової залози, ксенографти, миші

О. А. Фалюш, Л. І. Полякова, О. В. Сачинская, А. Г. Резников
Изменения эпителиально-стромального соотношения в трансплантатах рака предстательной железы человека при применении наночастиц золота

В предыдущих исследованиях продемонстрировано повреждающее влияние полидисперсного коллоидного раствора наночастиц золота (НЧЗ) на ксенографты рака предстательной железы (РПЖ) человека и торможение пролиферации культуры клеток линии LNCaP.

Цель исследования – количественная характеристика соотношения эпителия и строми в трансплантационных мышам тканях РПЖ человека в условиях введения НЧЗ.

Использовали полидисперсный коллоидный раствор НЧЗ, стабилизированных поливинилпирролидоном, со средним размером частиц 26,4 нм. Тестирование противопухоловой активности проводили нефро-субкапсулярным методом, подсаживая ксенографты половозрелым самцам мышей линии СВА. Для трансплантации использованы фрагменты опухолей, которые были удалены во время плановой простатэктомии у трех больных РПЖ. Раствор НЧЗ вводили подкожно в течение трех дней в дозах 0,64 мг/кг, 1,7 мг/кг или 6,4 мг/кг массы тела. Противоопухоловый эффект

оценивали по степени торможения роста ксенографтов в контрольной и опытных группах, а также по гистологическим признакам ксенографтов. Количественную оценку соотношения площади эпителия и стромы проводили на серийных срезах ксенографтов, окрашенных по методике Малори, с помощью программы Adobe Photoshop CS6, где подсчитывали количество пикселей красного и синего цветов.

Масса семенников в контрольной и опытных группах не отличалась. При гистологическом исследовании половых желез патологических изменений не выявлено. Введение раствора НЧЗ вызывало полное торможение роста ксенографтов и даже регресс опухолей по сравнению с исходными величинами массы в соответствующих группах. Эпителиально-стромальное соотношение в ксенографтах РПЖ человека, трансплантированных мышам, уменьшалось после трехдневного введения полидисперсного коллоидного раствора НЧЗ, однако дозозависимого эффекта не обнаружено.

Полученные результаты указывают на возможность применения исследуемого раствора НЧЗ в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

Ключевые слова: наночастицы золота, рак предстательной железы, ксенографт, мышь

O. A. Falyush, L. I. Polyakova, O. V. Sachynska, A. G. Reznikov
The changes of epithelial-stromal ratio in transplants of human prostate cancer under application of gold nanoparticles

Previous studies have demonstrated the damaging impact of polydispersal colloidal solution of gold nanoparticles (GNP) on human prostate cancer xenografts and inhibition of proliferation in LNCaP cell line culture.

The aim of this study was to determine a quantitative characteristic of the epithelium and stroma ratio in transplanted to mice human prostate cancer tissues under administration of GNP.

There was used polydispersal colloidal solution of GNP stabilized with polyvinylpyrrolidone with an average particle size of 26,4 nm. Antitumor activity assay was conducted by nephro-subcapsular method implanting xenografts to sexually mature CBA male mice. For transplantation have been used the tumor fragments that were removed during routine prostatectomy in three patients with prostate cancer. GNP solution was injected subcutaneously during three days at doses of 0,64 mg/kg, 1,7 mg/kg or 6,4 mg/kg body weight. The antitumor effect was evaluated as inhibition of growth of xenografts in control and experimental groups, as well as by histological examination of the xenografts. Quantitation of epithelial and stromal areas ratio was performed on serial tissue slices stained according to Malori method and using Adobe Photoshop CS6 program to count the numbers of pixels of red and blue colors separately.

The weights of the testes in the control and experimental groups did not differ. Histological examination of sexual glands did not reveal pathological changes. Introduction of GNP solution caused a complete inhibition of the growth of xenografts and even their regression as compared to the initial weight values in the appropriate group. Epithelial-stromal ratio in the human prostate cancer xenografts transplanted to mice was reduced after three days of administration of polydispersed GNP colloidal solution with no dose-dependence.

The results of the study indicate the possibility of using GNP solution as a potential antitumor agent.

Key words: gold nanoparticles, prostate cancer, xenograft, mouse

Надійшла: 15 серпня 2015 р.

Контактна особа: Фалюш Оксана Анатоліївна, аспірант, відділ ендокринології репродукції та адаптації, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», буд. 69, вул. Вишгородська, м. Київ, 04114. Тел.: + 38 0 96 502 93 21.
Електронна пошта: Falyushoksana@gmail.com

Д. С. Кравець, В. Д. Лук'янчук

Новий методичний підхід до оцінки впливу ліків на кінетику вільнорадикальних реакцій у біосубстратах

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

Ключові слова: ліки, біохемілюмінесценція, кінетика вільнорадикальних реакцій, параметри, антиоксидантна система

Центральною ланкою патогенезу майже всіх кисеньдефіцитних станів є надмірна та неконтрольована активація вільнорадикальних процесів, що супроводжується одночасним зниженням функціональної активності практично всіх компонентів системи антиоксидантного захисту організму [1–3]. Вільні радикали, що надмірно утворюються за таких умов, порушують структурно-функціональний стан клітинних та субклітинних мембран, переважно мітохондрій, кисеньчутливих органів і тканин організму [4].

Серед існуючих методів кількісного визначення вільних радикалів у біосередовищах найадекватнішим є біохемілюмінесценція (БХЛ), що відрізняється точністю виміру. БХЛ спостерігається в тому випадку, якщо в реакції відбувається виділення великої кількості енергії, наприклад, у реакції взаємодії двох радикалів або в реакціях за участю перекисів. Власне («надслабке») світіння клітин обумовлене реакціями вільних радикалів фосфоліпідів і кисню, а також окису азоту – сполук, що відіграють ключову роль у житті організму, а за певних умов – і в розвитку низки патологічних станів [1, 5]. Проте нестабільність вільних радикалів, їхній швидкий розпад і включення в метаболізм продуктів вільнорадикального окиснення (ВРО) ускладнюють їхнє виявлення в біологічному матеріалі [1–6].

З огляду на вищесказане, БХЛ – ексклюзивний метод безпосереднього

дослідження плин ВРО, що повністю відповідає сучасним вимогам до експрес-методів фізико-хімічного аналізу перебігу процесів надслабкого світіння в біосередовищах. Процеси вимірювання БХЛ ведуться в заданому автоматичному режимі, що дозволяє підвищити точність і достовірність одержуваної інформації, не ставлячи високих вимог до кваліфікації дослідника.

З нашої точки зору, метод БХЛ можна вважати одним з найоптимальніших і коректних в плані інформативності щодо визначення тонких механізмів дії фармакологічних агентів, а також порівняльної оцінки фармакотерапевтичної ефективності лікарських засобів за умов їхнього застосування при різних патологічних, у тому числі екстремальних станах.

Існуючі натеper методи оцінки параметрів БХЛ полягають лише у визначенні амплітуди швидкого спалаху (I_1), амплітуди повільного спалаху (I_2), часу індукції повільного спалаху (τ), а також загальної світлосуми реакції (S) [1].

Багаторічний досвід роботи авторів цієї публікації в області БХЛ дозволяє ґрунтовно оцінити недоліки саме такого методичного підходу до оцінки кінетики вільнорадикальних реакцій за параметрами надслабкого світіння.

По-перше, існуючі параметри унеможливають аналіз взаємозв'язку та взаємного впливу антиоксидантної системи та факторів, що чинять безпосередню антирадикальну дію за конкретних умов, що вивчаються. По-друге, неможливість реалізації диференційного підходу щодо оцінки вкладу досліджуваного агента на ініціацію розгалуження вільнорадикальних реакцій відносно фонового рівня ВРО в організмі.

По-третє, неможливість встановлення фактичної різниці між безпосередньо антирадикальною та антиоксидантною активностями потенційного чи реального лікарського засобу, що вивчається.

По-четверте, існуючий спосіб оцінки впливу чинника, що вивчається, на стан антиоксидантної системи за даними БХЛ-аналізу не дозволяє визначити окремо ємність та активність антиоксидантного захисту організму, а також максимально оцінити реальний стан проксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі.

Мета дослідження – на основі визначення параметрів біохемілюмінесценції розробити новий методичний підхід до оцінки впливу лікарських засобів на перебіг вільнорадикальних реакцій та стан (ємність та активність) антиоксидантної системи організму в цілому та їхній взаємозв'язок.

Матеріали та методи. Для досягнення поставленої мети нами вперше запропоновано визначення наступних розрахункових показників БХЛ, а саме:

1) Потужність антиоксидантної системи (P):

$$P = I_1 / I_2,$$

де I_1 – амплітуда швидкого спалаху,
 I_2 – амплітуда повільного спалаху;

2) Радикальний пул (RP):

$$RP = S / (I_1 + I_2),$$

де S – загальна світлосума реакції,
 I_1 – амплітуда швидкого спалаху,
 I_2 – амплітуда повільного спалаху;

3) Абсолютна радикальна активність (AR):

$$AR = I_1 / S,$$

де I_1 – амплітуда швидкого спалаху,
 S – загальна світлосума реакції;

4) Абсолютна антиоксидантна активність (AA):

$$AA = I_2 / S,$$

де I_2 – амплітуда повільного спалаху,
 S – загальна світлосума реакції;

5) Показник проксидантно-антиоксидантної рівноваги (PB):

$$PB = \tau \cdot (I_1 + I_2) / S,$$

де I_1 – амплітуда швидкого спалаху,
 I_2 – амплітуда повільного спалаху,
 S – загальна світлосума реакції,
 τ – час індукції повільного спалаху;

6) Напряга антиоксидантної системи (PA):

$$PA = \tau / I_2,$$

де τ – час індукції повільного спалаху,
 I_2 – амплітуда повільного спалаху.

Результати та їх обговорення. Характеристику та тлумачення розрахункових показників оцінки БХЛ, що запропоновані, наведено в таблиці.

Розроблений методичний підхід до комплексного аналізу БХЛ параметрів апробовано за умов впливу вперше синтезованих германійорганічних сполук, як потенційних лікарських засобів, на характер змін надслабкого світіння при різних патологічних станах (гіпоксія замкнутого простору, ішемія головного мозку, закрита черепно-мозкова травма), де продемонстровано ефективність та інформативність реалізації запропонованого способу оцінки кінетики вільнорадикальних реакцій в органах і тканинах тварин [7, 8].

Таким чином, раціональне застосування запропонованих нами показників дозволяє більш глибоко оцінити БХЛ тканин організму, а саме: з'ясувати зв'язок між антиоксидантною та антирадикальними системами організму, тобто дозволяє оцінити взаємний вплив антиоксидантної та антирадикальної систем за конкретних умов; оцінити вклад лікарського засобу, що вивчається, у ініціацію розгалуження вільнорадикальних процесів відносно їхнього фонового рівня в організмі та встановити фактичну різницю між антирадикальною та антиоксидантною активностями лікарського засобу або іншого чинника, або визначити окремо ємність та активність антиоксидантного захисту та при цьому всебічно оцінити реальний стан проксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі.

Характеристика (тлумачення) розрахункових показників оцінки біохемілюмінесценції

№ з/п	Показник	Розмірність	Характеристика (тлумачення)
1	Потужність антиоксидантної системи (P)	ум. од.	Показник, що характеризує потужність антиоксидантної системи, тобто силу дії даної системи впродовж інтервалу часу. Іншими словами, показник P вказує на спроможність компонентів антиоксидантної системи зменшувати інтенсивність другого (повільного) спалаху БХЛ (I_2)
2	Радикальний пул (RP)	с	Показник, що характеризує загальну (фонову та індуковану) кількість вільних радикалів у системі, тобто тих, що утворюються в організмі під впливом чинника, що досліджується
3	Абсолютна радикальна активність (AR)	c^{-1}	Показник, що характеризує кількість вільних радикалів, які утворюються в біосубстраті після індукції за умов впливу фактора, що досліджується. Іншими словами, величина AR відображає саме ту кількість вільних радикалів, яка індукована
4	Абсолютна антиоксидантна активність (AA)	c^{-1}	Показник, що характеризує тривалість дії антиоксидантної системи за умов індукції вільнорадикального окиснення. Тобто, даний параметр вказує на час, упродовж якого антиоксидантна система здатна протистояти вільнорадикальному окисненню за конкретних умов
5	Показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (PB)	ум. од.	Показник, що дозволяє дати комплексну оцінку стану прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та його порушення шляхом зміщення рівноваги про- та антиоксидантних агентів у організмі
6	Напруга антиоксидантної системи (PA)	$c^2/імп$	Показник, що характеризує ступінь напруги антиоксидантної системи за умов експерименту, що вивчається. Тобто, даний параметр БХЛ свідчить про спроможність компонентів системи антиоксидантного захисту зменшувати величину другого піка БХЛ (I_2) та віддаляти його у часі

Висновок

Розроблено новий методичний підхід до комплексної оцінки впливу лікарських засобів на кінетику вільнорадикальних реакцій у тканинах організму, в основі якого лежить визначення низки розрахункових показників, похідних від експериментально визначених параметрів біохемілюмінесценції (амплітуди швидкого та повільного спалаху, часу індукції повільного спалаху, а також загальної

світлосуми реакції). Запропоновано розраховувати наступні показники: потужність антиоксидантної системи, радикальний пул, абсолютну радикальну активність, абсолютну антиоксидантну активність, показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, а також напругу антиоксидантної системи, що дозволить всебічно характеризувати стан антирадикальної й антиоксидантної систем захисту організму за впливу ліків.

1. Биохемилюминесцентный анализ фармакодинамики лекарственных средств / В. Д. Лукьянчук, Д. С. Кравец, Н. В. Витохина [и др.] // Метод. рекоменд. – Луганск, 2010. – 42 с.
2. Влияние острой гипоксии на антиокислительную активность ткани печени у крыс с разной устойчивостью к гипоксии / О. Р. Грек, В. И. Шарапов, Е. В. Тихонова [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 7. – С. 60–62.

3. *Стещенко М. М.* Вплив мексидолу на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та процеси окисного фосфорилування в мітохондріях міокарда шурів за умов гострої гіпоксії / М. М. Стещенко, О. О. Гончар // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2010. – № 4 (17). – С. 64–69.
4. О роли активации свободнорадикального окисления в структурной и функциональной дезорганизации биосистем в условиях патологии / Н. П. Чеснокова, В. В. Моррисон, Е. Ф. Понукалина [и др.] // *Фундаментальные исследования.* – 2009. – № 5. – С. 122–130.
5. *Владимиров Ю. А.* Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю. А. Владимиров // *Биохимия.* 2004. – Т. 69, Вып. 1. – С. 5–7.
6. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина // *Успехи биологической химии.* – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
7. Пат. 95720 Україна, МПК G01N 21/76 (2006.01) Спосіб комплексної оцінки біохемілюмінесценції тканин організму / Лук'яничук В. Д., Кравець Д. С., Крилова О. В., Лук'яничук О. В., Романенко Д. В., Поліщук Є. М., Грекова О. В., Сенченко О. М.; винахідники та власники Лук'яничук В. Д., Кравець Д. С., Крилова О. В., Лук'яничук О. В., Романенко Д. В., Поліщук Є. М., Грекова О. В., Сенченко О. М. – № 95720, у 2014 03766; заявл. 10.04.2014; опубл. 12.01.2015, Бюл. № 1. – 8 с.
8. *Поліщук Є. М.* Експериментальне обґрунтування доцільності застосування нової координаційної сполуки Цереброгерм для лікування травматичного пошкодження головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.05-«Фармакологія»/ Поліщук Євген Миколайович: Одеський національний медичний університет. – Одеса, 2016. – 20 с.

Д. С. Кравець, В. Д. Лук'яничук

Новий методичний підхід до оцінки впливу ліків на кінетику вільно-радикальних реакцій у біосубстратах

Біохемілюмінесценція (БХЛ) є сучасним базовим методом визначення стану вільнорадикальних процесів в організмі за будь-якої патології та при застосуванні лікарських засобів. Параметри БХЛ, що відображають плин вільнорадикальних процесів у біосубстратах, є малочисельними та не дозволяють у повному обсязі та всебічно характеризувати функціональний стан антиоксидантної системи захисту організму за умов впливу зовнішніх чинників, у тому числі лікарських засобів.

Мета дослідження – на основі визначення параметрів біохемілюмінесценції розробити новий методичний підхід до оцінки впливу лікарських засобів на перебіг вільнорадикальних реакцій та стан (ємність та активність) антиоксидантної системи організму в цілому та їх взаємозв'язок.

Запропоновано низку розрахункових показників, похідних від експериментально визначених параметрів біохемілюмінесценції (амплітуди швидкого та повільного спалаху, часу індукції повільного спалаху, а також загальної світлосуми реакції), що характеризують вплив ліків на кінетику вільно-радикальних процесів з точки зору взаємозв'язку активності антиоксидантної системи та поведінки вільних радикалів у біосередовищах. Новий методичний підхід до оцінки впливу лікарських засобів на кінетику вільнорадикальних реакцій і стан антиоксидантної системи передбачає розрахунок наступних показників: потужність антиоксидантної системи, радикальний пул, абсолютна радикальна активність, абсолютна антиоксидантна активність, показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, напруга антиоксидантної системи. У статті наводяться формули для розрахунків величин цих показників.

Запропонований методичний підхід сприятиме отриманню більшої кількості та якості інформації для всебічного тлумачення стану прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у фармакологічних дослідженнях.

Ключові слова: ліки, біохемілюмінесценція, кінетика вільнорадикальних реакцій, параметри, антиоксидантна система

Д. С. Кравець, В. Д. Лук'яничук

Новый методический подход к оценке влияния лекарств на кинетику свободнорадикальных реакций в биосубстратах

Биохемилюминесценция (БХЛ) является современным базовым методом определения состояния свободнорадикальных процессов в организме при любой патологии и применении лекарственных средств. Параметры БХЛ, отражающие течение свободнорадикальных процессов в биосубстратах, весьма малочисленны и не позволяют в полном объеме и всесторонне характеризовать функциональное состояние антиоксидантной системы защиты организма при различных условиях воздействия на него внешних факторов, в том числе и лекарственных средств.

Цель исследования – на основании определения параметров биохемилюминесценции разработать новый методический подход к оценке влияния лекарственных средств на кинетику свободнорадикальных процессов и состояние антиоксидантной системы организма в целом и их взаимосвязь.

Предложен ряд расчетных показателей, производных от определенных экспериментально параметров биохемилюминесценции (амплитуды быстрой и медленной вспышки, времени индукции медленной вспышки, а также общей светосуммы реакции), которые характеризуют влияние лекарств на кинетику свободнорадикальных процессов с точки зрения взаимосвязи активности антиоксидантной системы и поведения свободных радикалов в биосредах. Новый методический подход к оценке

влияния лекарственных средств на кинетику свободнорадикальных реакций и состояние антиоксидантной системы предполагает расчет следующих показателей: мощность антиоксидантной системы, радикальный пул, абсолютная радикальная активность, абсолютная антиоксидантная активность, показатель прооксидантно-антиоксидантного равновесия, напряжение антиоксидантной системы. В статье приводятся формулы для расчетов величин этих показателей.

Предложенный методический подход будет способствовать получению большего количества и качества информации для всесторонней оценки состояния прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в фармакологических исследованиях.

Ключевые слова: лекарства, биоchemиллюминесценция, кинетика свободнорадикальных реакций, параметры, антиоксидантная система

D. S. Kravets, V. D. Lukyanchuk

New methodological approach to the assessment of drug effects on kinetics of free radical reactions in the biosubstrates

Biochemiluminescence (BCL) is a modern method of determining the basic state free radical processes in the body at any disease and use of drugs. Set of BCL parameters reflecting for a free radical processes in biosubstrates very few in number, and therefore do not allow to fully and comprehensively characterize the functional state of the body's antioxidant defense system at different conditions exposure to external factors, including drugs.

The aim of the study was to develop a new methodological approach to the evaluation of drug effects on kinetics of free radical reactions and antioxidant system of organism on the basis of biochemiluminescence parameters determination.

There were proposed a number of calculated indices, derived from experimentally determined biochemiluminescence parameters (the amplitudes of the fast and slow flash, induction time of slow flash, as well as the total light sum of reaction), which characterize drug effects on the kinetics of free radical processes in terms of the relationship of the antioxidant system activity and behavior of free radicals in biological media.

This new methodological approach allows more adequately evaluate the role of antiradical component in the functioning of the prooxidant-antioxidant system and involves the calculation of the following indices: the power of the antioxidant system, the radical pool, the absolute radical activity, the absolute antioxidant activity, indicator of prooxidant-antioxidant balance, antioxidant system stress. The article describes the formula to calculate the values of these indices.

Rational use of the proposed indicators will help provide a greater quantity and quality of information for the comprehensive assessment of the state of prooxidant-antioxidant homeostasis in pharmacological studies.

Key words: drugs, biochemiluminescence, kinetics of free radical reactions, parameters, antioxidant system

Надійшла: 16 травня 2016 р.

Контактна особа: Кравець Дмитрій Станіславович, кандидат медичних наук, доцент, відділ фармакокінетики, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: +38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: kdsig@ukr.net

К. В. Садогурська

До питання безпечності нанохрому цитрату за умов повторного введення

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

Ключові слова: нанохрому цитрат, повторне введення, показники крові, уміст глюкози, детоксикуюча функція печінки

Успіхи нанотехнологій позначилися на всіх напрямках науки, зокрема й на розвитку біології, медицини та фармацевції, де наноматеріали знайшли застосування в діагностиці та лікуванні різних захворювань [1, 2]. Нанотехнології – це процеси цілеспрямованого одержання та використання речовин і матеріалів у діапазоні розмірів наночастинок від 0,1 до 100,0 нанометрів [3]. Зміна розміру та форми частинок на нанорівні змінює властивості раніше відомих сполук і відкриває нові можливості щодо їхнього застосування [4, 5]. Стрімкий розвиток нанотехнологій та отримання нових наноматеріалів викликає необхідність дослідження їхньої безпечності для уникнення можливих несприятливих наслідків як для здоров'я населення, так і навколишнього середовища [6].

В Українському державному науково-дослідницькому інституті нанобіотехнологій і ресурсозбереження шляхом електроімпульсної аквананотехнології під керівництвом В. Г. Каплуненка та М. В. Косінова отримано органічну сполуку хрому – нанохрому цитрат [7]. Поява нової сполуки викликала інтерес щодо її біологічної активності та перспектив використання. Адже відомо, що хром як мікроелемент необхідний для нормальної життєдіяльності людини та тварин [8]. Він відіграє важливу роль у вуглеводневому, жировому, білковому обміні, разом з йодом забезпечує функціонування щитоподібної залози, регулює продукцію та метаболізм інсуліну. Добова потреба хрому для людини становить 50–200 мкг, а при його дефіциті вини-

кають симптоми, що спостерігаються при серцево-судинних захворюваннях та цукровому діабеті [9]. Поповнення організму хромом можливе при вживанні багатих на цей мікроелемент продуктів харчування (риби, печінки яловичої, м'яса птиці, яєць, пивних дріжджів), а також при застосуванні хромвмісних біологічно активних добавок («Хром Активний», «Хром Хелат», «Хромвітал+» та ін.).

Щодо біологічної активності наночастинок хрому, то в науковій літературі є лише поодинокі дані [10, 11]. Доведено позитивний вплив нанохрому цитрату (НХЦ) на перебіг біохімічних процесів в організмі сільськогосподарських тварин, що дало можливість авторам рекомендувати його як харчову добавку у ветеринарній практиці [10]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено параметри токсичності НХЦ за різної тривалості та шляхів введення [12, 13]. Однак для більш повної токсикологічної характеристики НХЦ необхідні дослідження щодо впливу його на морфофункціональний стан органів, які беруть участь у процесах детоксикації та елімінації, на клінічні показники крові, що особливо важливо при тривалому введенні сполуки.

Мета дослідження – вивчити стан детоксикуючої функції печінки, уміст глюкози і показники периферичної крові за повторного введення нанохрому цитрату.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на статевозрілих лабораторних щурах масою 150–210 г. Залежно від поставлених завдань тварин поділено на 3 групи по 32 у кожній (4 серії по 8 особин). Дослідним тваринам упродовж 14 діб щоденно внутрішньочеревинно вводили розчин НХЦ (ТОВ

«Наноматеріали та нанотехнології», 200 мг/л) у дозах, що згідно з результатами попередніх досліджень становлять 1,0 %, 2,5 % і 5,0 % від DL_{50} (0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг, 0,22 мг/кг відповідно) [13]. Контрольним тваринам в аналогічному об'ємі, що й дослідним, вводили воду для ін'єкцій (ФФ «Здоров'я», Україна). В останній день в окремих серіях дослідів вивчали вплив різних доз НХЦ на стан периферичної крові, детоксикуючої функції печінки та вміст глюкози в крові.

Вплив НХЦ на показники крові (уміст гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, ШОЕ), яку забирали у тварин із хвостової вени, досліджували за загальноприйнятими методиками [14]. Уміст глюкози в крові визначали за допомогою портативного глюкометра (Accu-Chek Active New, Німеччина). Стан детоксикуючої функції печінки оцінювали на моделі тривалості барбітурового сну-наркозу [15]. Для цього тваринам внутрішньоочередово вводили тіопентал натрію в дозі 50 мг/кг («Артеріум», Україна), який готували безпосередньо перед застосуванням. Тривалість сну-наркозу реєстрували в секундах по знаходженню тварин у бічному положенні (від втрати рефлексу перевертання до його відновлення). Зміну тривалості барбітурового сну-наркозу під впливом НХЦ (скорочення, подовження) оцінювали як здатність сполуки підвищувати чи знижувати детоксикуючу функцію печінки.

Утримання тварин та всі маніпуляції здійснювали відповідно до методичних рекомендацій [15] та з дотриманням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з дослідницькими та іншими цілями (Страсбург, 1986 р.); проведення дослідження схвалено комісією БДМУ з питань біомедичної етики (від 18.07.2016 р.). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програм «Excel-7» та параметричних методів статистики з визначенням t-критерію Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. При повторних введеннях НХЦ тваринам у дозах 0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг рухова активність, харчова поведінка, частота дихання суттєво не відрізнялися від показників контрольних тварин. У більшій дозі (0,22 мг/кг) при 100 % виживаності у тварин спостерігалось загальне пригнічення, утруднення дихання, зменшення рухової активності.

Аналіз показників крові тварин за дії НХЦ засвідчив вірогідне зниження вмісту гемоглобіну (табл. 1).

Після введення НХЦ у дозі 0,04 мг/кг уміст гемоглобіну в крові зменшився на 7,0 %, при дозі 0,11 мг/кг – на 14,6 %, при 0,22 мг/кг – на 23,7 % порівняно з контрольними тваринами. Отже, зі збільшенням дози НХЦ уміст гемоглобіну в периферичній крові зменшується. Імовірно, наночастинки хрому конкурують з залізом за місця зв'язування з трансферином, оскільки відомо, що після абсорбції в травному каналі хром транспортується білками крові, зокрема трансферином [16].

У досліджуваних дозах НХЦ не вплинув на ШОЕ, а зниження кількості еритроцитів у периферичній крові виявилось не вірогідним. Зі збільшенням дози НХЦ спостерігали значне зростання кількості лейкоцитів у периферичній крові (табл. 1). Після 14-денного введення НХЦ у дозі 0,04 мг/кг кількість лейкоцитів збільшилась на 14,5 %, при дозі 0,11 мг/кг – на 27,1 %, при дозі 0,22 мг/кг (що становить 5 % від DL_{50}), – на 43,4 % порівняно з контрольними тваринами. Збільшення лейкоцитів у крові при введенні НХЦ спостерігали також інші дослідники [10], що, ймовірно, є захисною реакцією організму на введену сполуку.

Оскільки відомо, що хром як мікроелемент відіграє важливу роль у вуглеводному обміні, регулює продукцію та метаболізм інсуліну в окремій серії досліджень вивчено вплив повторних введення НХЦ на вміст глюкози в крові. Виявилось, що залежно від введеної дози спостерігається вірогідне зменшення концентрації глюкози в крові (рисунок).

У разі введення низьких доз НХЦ (0,01–0,02 мг/кг), що становлять

Показники периферичної крові в щурів за умов повторних введень нанохрому цитрату, $\bar{X} \pm S\bar{x}$

Умова досліджу	Контроль n = 8	Доза нанохрому цитрату		
		0,04 мг/кг n = 8	0,11 мг/кг n = 8	0,22 мг/кг n = 8
Гемоглобін, г/л	148,13 ± 0,23	137,70 ± 0,45*	126,56 ± 0,22*	113,00 ± 0,19*
Еритроцити, Т/л	8,03 ± 0,14	7,59 ± 0,04	7,13 ± 0,04	6,63 ± 0,04
Лейкоцити, Г/л	9,13 ± 0,09	10,45 ± 0,08*	11,60 ± 0,05*	13,09 ± 0,18*
ШОЕ, мм/год	2,13 ± 0,13	2,38 ± 0,18	2,50 ± 0,19	2,50 ± 0,19

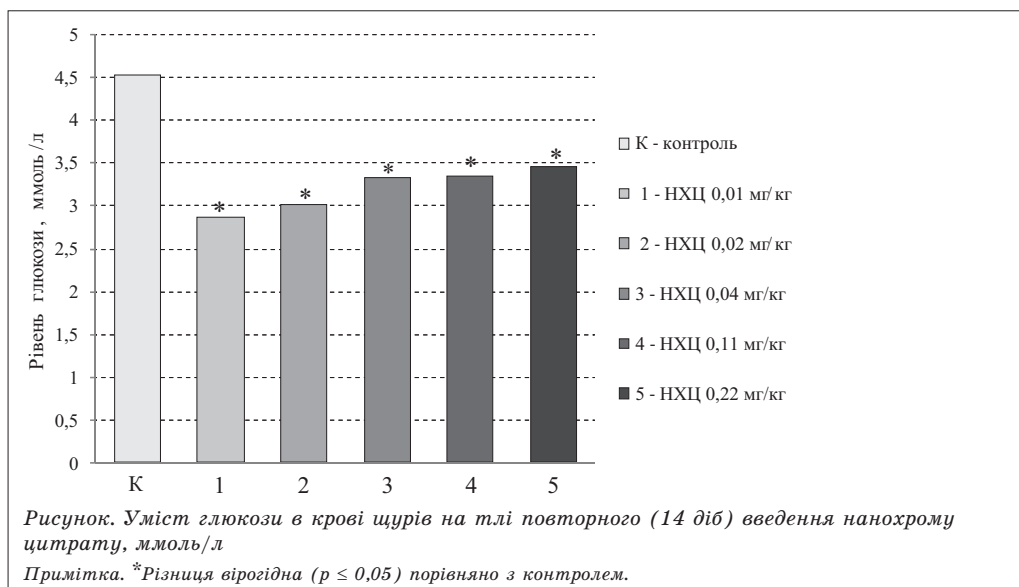
Примітка. *Різниця вірогідна ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольними тваринами.

0,25–0,50 % від DL_{50} , рівень глюкози в крові зменшився на 36,6 та 33,3 % відповідно. При збільшенні дози (0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг, 0,22 мг/кг) концентрація глюкози в крові зменшувалася, однак, менш виразно (рисунок). При максимальній досліджуваній дозі (0,22 мг/кг) концентрація глюкози зменшилася на 23,8 %, що в 1,5 разу менше, ніж при дозі 0,01 мг/кг. Таким чином, спостерігається обернено пропорційна залежність між введеною дозою НХЦ і гіпоглікемічною його дією.

У наступній серії дослідів після повторного введення НХЦ у різних дозах досліджено стан детоксикуючої функції печінки тварин на моделі барбітурового сну-наркозу. Наведені в таблиці 2 дані свідчать, що під впли-

вом НХЦ скорочується латентний період настання сну зі збільшенням уведеної дози.

При дозі 0,04 мг/кг латентний період скоротився на 27,4 %, при дозі 0,11 мг/кг – на 38,6 %, а в більшій дозі (0,22 мг/кг) тварини засинали майже вдвічі швидше. Отже, у цілому латентний період засинання тварин зі збільшенням дози НХЦ скорочувався в 1,4–1,9 разу, що ймовірно, зумовлено зростанням загального депримуючого впливу сполуки на організм. Разом з тим, за дії НХЦ спостерігалось вірогідне скорочення тривалості знаходження тварин у бічному положенні (табл. 2). При введенні сполуки в дозі 0,04 мг/кг тривалість барбітурового сну-наркозу скоротилася на 12,8 %, при дозі 0,11 мг/кг – на



Тривалість тіопенталового сну-наркозу в щурів після 14-денного введення нанохрому цитрату, $M \pm m$, $n = 8$

Група тварин	Кількість тварин у групі, що заснули	Тривалість латентного періоду сну, с	Середня тривалість сну-наркозу, с
Тіопентал натрію, 50 мг/кг (контроль)	8/8	176,88 ± 1,53 (100)	82,25 ± 0,59 (100)
Тіопентал натрію + Нанохрому цитрат, 0,04 мг/кг	8/8	128,50 ± 0,87* (72,6)	71,75 ± 0,75* (87,2)
Тіопентал натрію + Нанохрому цитрат, 0,11 мг/кг	8/8	108,63 ± 0,60* (61,4)	63,13 ± 0,88* (76,8)
Тіопентал натрію + Нанохрому цитрат, 0,22 мг/кг	8/8	91,13 ± 0,72* (51,5)	55,38 ± 1,18* (67,3)

Примітка. *Різниця вірогідна ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольними тваринами; у дужках наведено зміни показника до контролю, %.

23,2 %, а при введенні 0,22 мг/кг – на 32,7 %. Тобто, збільшення дози НХЦ виразніше скорочує тривалість тіопенталового сну. Отриманий факт може бути зумовлений посиленням під впливом НХЦ детоксикуючої функції печінки за рахунок активації мікосомних оксигеназ, які беруть участь у метаболізмі тіопенталу.

У подальшому для оцінки токсичності НХЦ при тривалому введенні доцільно вивчити вплив сполуки на клінічні біохімічні показники сироватки крові, лейкоцитарну формулу крові, у модельних дослідках дослідити гіпоглікемічну дію НХЦ та вплив на функції печінки та нирок.

Висновки

1. За умов повторного введення (14 діб) нанохрому цитрату в різних дозах (0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг, 0,22 мг/кг) у периферичній крові щурів знижується вміст гемоглобіну, збільшується кількість лейкоцитів, суттєво не змінюється кількість еритроцитів та ШОЕ.
2. Під впливом нанохрому цитрату (0,01–0,22 мг/кг) концентрація глюкози в крові зменшується на 36,6–23,8 % відповідно.
3. Нанохрому цитрат, підвищуючи детоксикуючу функцію печінки, скорочує тривалість тіопенталового сну-наркозу.

1. Борисевич В. Б. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов. – Київ : ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
2. Yohan D. Applications of nanoparticles in nanomedicine / D. Yohan, B. Chithrani // J. Biomed Nanotechnol. – 2014. – V. 10, № 9. – P. 2371–2392.
3. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І. С. Чекман, З. Н. Ульберг, В. О. Маланчук [та ін.]. – Київ : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
4. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – Київ : Задруга, 2011. – 424 с.
5. Чекман І. С. Природні наноструктури та наномеханізми / І. С. Чекман, П. В. Сімонов. – Київ : ПВП «Задруга», 2012. – 102 с.
6. Physiologically important metal nanoparticles and their toxicity / J. Sengupta, S. Ghosh, P. Datta, A. Gomes // J. Nanosci Nanotechnol. – 2014. – V. 14, № 1. – P. 990–1006.
7. Пат. № 29856, UA, МПК В01J 13/00, В82В 3/00. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів» / М. В. Косінов, В. Г. Каплуненко; заявл. 25.10.2007; опубл. 25.01.2008, Бюл. № 2.
8. Микроэлементозы человека / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Раш [и др.]. – Москва : Медицина, 1991. – 496 с.
9. Anderson R. A. Chromium, glucose intolerance and diabetes / R. A. Anderson // J. Am. Coll. Nutr. – 1998. – V. 17, № 6. – P. 548–555.
10. Іскра Р. Я. Фізіолого-біохімічні особливості метаболізму в самців і самок щурів за дії цитрату нанохрому / Р. Я. Іскра // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. 11, № 2 (40). – С. 49–51.

11. Effects of chromium nanoparticle dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats / L. Y. Zha, Z. R. Xu, M. Q. Wang, L. Y. Gu // J. Zhejiang Univ Sci B. – 2007. – V. 8, № 5. – P. 323–330.
12. Садогурська К. В. Токсикологічна оцінка та морфоструктура внутрішніх органів щурів за умов тривалої дії нанохрому цитрату / К. В. Садогурська // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 6 (41). – С. 10–14.
13. Садогурська К. В. Вивчення гострої токсичності нанохрому цитрату за різних шляхів уведення / К. В. Садогурська // Фармацевтичний часопис. – 2015. – № 4 (36). – С. 56–59.
14. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. Довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. А. Макар [та ін.]. – Львів : «ВМС», 2004. – 399 с.
15. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
16. Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis 1,2,3 / M. D. Althuis, N. E. Jordan, E. A. Ludington, J. T. Wittes // American Society for Clinical Nutrition. – 2002. – V. 76. – P. 148–155.

К. В. Садогурська

До питання безпечності нанохрому цитрату за умов повторного введення

Мета дослідження – вивчити стан детоксикуючої функції печінки, уміст глюкози та показники периферичної крові за повторних введеннь нанохрому цитрату (НХЦ).

Дослідження проведено на статевозрілих лабораторних щурах масою 150–210 г. Тваринам упродовж 14 діб щоденно внутрішньоочередово вводили розчин НХЦ (ТОВ «Наноматеріали та нанотехнології», 200 мг/л) у дозах, які згідно з результатами досліджень становлять 1 %, 2,5 % і 5 % від DL_{50} (0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг, 0,22 мг/кг відповідно). В останній день експерименту в окремих серіях дослідів вивчали вплив різних доз НХЦ на стан периферичної крові, детоксикуючої функції печінки та вміст глюкози в крові.

За повторного введення НХЦ тваринам у менших дозах рухова активність, харчова поведінка, частота дихання суттєво не відрізнялися від показників контрольних тварин. У дозі 0,22 мг/кг при 100 % виживаності спостерігали загальне пригнічення тварин, утруднення дихання, зменшення рухової активності. Під впливом НХЦ у периферичній крові щурів знижується вміст гемоглобіну, збільшується кількість лейкоцитів, суттєво не змінюється кількість еритроцитів та ШОЕ. Під впливом НХЦ (0,01–0,22 мг/кг) концентрація глюкози в крові зменшується на 36,6–23,8 % відповідно, підвищується детоксикуюча функція печінки, на що вказує скорочення тривалості тіопенталового сну-наркозу.

Ключові слова: нанохрому цитрат, повторне введення, показники крові, уміст глюкози, детоксикуюча функція печінки

Е. В. Садогурская

К вопросу безопасности нанохрома цитрата при повторном введении

Цель исследования – изучить влияние повторных введений нанохрома цитрата (НХЦ) на показатели периферической крови, состояние детоксикационной функции печени, а также содержание глюкозы в крови.

Исследование проведено на половозрелых лабораторных крысах массой 150–210 г. Животным в течение 14 суток ежедневно внутривентриально вводили раствор НХЦ (ООО «Наноматериалы и нанотехнологии», 200 мг/л) в дозах, которые согласно результатов предыдущих исследований составляют 1,0 %, 2,5 % и 5,0 % от DL_{50} (0,04 мг/кг, 0,11 мг/кг, 0,22 мг/кг соответственно). В последний день эксперимента в отдельных сериях опытов изучено влияние различных доз НХЦ на состояние периферической крови, детоксицирующую функцию печени, а также содержание глюкозы в крови.

При повторных введениях НХЦ в меньших дозах (0,04–0,11 мг/кг) двигательная активность, пищевое поведение, частота дыхания существенно не отличались от показателей у контрольных животных. В большей дозе (0,22 мг/кг) при 100 % выживаемости животных наблюдали общее угнетение, уменьшение двигательной активности и нарушение дыхания. После 14-дневного введения НХЦ в периферической крови крыс уменьшилось содержание гемоглобина, повысилось количество лейкоцитов при отсутствии изменений количества эритроцитов и СОЭ. Выявлено гипогликемическое действие НХЦ: в малых дозах (0,01 мг/кг) концентрация глюкозы в крови уменьшалась на 36,6 %, в больших (0,22 мг/кг) – на 23,8 %. НХЦ повышает детоксикационную функцию печени, о чем свидетельствует уменьшение длительности барбитурового (тиопентал натрий) сна-наркоза.

Ключевые слова: нанохрома цитрат, повторное введение, показатели крови, содержание глюкозы, детоксикационная функция печени

К. V. Sadogurska

To the issue of safety of nanochromium citrate under repeated administrations

The aim of the study is to investigate the state of detoxication liver function, glucose content and indices of the peripheral blood under repeated administrations of nanochromium citrate (NCC).

The study was conducted on mature laboratory white rats with the body weight of 150–210 g. During 14 days every day the animals were injected with NCC solution (LTD «Nanomaterials and Nanotechnologies», 200 mg/L) in the doses calculated according to results of previous investigations – 1,0 %, 2,5 % and 5,0 % of DL_{50} (respectively – 0,04 mg/kg, 0,11 mg/kg, 0,22 mg/kg). The effect of various doses of NCC on the condition of the peripheral blood, detoxication liver function and glucose content in the blood was studied after repeated introduction in certain series of the experiment.

In case of introduction of NCC to animals in lower doses their motor activity, eating behaviour, respiratory rate did not differ considerably from the parameters of the control animals. In the dose of 0,22 mg/kg and 100 % survival general inhibition of animals, difficulties in breathing, decreased motor activity were observed.

Under the influence of NCC the content of hemoglobin decreased, the number of leukocytes increased, the number of erythrocytes and ESR did not change considerably in the peripheral blood of rats. Under the influence of NCC (0,01–0,22 mg/kg) the concentration of glucose in the blood became 36,6–23,8 % less respectively. NCC increases detoxication liver function and reduces the period of thiopental induced sleep.

Key words: nanochromium citrate, repeated administrations, blood indices, glucose content, liver detoxication function

Надійшла: 13 липня 2016 р.

Контактна особа: Садогурська Катерина Володимирівна, асистент, кафедра фармації, ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», буд.2, Театральна пл., м. Чернівці, 58002. Тел.: + 38 0 99 029 0417. Електронна пошта: sadogurska.katya@mail.ru

**Н. О. Савіна, О. М. Кузнецова, А. М. Череменко,
В. М. Брицун, Н. В. Останіна**

Дослідження кількісного вмісту та супровідних домішок цефепіму методом ВЕРХ

*Державна установа «Інститут громадського здоров'я імені О. М. Марзєєва
Національної академії медичних наук України», м. Київ*

Ключові слова: цефепім, порошок для ін'єкційних розчинів, ВЕРХ, кількісне визначення, супровідні домішки

Якість сучасних медичних препаратів та їхня чистота мають принципове значення для охорони здоров'я населення, тому вони повинні відповідати вимогам Державної фармакопеї України та документів Державного експертного центру МОЗ України і Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками.

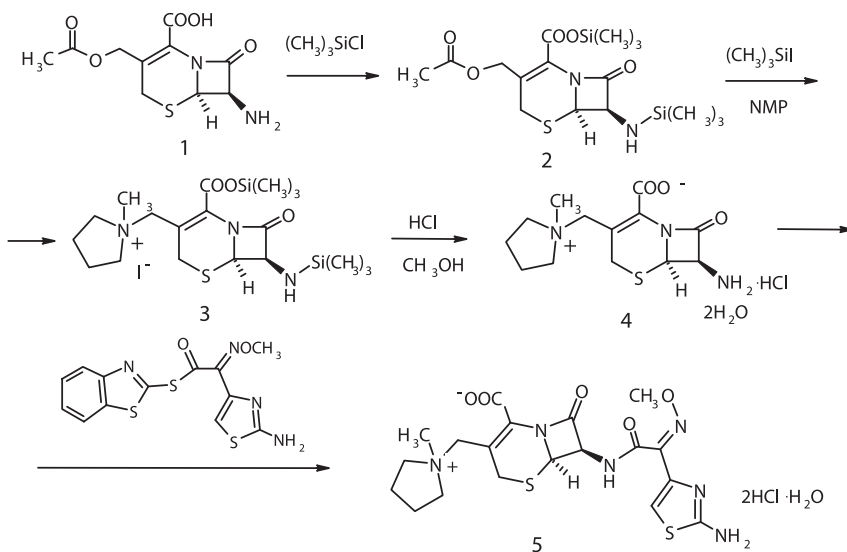
Для унеможливлення потрапляння в аптеки фальсифікованих або сумнівної чистоти медичних препаратів в Україні організовано державний передпродажний контроль якості всіх лікарських засобів, який здійснюється уповноваженими хіміко-аналітичними лабораторіями.

Особливо актуальною є перевірка антимікробних препаратів, зокрема β-лактамних антибіотиків цефалоспо-

ринового ряду, які займають одне з перших місць за обсягом застосування, що зумовлено їхньою клінічною ефективністю та відносно низькою токсичністю [1, 2].

До них відноситься й цефепім – антибіотик 4-го покоління з широким спектром дії, дієвий проти грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів [3, 4]. Зазвичай він використовується проти бактерій, які викликають пневмонію, інфекційні захворювання шкіри і сечовивідних шляхів. Антибактеріальна дія цефепіму, як і інших цефалоспоринових, пов'язана з порушенням відтворення бактеріальної клітинної стінки.

У промисловості цефепім синтезують у вигляді дигідрохлориду гідрату (ЦДХГ) **5** з 7-аміноцефалоспоринової кислоти **1**, яку отримують ензиматичним гідролізом цефалоспоринової **С** [5]. Реакційна схема містить 4 стадії [6, 7]:



Слід зазначити, що цефепім, як і всі лікарські засоби, може містити загальнотехнологічні, супровідні та механічні домішки [8]. На відміну від загальнотехнологічних та механічних, кількість супровідних домішок може змінюватись у зв'язку з різноманітними хімічними реакціями, які повільно перебігають навіть при зберіганні лікарського засобу за оптимальних умов.

Мета роботи – дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) кількісного вмісту основної речовини та супровідних домішок цефепіму на відповідність вимогам нормативної документації.

Матеріали та методи. Для випробувань був використаний порошок цефепіму у флаконах для ін'єкційних розчинів іноземного виробництва.

Випробування здійснювали методом обернено-фазової ВЕРХ в ізократичному (кількісне визначення) і градієнтному режимах (випробування на супутні домішки) з детектуванням в УФ-області спектра.

Статистичний аналіз отриманих результатів і оцінку невизначеності проводили згідно з ДФУ (підрозділ 5.3) [9].

Тест придатності хроматографічної системи відповідав вимогам нормативної документації (для 5 паралельних інжекцій середнє значення коефіцієнта симетрії піків знаходилось у межах 0,8–1,5, відносне стандартне відхилення площ піків розчину порівняння не більше ніж 2,0 %, число теоретичних тарілок ≥ 3000).

Кількісне визначення здійснювали на хроматографі Hewlett Packard 1050 з спектрофотометричним детектором, в ізократичному режимі, на колонці EclipsePlus C18 (довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм), температура колонки 30 °С, швидкість потоку 1,5 мл/хв, $\lambda = 254$ нм, об'єм інжектування 5 мкл, рухома фаза – ацетатний буфер : ацетонітрил (94:6, об'ємні %).

Розчин порівняння: уміщують 35,05 мг стандартного зразка цефепіму дигідрохлориду гідрату в мірну колбу на 25 мл, додають рухомої фази до мітки і перемішують до розчинення. Концентрація – 1,402 мг/мл.

Досліджуваний розчин: 1946,6 мг порошку цефепіму уміщують у мірну

колбу на 100 мл, додають рухома фаза до мітки, розчиняють. Переносять 10 мл отриманого розчину до колби на 100 мл і доводять об'єм розчинником до мітки. Очікувана концентрація цефепіму дигідрохлориду гідрату – 1 мг/мл.

Визначення супровідних домішок проводили на хроматографі Agilent 1200 зі спектрофотометричним детектором, у градієнтному режимі, на колонці Hypersil BDS-C18 (довжина 250 мм, діаметр 4,6 мм), температура колонки 25 °С, швидкість потоку 1 мл/хв, $\lambda = 254$ нм, об'єм інжектування 10 мкл, рухома фаза – фосфатний буфер : ацетонітрил.

Приготування рухомої фази для градієнтного тестування проводили згідно з [10].

Розчин А: змішують 10 об'ємів ацетонітрилу та 90 об'ємів розчину KH_2PO_4 (концентрація 0,68 г/л, попередньо підлужений розчином 0,5 М гідроксиду калію до рН = 5).

Розчин Б: змішують рівні об'єми ацетонітрилу та розчину KH_2PO_4 (концентрація 0,68 г/л, попередньо підлужений розчином 0,5 М гідроксиду калію до рН = 5).

Співвідношення розчинів А і Б при прокачуванні змінювалося від 100 : 0 до 50 : 0 (0–35 хв) і до 100 : 0 (45 хв) [10].

Розчин порівняння 1 %: уміщують 35,05 мг стандартного зразка цефепіму дигідрохлориду гідрату в мірну колбу на 25 мл, додають рухома фаза до мітки і перемішують до розчинення. Відбирають 1,0 мл, переносять до мірної колби на 100 мл і доводять об'єм рухомою фазою до мітки. Концентрація – 0,01402 мг/мл.

Досліджуваний розчин: розчиняють вміст одного флакона цефепіму (середня вага 1,9317 г) у мірній колбі на 100 мл з рухомою фазою. Відбирають 10 мл розчину, переносять до мірної колби на 100 мл і доводять об'єм рухомою фазою до мітки. Очікувана концентрація цефепіму дигідрохлориду гідрату – приблизно 1 мг/мл.

Результати та їх обговорення. Кількісне визначення проводили методом зовнішнього стандарту [9]: розчин порівняння та досліджуваний розчин попеременно хроматографували (табл. 1) і розраховували середні значення площ піків цефепіму.

Кількісне визначення порошку цефепіму методом ВЕРХ

№	Розчин порівняння		Досліджуваний розчин	
	час утримування, хв	площа піків	час утримування, хв	площа піків
1	5,054	23695600	5,054	21524144
2	5,046	23983184	5,050	21113696
3	5,058	23839888	5,047	21045104
4	5,064	23939865	5,040	21095677
5	5,042	23739787	5,069	21358459
Середнє значення	5,053	23839664	5,040	21227416
Відносне стандартне відхилення, %	0,18	0,52	0,21	0,97

Примітка. Коефіцієнт симетрії піків на хроматограмах 1,02–1,08; для розчину порівняння число теоретичних тарілок 3635–3672.

Заявлена кількість порошку цефепіму у флаконі 1000 мг, нормування протягом терміну придатності 90–115 % від заявленої кількості, тобто 900–1150 мг.

Кількість цефепіму обчислювали за формулою:

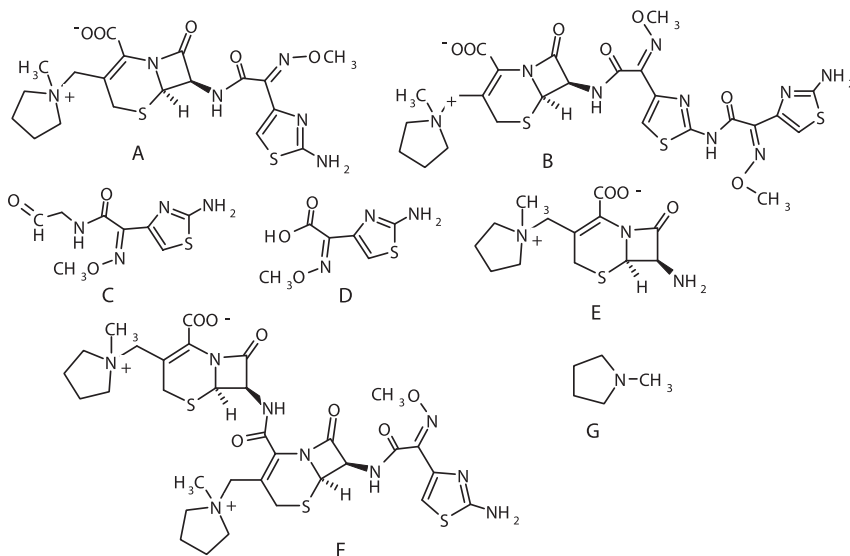
$$C_{\text{мг}} = \frac{S_{\text{досл.}} \cdot m_{\text{станд.}} \cdot 1000 \cdot W_{\text{ср}} \cdot M_{\text{base}} \cdot P}{S_{\text{порівн.}} \cdot 25 \cdot m_{\text{cef}} \cdot M_{\text{cef}}} \quad (1)$$

де $S_{\text{досл.}}$ – середня площа піка цефепіму на хроматограмі досліджуваного розчину, $m_{\text{станд.}}$ – наважка стандартного зразка цефепіму (мг), $W_{\text{ср}}$ – середня маса вмісту флакона (1,9317 г), P – чистота стандартного зразка цефепіму (0,931), M_{base} – молекулярна маса основи цефепіму, $S_{\text{порівн.}}$ – середня площа піка цефепіму на хроматограмі розчину порівняння, m_{cef} – маса наважки цефепіму (г), M_{cef} – молекулярна маса цефепіму дигідрохлориду гідрату.

Розрахунок з використанням цифр таблиці 1 і експериментальної частини показує, що $C_{\text{мг}} = 968,7$ мг (96,9 %), тобто вміст діючої сполуки в лікарському засобі відповідає вимогам нормативних документів.

Визначення супровідних домішок. У нормативних документах на лікарський засіб порошок цефепіму вказано, що сума ідентифікованих та неідентифікованих домішок протягом терміну придатності повинна бути не більше ніж 1,5 %. Окремо регламентується вміст N-метилпіролідину (не більше ніж 1,0 %).

Згідно з даними Європейської фармакопеї [10], субстанція цефепіму дигідрохлориду моногідрату може містити ідентифіковані домішки A-G:



Результати хроматографування 1 % розчину порівняння цефепіму

№	Час утримування, хв	Площа піків
1	4,276	400,879
2	4,281	400,456
3	4,284	400,902
4	4,295	401,255
5	4,263	400,247
Середнє значення	4,280	400,748
Відносне стандартне відхилення, %	0,27	0,10

Примітка. Коефіцієнт симетрії піків на хроматограмах 1,01–1,13

Сполуки А і В утворюються на останніх стадіях синтезу цефепіму, мають схожу розчинність і є основними забруднювачами його субстанції та лікарських засобів. Тому для порошку цефепіму вони нормуються індивідуально: уміст кожної допускається до 0,5 %.

У випробуваннях на супровідні домішки для порівняння можна використовувати розведений розчин основної речовини [9] і враховувати коефіцієнти перерахунку при визначенні площ піків: домішки А і В – 1,4, домішка Е – 1,8 [10].

Для кількісного визначення домішок були приготовлені досліджувані розчин і розчин порівняння (концентрація цефепіму 1 % від такої в досліджуваному розчині).

Хроматограму досліджуваного розчину цефепіму дигідрохлориду моногідрату відображено на рисунку, а результати випробувань наведено в таблицях 2, 3.

Європейська фармакопея наводить приблизний час утримування домішок відносно часу виходу цефепіму: домішка Е – 0,4, домішка F – 0,8, домішка А – 2,5, домішка В – 4,1 [10].

З урахуванням цих коефіцієнтів і часу виходу піка цефепіму 4,294 хв (табл. 3), для домішок Е, F, А і В орієнтовний час утримання складає близько 1,72, 3,43, 10,73 і 17,59 хв відповідно. Тому можна стверджувати, що домішки А і Е у тестованому зразку цефепіму відсутні. Домішки F і В, вірогідно, це «неідентифіковані» сполуки 5 і 10.

Розрахунок сумарної кількості домішок проводили за формулою:

$$\% \text{ домішки} = S_{\text{домішок}} / S_{\text{цефеп. порівн.}} \quad (2)$$

де $S_{\text{домішок}}$ – сумарна площа піків домішок на хроматограмі досліджуваного розчину; $S_{\text{цефеп. порівн.}}$ – площа піка цефепіму на хроматограмі 1 % порівняльного розчину.

Розрахунки показують, що сумарний уміст невідомих домішок 1–12 складає до 0,4 %, тобто суттєво менше дозволених 1,5 %.

Висновок

Перевірка методом ВЕРХ лікарського засобу «Порошок цефепіму для ін'єкційних розчинів» щодо кількісного вмісту та супровідних домішок показала, що він містить 96,9 % діючої речовини і $\leq 0,4$ % домішок, тобто відповідає вимогам нормативної документації й є безпечним для споживачів.

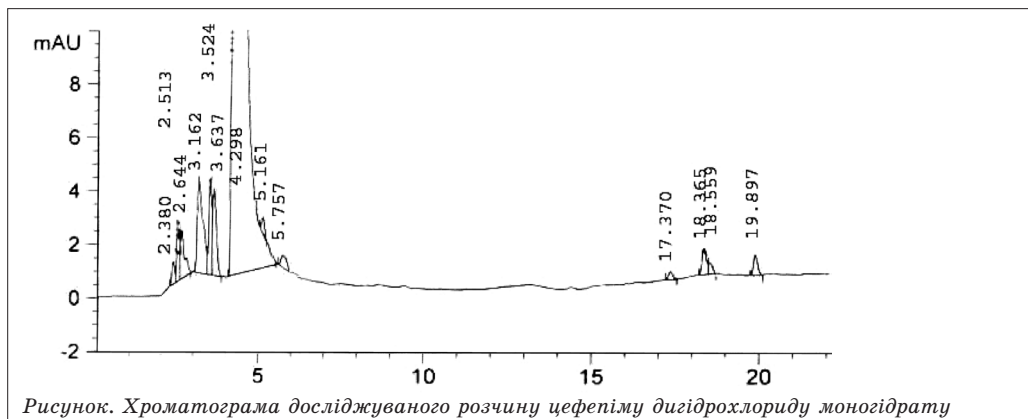


Рисунок. Хроматограма досліджуваного розчину цефепіму дигідрохлориду моногідрату

**Визначення методом ВЕРХ супровідних домішок
у досліджуваному розчині цефепіму**

№	Сполука	Час утримування, хв	Площа піків	№	Сполука	Час утримування, хв	Площа піків
1	Невідома домішка 1	2,354	5,237	8	Невідома домішка 7	5,112	3,812
		2,380	5,291			5,161	3,750
		2,415	5,335			5,215	3,878
	Середнє	2,383	5,288		Середнє	5,163	3,813
	Відносне стандартне відхилення, %	1,28	0,93		Відносне стандартне відхилення, %	1,00	1,68
2	Невідома домішка 2	2,486	13,372	9	Невідома домішка 8	5,721	5,685
		2,513	13,433			5,757	5,594
		2,523	13,215			5,789	5,632
	Середнє	2,507	13,340		Середнє	5,756	5,637
	Відносне стандартне відхилення, %	0,76	0,84		Відносне стандартне відхилення, %	0,59	0,81
3	Невідома домішка 3	2,621	15,983	10	Невідома домішка 9	17,650	2,725
		2,644	15,780			17,370	2,699
		2,673	15,904			17,13	2,683
	Середнє	2,646	15,889		Середнє	17,383	2,702
	Відносне стандартне відхилення, %	0,98	0,64		Відносне стандартне відхилення, %	1,5	0,78
4	Невідома домішка 4	3,159	42,945	11	Невідома домішка 10	18,127	9,353
		3,162	42,489			18,365	9,315
		3,180	42,503			18,578	9,283
	Середнє	3,167	42,646		Середнє	18,357	9,317
	Відносне стандартне відхилення, %	0,36	0,61		Відносне стандартне відхилення, %	1,23	0,38
5	Невідома домішка 5	3,489	22,213	12	Невідома домішка 11	18,649	3,27
		3,524	22,441			18,559	3,241
		3,547	22,331			18,461	3,216
	Середнє	3,520	22,328		Середнє	18,556	3,242
	Відносне стандартне відхилення, %	0,83	0,51		Відносне стандартне відхилення, %	0,51	0,83
6	Невідома домішка 6	3,618	26,622	13	Невідома домішка 12	19,959	6,331
		3,637	26,437			19,897	6,284
		3,652	26,838			19,778	6,239
	Середнє	3,636	26,632		Середнє	19,878	6,285
	Відносне стандартне відхилення, %	0,47	0,75		Відносне стандартне відхилення, %	0,46	0,73
7	Цефепім	4,318	25538,4	14	-	-	-
		4,298	25577,5		-	-	-
		4,266	25616,3		-	-	-
	Середнє	4,294	25577,4		-	-	-
	Відносне стандартне відхилення, %	0,61	0,15		-	-	-

Примітка. Коефіцієнт симетрії піків на хроматограмах 1,03–1,17

1. Страчунский Л. С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусов, С. Н. Козлов. – Смоленск: НИИАХ СГМА, 2007. – 464 с.
2. Pacifici G. M. Clinical Pharmacokinetics of Penicillins, Cephalosporins and Aminoglycosides in the Neonate / G. M. Pacifici // *Pharmaceuticals*. – 2010. – V. 3. – P. 2568–2591.
3. Chapman T. M. Cefepime: a review of its use in the management of hospitalized patients with pneumonia / T. M. Chapman, C. M. Perry // *Am. J. Respir. Med.* – 2003. – V. 2 (1). – P. 75–107.
4. Laws A. The chemistry and structure-activity relationships of C3-quaternary ammonium cephem antibiotics / A. Laws, M. Page // *J. Chemother.* – 1996. – V. 8, Suppl 2. – P. 7–22.
5. Qiang T. Single-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid using cell-bound and support-bound enzymes / T. Qiang, S. Qingxun, W. Dongzhi // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – V. 39 (5). – P. 1166–1172.
6. WO2013114319 A1, CO7D501/06. Process for the direct preparation of cefepime for injectable use / A. Antonioni, R. D. Falko, L. Olivieri, D. Sacchitelli; заявл. 31.01.2013; опубл. 08.08.2013.
7. Synthesis of cefepime hydrochloride / D. Peng, X. Wang, Y. Liu [et al.] // *J. Central South University (Science and Technology)*. – 2015. – V. 46 (7). – P. 2405–2411.
8. Смирнов В. А. Анализ лекарственных средств / В. А. Смирнов. – Самара : СГТУ, 2008. – 66 с.
9. Державна Фармакопея України, Т. 1. – Харків : «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – 1128 с.
10. European Pharmacopoeia, Seven Edition, V. 2. – Nordlingen : Druckerei C. H. Beck, 2011. – P. 1610.

Н. О. Савіна, О. М. Кузнецова, А. М. Черемненко, В. М. Брицун, Н. В. Останіна **Дослідження кількісного вмісту і супровідних домішок цефепіму методом ВЕРХ**

У дослідженні проведено оцінку якості лікарського засобу цефепіму (порошок для ін'єкційних розчинів іноземного виробництва). Здійснено кількісне визначення і контроль супровідних домішок методом обернено-фазової ВЕРХ в ізократичному та градієнтному режимах.

Детектування проведено на спектрофотометричному детекторі, при $\lambda = 254$ нм на колонках EclipsePlus C18 і Hypersil BDS-C18. Тест придатності хроматографічної системи відповідав вимогам нормативної документації. Статистичний аналіз отриманих результатів і оцінку невизначеності здійснено відповідно до вимог Державної Фармакопеї України.

Кількісне визначення основної сполуки проводили методом зовнішнього стандарту. Рухома фаза – фосфатний буфер : ацетонітрил. Розчин порівняння і досліджуваній розчин попеременно інжектували по 5 разів, після чого розраховували середні значення площ піків цефепіму.

Заявлена кількість порошку цефепіму у флаконі 1000 мг, нормування протягом терміну придатності 90–115 % від заявленої кількості, тобто 900–1150 мг.

Знайдено, що вміст субстанції в лікарському засобі дорівнює 968,7 мг (96,9 %), тобто вміст діючої сполуки знаходиться в межах норми.

Для контролю вмісту домішок були приготовлені досліджуваній розчин і розчин порівняння (концентрація цефепіму 1 % від такої у досліджуваному розчині).

Рухома фаза для визначення домішок містить ацетонітрил і водний розчин $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 5).

У нормативних документах на лікарський засіб «Порошок цефепіму» вказано, що сума ідентифікованих та неідентифікованих домішок протягом терміну придатності повинна бути не більше ніж 1,5 %. Після інжекції розчинів і обробки хроматограм було з'ясовано, що сумарний вміст домішок складає до 0,4%.

Таким чином, за перевіреними показниками лікарський засіб «Порошок цефепіму для ін'єкційних розчинів» відповідає вимогам нормативних документів.

Ключові слова: цефепім, порошок для ін'єкційних розчинів, ВЕРХ, кількісне визначення, супровідні домішки

Н. А. Савіна, Е. М. Кузнецова, А. Н. Черемненко, В. Н. Брицун, Н. В. Останіна **Исследование количественного содержания и сопутствующих примесей цефепима методом ВЭЖХ**

В исследовании проведена оценка качества лекарственного средства цефепима (порошок для инъекционных растворов иностранного производства). Выполнено количественное определение и контроль сопутствующих примесей методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом и градиентном режимах.

Детектирование осуществляли на спектрофотометрическом детекторе, при $\lambda = 254$ нм на колонках EclipsePlus C18 и Hypersil BDS-C18.

Тест пригодности хроматографической системы соответствовал требованиям нормативной документации. Статистический анализ полученных результатов и оценку неопределенности выполняли в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины.

Количественное определение основного вещества проводили методом внешнего стандарта. Подвижная фаза – фосфатный буфер : ацетонитрил. Раствор сравнения и исследуемый раствор попеременно инжектировали по 5 раз, после чего рассчитывали средние значения площадей пиков цефепима.

Заявленное количество порошка цефепима во флаконе 1000 мг, нормирование на протяжении срока годности 90–115 % от заявленного количества, то есть 900–1150 мг.

Найдено, что содержание субстанции в лекарственном средстве составляет 968,7 мг (96,9 %), то есть содержание действующего соединения находится в пределах нормы.

Для контроля содержания примесей были приготовлены исследуемый раствор и раствор сравнения (концентрация цефепима 1 % от таковой в исследуемом растворе).

Подвижная фаза для определения примесей содержит ацетонитрил и водный раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 5).

В нормативных документах на лекарственное средство «Порошок цефепима» указано, что сумма идентифицированных и неидентифицированных примесей на протяжении срока пригодности должна быть не более 1,5 %.

Посля инъекции растворов и обработки хроматограмм было установлено, что суммарное содержание примесей составляет до 0,4 %.

Таким образом, по проверенным показателям лекарственное средство «Порошок цефепима для инъекционных растворов» соответствует требованиям нормативных документов.

Ключевые слова: цефепим, порошок для инъекционных растворов, ВЭЖХ, количественное определение, сопутствующие примеси

N. A. Savina, E. M. Kuznetsova, A. M. Cheremenko, V. M. Britsun, N. V. Ostanina **Research by HPLC method the quantitative determination and related impurities of cefepime**

The quality assessment of drug cefepime (powder for injection solutions, foreign production) carried out in this work.

A quantitative determination and control of related impurities of cefepime powder were made by method HPLC in isocratic and gradient modes.

Detection was conducted on a spectrophotometric detector, $\lambda = 254$ nm, respectively, by columns EclipsePlus C18 and Hypersil BDS-C18.

Test of chromatographic system suitability responded the requirements of regulatory documents.

Statistical analysis of the obtained results and uncertainty evaluation carried out in accordance with the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine.

The quantitative determination of basic compound was carried out by external standart method.

Mobile phase – phosphate buffer : acetonitrile. Reference solution and the test solution were injected alternately 5 times, and the average values of the peak areas of cefepime were calculated.

The claimed amount of cefepime powder in vial 1000 mg, rationing throughout the shelf life 90–115 % of the claimed amount, that is 900–1150 mg.

It was found that the content of the substance in the medicament is 968,7 mg (96,9 %) – the content of the active compound is in the normal range.

To control the content of impurities were prepared test solution and reference solution (1 % concentration of cefepime alone in the test solution).

Mobile phase for the determination of impurities contains acetonitrile and an aqueous solution of $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 5).

The regulations on drug cefepime powder indicated that the amount of the identified and unidentified impurities during shelf life should be no more than 1,5 %.

After injection of solutions and processing of chromatograms was found that the total impurity content is up to 0,4 %.

It is shown that the tested parameters of drug cefepime powder for injection solutions comply the requirements of normative documents.

Key words: cefepime, powder for injection solutions, HPLC, quantitative determination, related compounds

Надійшла: 13 липня 2016 р.

Контактна особа: Брицун Василь Миколайович, доктор хімічних наук, головний науковий співробітник, Державна науково-дослідна лабораторія з контролю якості лікарських засобів, ДУ «Інститут громадського здоров'я імені О. М. Марзєєва Національної академії медичних наук України», буд. 50, вул. Попудренка, м. Київ, 02660. Тел.: + 38 0 44 559 77 11.

До ювілею члена-кореспондента НАН і НАМН України, професора, доктора медичних наук, лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Івана Сергійовича Чекмана



Іван Сергійович Чекман – один із засновників сучасної української фармакології та її галузей: фізико-хімічної, квантової та нанофармакології. Іван Сергійович – член-кореспондент НАН і НАМН України, професор, доктор медичних наук, член-кореспондент Нью-Йоркської академії наук, почесний професор Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Народився 4 жовтня 1936 року в селі Чаньків Дунаєвського району Хмельницької області в родині колгоспників.

Після закінчення Чаньківської семирічної школи вступив до Кам'янець-Подільського медичного училища. Надалі навчався у Вінницькому медичному інституті та новому Тернопільському медичному інституті, який закінчив з відзнакою. За розподіленням Іван Сергійович поїхав на роботу головним лікарем до Лонковецької дільничної лікарні Волочинського району Хмельниччини, через рік став головним лікарем Курилівської дільничної лікарні цього району.

Жага до знань стала підставою для вступу Івана Сергійовича Чекмана в 1963 році до аспірантури на кафедру фармакології Київського медичного інституту, яку очолював всесвітньо відомий вчений – академік Олександр Ілліч Черкес.

У 1966 році Іваном Сергійовичем Чекманом успішно захищена кандидатська дисертація на тему «Експериментальні дослідження похідних пропініламіну», у якій розкриті нові механізми дії інгібіторів MAO. На посаді асистента кафедри фармакології Іван Сергійович Чекман перебував з 1966 по 1969 роки, упродовж 1969–1972 років був обраний на посаду доцента, а з 1972 року – завідувачем кафедри фармакології. У 1982–2014 роках Іван Сергійович очолював кафедру фармакології та клінічної фармакології Київського медичного інституту. У 1987–1991 роках – директор Київського науково-дослідного інституту фармакології і токсикології НАМН України.

У 1973 році ним була захищена докторська дисертація на тему «Експериментальні дослідження механізмів дії антиадренергічних засобів», у рамках якої вперше в світі встановлений фізико-хімічний механізм дії симпатолітику резерпіну, що стосується його впливу на процеси депонування.

Іван Сергійович Чекман проводив дослідження в декількох напрямках фармакології та клінічної фармакології. Так, у галузі загальної фармакології вперше експериментально встановив, що в розвитку первинної фармакологічної реакції основне значення має властивість ліків утворювати комплекси з біолігандами (альбуміном, амінокислотами, ліпідами, вуглеводами) і біометалами (кальцієм, магнієм, міддю тощо), нікотинамідом, аденіловими нуклеотидами (АТФ, АДФ, АМФ). Ним була встановлена

теоретична закономірність утворення комплексів серцево-судинних засобів з катіонами біометалів, що дало змогу проводити цілеспрямований синтез сполук різної хімічної природи. Уперше у вітчизняній практиці в 1986 році розроблені методичні рекомендації з доклінічного вивчення нових кардіотонічних засобів, затвержені МОЗ СРСР, надалі удосконалені та затвержені МОЗ України в 2000 році. Результати цих досліджень узагальнені в монографіях: «Биологические аспекты координационной химии», 1979 р.; «Физическая химия и клиническая фармакология сердечных гликозидов», 1985 р.; «Магний в медицине», 1992 р.; «Магнієвмісні препарати: фармакологічні властивості, застосування», 2007 р.; «Кардиотонические стероиды», 2009 р.; «Bioactive natural products: opportunities and challenges in medical chemistry», 2011 р.

У галузі біохімічної фармакології проводив дослідження з механізму дії серцевих препаратів різної будови, метаболічних засобів, антидотів. Отримав нові дані щодо біохімічних механізмів первинного фармакологічного ефекту на органному, клітинному і субклітинному рівнях таких ліків, як серцеві глікозиди, інші серцево-судинні засоби, метаболічні препарати (кверцетин, тіотриазолін, елгацин, яктон), ангіопротектори, антидоти (унітіол, дипіроксим, алоксим). Результати цих досліджень узагальнені в монографіях: «Биохимическая фармакодинамика», 1990 р.; «Микросомальная ферментная система организма», 1996 р.; «Очерки фармакологии средств метаболической терапии», 2001 р.; «Кардиопротекторы», 2005 р.; «Тиотриазолин», 2005 р.; «Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции», 2009 р.; «Нікотинамід», 2009 р.

У галузі квантової фармакології Іваном Сергійовичем проведені дослідження зі встановлення просторової будови та електронної структури молекул лікарських засобів різних фармакологічних груп, зв'язку між їхньою хімічною структурою та фармакологічною активністю (QSAR), ролі розчинника в

механізмі дії препаратів, а також вивчення принципів створення фармакофорів лікарських засобів, *de novo* розробки препаратів для лікування різних захворювань, прогнозування фармакологічної активності лікарських засобів, встановлення білок-лігандних взаємодій під час хімічних реакцій. У видавництві «Наукова думка» у 2012 році вийшла друком монографія «Квантова фармакологія».

У галузі нанофармакології, завдяки створенню спільної лабораторії Інституту електрозварювання імені Є. О. Патона НАН України та Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Електронно-променевої нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини», а також плідній співпраці з НДІ України, досліджені механізми дії наночастинок металів, нанодисперсного кремнезему та деяких нанокompatитів. Особливо важливими є результати наукових пошуків у напрямі визначення квантово-хвильових властивостей наночастинок. Результати роботи висвітлені в монографіях: «Нанофармакологія», 2011 р.; «Основи наномедицины», 2011 р.; «Нанонаука, нанобіологія, нанофармація», 2012 р.; «Природні наноструктури та наномеханізми», 2012 р.; «Аминокислоты – наноразмерные молекулы», 2014 р.

У галузі клінічної фармакології І. С. Чекман провів фундаментальні та прикладні дослідження, узагальнені в 6 монографіях та 9 довідниках. Розроблена класифікація побічної дії ліків, представлена в монографії «Осложнения фармакотерапии», 1980 р. У 1986 році вперше випущений довідник «Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии», який витримав 2 видання, а довідник «Рецептурный справочник врача», у свою чергу, витримав 8 видань, випущений загальним тиражем 1 мільйон 300 тисяч екземплярів і вже багато років є настільною книгою лікарів різних спеціальностей. Крім цього, надруковані «Рецептурный справочник врача эндокринолога», «Нестероидні протизапальні препарати: ефективність, доступність і прийнятність для

пацієнта», 2011 р.; «Неотложная помощь в педиатрии», 1976 р.; «Врачебная рецептура в педиатрической практике. Принципы дозирования лекарств детям» у книзі «Фармакотерапія в педиатрії», 1980 р.; «Фармакологія кардіоактивних средств в раннем онтогенезе», 1982 р., «Дерматофармакологія», 2010 р.

Результати досліджень з фітотерапії узагальнені у монографіях: «Растительные лекарственные средства», 1983 р.; «Рецепты сборов лекарственных растений. Нетрадиционные методы лечения», 1992 р.; «Клінічна фітотерапія. Природа лікує», «Фитонциды в эргономике», 1986 р.; «Фитонциды в медицине», 1990 р.; «Екологічна фармакологія», 2000 р.; «Спирулина и здоровье», 2000 р.

Іваном Сергійовичем Чекманом написані змістовні наукові роботи з історії розвитку української фармакології та клінічної фармакології, узагальнені у монографії «Історія лікознавства», 2014 р.

За досягнення в галузі радіаційної біології Іван Сергійович Чекман у 1986 році отримав Державну премію України.

Для успішної підготовки вітчизняних і зарубіжних студентів з клінічної фармакології видано 2 підручника: «Клінічна фармакологія», 2008 р.; «Clinical pharmacy», 2010 р.; 3 навчальних посібника: «Клінічна фітотерапія», 2006 р.; «Клиническая фармация», 2009 р.; «Побічні реакції серцево-судинних засобів», 2010 р.

Іван Сергійович Чекман підготував 91 книгу: монографій – 42, підручників для студентів – 23, довідників та посібників для лікарів – 14, посібників

для студентів – 8, словників – 3, художню книгу – 1, патентів – 87, а також більше 1000 статей, тез. Під його керівництвом підготовлено 22 доктора і 60 кандидатів медичних наук.

Слід відмітити особливість творчості Івана Сергійовича – він не тільки цікавився біографіями великих особистостей, але й відображав це в публікаціях. Так, має роботи, присвячені життєвим шляхам сім'ї Нобелів, у яких підкреслив роль Альфреда Нобеля у створенні славетно відомого Нобелівського фонду.

Високий рівень наукових досягнень Івана Сергійовича Чекмана було оцінено обранням його членом-кореспондентом НАН і НАМН України, врученням Державної премії України, присвоєнням звання «Заслужений діяч науки і техніки України», нагородженням орденом «Знак пошани», почесною грамотою Кабінету Міністрів України, почесною грамотою Київського міського голови, медалями Ярослава Мудрого, академіка М. Кравкова.

Іван Сергійович Чекман зустрічає свій ювілей на злеті творчої активності, у вирі наукового, педагогічного, суспільно-політичного життя. Вітчизняна наукова громадськість, співробітники та учні щиро вітають його з ювілеєм та бажають міцного здоров'я, нескінченної енергійності, подальшого здійснення задумів і нових творчих досягнень.

*Кафедра фармакології
Національного медичного університету імені О. О. Богомольця,
ВГО «Асоціація фармакологів
України»,
ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»*

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Бухтиарова Т. А., Губский Ю. И.* «Лекарства-сироты» на основе новых молекулярных субстанций, одобренные FDA в 2011–2015 годах (аналитический обзор)3
- Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г.* Винборон: первый украинский гастропротектор – агонист ванилоидных рецепторов (TRPV1)20

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

- Каврайский Д. П., Штрыголь С. Ю., Цывунин В. В., Георгиянц В. А.* Острая токсичность и эффективность 1-(4-метоксифенил)-5-{2-[4-(4-метоксифенил) пиперазин-1-ил]-2-оксоэтил}-1,5-дигидро-4Н-пиразоло[3,4 D] пиридин-4-она на модели пентилентетразолового киндлинга у мышей30
- Миرونенко С. И., Пиняжко О. Р., Лесык Р. Б.* Влияние оригинальных производных 4-тиазолидинона: Les-1205 и Les-2658, леветирацетама и диазепам на поведение условно-рефлекторного активного избегания у крыс ..35
- Слипченко Г. Д., Штрыголь С. Ю., Кудина О. В., Таран А. В., Рубан Е. А.* Сравнительное доклиническое изучение психотропных свойств препаратов шлемника байкальского41

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

- Белай И. М., Цыс А. В., Михайлюк Е. О., Коваленко С. И., Шабельник К. П.* Исследование актопротекторной активности производных 1,2,4-триазола в эксперименте50
- Дрынь Д. О., Мельник М. И., Соловьев А. И., Прилуцкий Ю. И., Жолос О. В.* Углеродные наночастицы как новейшие блокаторы мускариновых катионных токов в миоцитах тонкого кишечника55
- Кононенко А. Г., Кравченко В. Н.* Влияние спиртовой настойки листеца ряски малой на морфофункциональное состояние щитовидной железы при экспериментальном гипотиреозе.....62
- Нагорная Е. А., Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А., Чекман И. С.* Действие ирбесартана, квинаприла, ангиолина и их комбинаций на систему оксида азота в миокарде крыс со спонтанной артериальной гипертензией70
- Павлов С. В., Левченко Е. В.* Цитопротективные эффекты селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов в условиях гипоксии кардиомиоцитов *in vitro*78
- Фалюш О. А., Полякова Л. И., Сачинская О. В., Резников А. Г.* Изменения эпителиально-стромального соотношения в трансплантатах рака предстательной железы человека при применении наночастиц золота.....84

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ

- Кравец Д. С., Лукьянчук В. Д.* Новый методический подход к оценке влияния лекарств на кинетику свободнорадикальных реакций в биосубстратах90

ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

- Садогурская Е. В.* К вопросу безопасности нанохрома цитрата при повторном введении.....95

ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА, ФАРМАКОЭКОНОМИКИ

- Савина Н. А., Кузнецова Е. М., Череменко А. Н., Брицун В. Н., Останина Н. В.* Исследование количественного содержания и сопутствующих примесей цефепима методом ВЭЖХ.....101

ЛИЧНОСТИ108

CONTENT

REVIEWS

- Bukhtiarova T., Gubsky Yu.* «Orphan drugs» on the basis of new molecular entities approved FDA in 2011–2015 (Analytical Review).....3
- Hladkykh F. V., Stepaniuk N. H.* Vinboron: first Ukrainian gastroprotector – agonist vanilloid receptor (TRPV1).....20

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

- Kavraiskyi D. P., Shtrygol' S. Yu., Tsyvunin V. V., Georgiyants V. A.* Acute toxicity and efficiency of 1-(4-metoxiphyenyl)-5-{2-[4-(4-metoxiphyenyl)piperazine-1-yl]-2-oxoethyl}-1,5-dihydro-4H-pyrazole[3,4-D]pyridine-4-one on pentylenetetrazol kindling model in mice30
- Myronenko S. I., Pinjazko O. R., Lesyk R. B.* The influence of original 4-thiazolidinone derivatives: Les-1205 and Les-2658, levetiracetam and diazepam on behaviour conditioned reflex active avoidance in rats.....35
- Slipchenko G. D., Shtrygol' S. Yu., Kudina O. V., Taran A. V., Ruban O. A.* The comparative pre-clinical study of psychotropic properties of the medicines from *Scutellaria baicalensis* Georgi41

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

- Bilay I. M., Tsys O. V., Mykhailiuk E. O., Kovalenko S. I., Shabelnik K. P.* Actoprotective activity of 1,2,4-triazole derivatives in experiment.....50
- Dryn D., Melnyk M., Soloviev A., Prylutskyy Yu., Zholos A.* Carbon nanoparticles as novel blockers of muscarinic cation currents in myocytes of the small intestine55
- Kononenko A. G., Kravchenko V. N.* Influence of tincture from lemna minor frond on morphofunctional state of thyroid gland in experimental hypothyroidism62
- Nagornaya E. A., Belenichev I. F., Gorchakova N. A., Chekman I. S.* Action of irbesartan, quinapril, angiolin and their combinations on NO system in rat myocardium with spontaneous hypertension.....70
- Pavlov S. V., Levchenko K. V.* Cytoprotective effects of selective modulators of estrogen receptors in hypoxia of cardiomyocytes *in vitro*78
- Falyush O. A., Polyakova L. I., Sachynska O. V., Reznikov A. G.* The changes of epithelial-stromal ratio in transplants of human prostate cancer under application of gold nanoparticles.....84

THE DEVELOPMENT OF NEW METHODOLOGICAL APPROACHES

- Kravets D. S., Lukyanchuk V. D.* New methodological approach to the assessment of drug effects on kinetics of free radical reactions in the biosubstrates.....90

INVESTIGATIONS OF YOUNG SCIENTISTS

- Sadogurska K. V.* To the issue of safety of nanochromium citrate under repeated administrations95

ISSUES OF PHARMACY, PHARMACEUTICAL MARKET, PHARMACOECONOMICS

- Savina N. A., Kuznetsova E. M., Cheremenko A. M., Britsun V. M., Ostanina N. V.* Research by HPLC method the quantitative determination and related impurities of cefepime..... 101

- PERSONALITY**..... 108