
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.

№ 4–5 (55)/2017

Виходить 1 раз на 2 місяці

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Бондаренко Л. Б.* Метаболічний синдром: епігенетичні фактори.....3
Шляховенко В. О., Орловський О. А., Самойленко О. А., Вербиненко А. В.
Рибонуклеази – можливий новий напрям у розробці методів лікування пухлин 13

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

- Беленичев И. Ф., Литвиненко Е. С.* Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* 20
Кабачна І. В., Дроговоз С. М., Кабачний В. І., Палагіна Н. Ю. Дослідження аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів на моделі кетамінового наркозу 27
Криворучко Т. М. Оцінка спектра антипаркінсонічної дії гліцину сумісно з амантадином у щурів за умов екстрапірамідних порушень 33
Ларіонов В. Б., Головенко М. Я. Молекулярний докінг бенздіазепінів – алостеричних модуляторів ГАМК-рецептора..... 38
Штриголь С. Ю., Цивунін В. В., Штриголь Д. В., Лебединець І. О., Койро О. О. Експериментальне обґрунтування доцільності використання фітопрепаратів у комбінованій фармакотерапії судомних станів 50

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

- Белікова О. І., Черно В. С., Костенко В. О.* Поєднаний вплив мелатоніну та метформіну гідрохлориду на біохімічні маркери синдрому інсулінорезистентності за умов експериментального гіпопінеалізму..... 57
Демченко С. А., Бобкова Л. С., Баглай О. Ю., Вороніна А. К., Демченко А. М. Гепатопротекторна активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену 66
-

<i>Khromov A., Dobrel'ya N., Strielkov I., Klymenko K., Novokhatska T., Dosenko V., Soloviev A.</i> Inhibition of PKC-delta expression using siRNAs restores coronary dilation in rats with streptozotocin-induced diabetes.....	71
<i>Садогурська К. В., Косу́ба Р. Б., Яре́мій І. М., Зелений В. Г.</i> Вивчення гіпоглікемічної активності нанохрому цитрату в тварин з експериментальним цукровим діабетом 2 типу.....	82
<i>Фіцнер О. А., Хайтович М. В.</i> Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей мелатоніну.....	89
<i>Яцина О. І., Паршиков О. В., Костєв Ф. І., Соловйов А. І.</i> Зміни скоротливої діяльності гіперактивного сечового міхура щурів під впливом троспію хлориду	96
АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ	
<i>Трутаєв С. І., Штриголь С. Ю., Кошова О. Ю., Лебединець І. О.</i> Результати дослідження специфічної токсичності таблеток «Долосан Форте®».....	102
СОДЕРЖАНИЕ	111
CONTENT	112

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Бондаренко Л. Б.* Метаболический синдром: эпигенетические факторы3
- Шляховенко В. А., Орловский А. А., Самойленко Е. А., Вербиненко А. В.*
Рибонуклеазы – возможное новое направление в разработке методов
лечения опухолей..... 13

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

- Беленичев И. Ф., Литвиненко Е. С.* Нейропротекторная активность
модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования
глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*20
- Кабачная И. В., Дрогвоз С. М., Кабачный В. И., Палагина Н. Ю.*
Исследование аналептической активности производного серо-
и азотсодержащих гетероциклов на модели кетаминового наркоза 27
- Криворучко Т. Н.* Оценка спектра антипаркинсонического действия
глицина совместно с амантадином у крыс в условиях экстрапирамидных
нарушений33
- Ларионов В. Б., Головенко Н. Я.* Молекулярный докинг
бенздиазепинов – аллостерических модуляторов ГАМК-рецепторов38
- Штрыголь С. Ю., Цывунин В. В., Штрыголь Д. В., Лебединец И. А.,
Койро О. О.* Экспериментальное обоснование целесообразности
использования фитопрепаратов в комбинированной
фармакотерапии судорожных состояний.....50

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

- Беликова Е. И., Черно В. С., Костенко В. А.* Сочетанное влияние
мелатонина и метформина гидрохлорида на биохимические маркеры
синдрома инсулинорезистентности при экспериментальном гипопинеализме 57
- Демченко С. А., Бобкова Л. С., Баглай А. Ю., Воронина А. К.,
Демченко А. М.* Гепатопротекторная активность производных
5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазапента[сd]азулена66
- Хромов А. С., Добреля Н. В., Стрелков Е. В., Клименко К. И.,
Новохацкая Т. В., Досенко В. Е., Соловьев А. И.* Ингибирование
экспрессии РКС-дельта с использованием siRNAs восстанавливает дилатацию
коронарных артерий у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом 71
- Садогурская Е. В., Косуба Р. Б., Яремий И. Н., Зеленюк В. Г.* Изучение
гипогликемической активности нанохрома цитрата у животных
с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа.....82
- Фицнер Е. А., Хайтович Н. В.* Квантово-фармакологическое исследование
антиоксидантных свойств мелатонина.....89
- Яцина А. И., Паршиков А. В., Костев Ф. И., Соловьев А. И.* Изменения
сократительной деятельности гиперактивного мочевого пузыря у крыс
под влиянием троспия хлорида96

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

- Трутаев С. И., Штрыголь С. Ю., Кошечая Е. Ю., Лебединец И. А.* Результаты
исследования специфической токсичности таблеток «Долосан форте®» 102

CONTENT

REVIEWS

- Bondarenko L. B.* Metabolic syndrome: epigenetic factors.....3
Shlyakhovenko V. O., Orlovsky O. A., Samoylenko O. A., Verbinenko A. V.
Ribonucleases – a new possible direction in elaboration of the cancer treatment..... 13

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

- Belenichev I. F., Lytvynenko E. S.* Neuroprotective action of glutathione system modulators in conditions of glutamate excitotoxicity modeling *in vitro*20
Kabachna I. V., Drohovor S. M., Kabachnyy V. I., Palagina N. Yu. Analeptic activity investigation of the derivative of sulfur and nitrogen containing heterocycles on the model of ketamin anesthesia.....27
Kryvoruchko T. M. Evaluation of the antiparkinson's effects of glycine compatible with amantadine in rats under extrapyramidal disorders33
Larionov V. B., Golovenko N. Ya. Molecular docking of benzodiazepins – GABA-receptor allosteric modulators38
Shtrygol' S. Yu., Tsyvunin V. V., Shtrygol' D. V., Lebedinets I. A., Koyro O. O. Experimental substantiation of expediency of herbal remedies use in combined pharmacotherapy of convulsive states50

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

- Belikova O. I., Chernov V. S., Kostenko V. O.* Effects produced by co-administration of melatonin and metformin hydrochloride on biochemical markers of insulin resistance syndrome in modeled hypopinealism57
Demchenko S. A., Bobkova L. S., Bahlai A. Y., Voronina A. K., Demchenko A. M. Hepatoprotective activity of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene66
Khromov A., Dobrelya N., Strielkov I., Klymenko K., Novokhatska T., Dosenko V., Soloviev A. Inhibition of PKC-delta expression using siRNAs restores coronary dilation in rats with streptozotocin-induced diabetes71
Sadokhurska K. V., Kosuba R. B., Yaremiy I. M., Zeleniuk V. G. Study of hypoglycemic activity of nanochromium citrate in animals with experimental type 2 diabetes mellitus.....82
Fitsner O. A., Khaitovych M. V. A quantum-pharmacological study of melatonin's antioxidant properties.....89
Iatsyna O. I., Parshykov O. V., Kostev F. I., Soloviev A. I. Tropicium chloride treatment alters rats hyperactive bladder contractile activity96

CURRENT ISSUES OF DRUG TOXICOLOGY

- Trutaev S. I., Shtrygol' S. Yu., Koshevaya E. Y., Lebedinets I. A.* The results of the specific toxicity studies of «Dolosan Forte®» tablets..... 102

Л. Б. Бондаренко

Метаболічний синдром: епігенетичні фактори

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

Ключові слова: метаболічний синдром, епігенетичні фактори, ДНК-фрагментація, псевдо Пельгер-Х'юїтт синдром

Останнє десятиріччя є часом бурхливого поширення та значного «омолодження» метаболічного синдрому (МС). Якщо ще 50 років тому даний патологічний стан асоціювався в основному з дорослими людьми, переважно середнього віку, то тепер значне занепокоєння медичної спільноти викликає швидке розповсюдження МС серед дітей і підлітків. Ситуація ускладнюється ще й тим, що не зважаючи на інтенсивні дослідження МС протягом останніх десятиріч, серед самих дослідників немає повної єдності у визначенні даного патологічного стану та його провідних діагностичних критеріїв (таблиця) [1].

До того ж, якщо ще в 2005 році більшість дослідників МС виходили з того, що наявність ожиріння, гіперліпідемії та інсулінорезистентності є першочерговими діагностичними критеріями для МС, то вже в 2009 році узагальнення накопичених нових результатів досліджень показало, що жодному з усіх вищезгаданих критеріальних показників не може бути наданий пріоритет. Станом на 2017 рік для діагностування МС достатньою є наявність будь-яких трьох із вищенаведених критеріїв (таблиця), і ожиріння не є обов'язковою ознакою [2].

Загалом на початку XXI століття уявлення більшості дослідників щодо процесів, залучених до розвитку МС, можна описати за допомогою такої схеми (рис. 1). Відповідно до неї для старту патологічних процесів однаково важливими є як зовнішні фактори (стиль життя, стреси), так і генетичні (спадковий фенотип і генотип).

З наведеної схеми стає очевидним, до яких тяжких наслідків може призвести МС і необхідність максимально ранньої його діагностики та початку фармакотерапії. На додаток до серцево-судинних захворювань і цукрового діабету 2 типу, людина з МС також більш схильна до інших захворювань, у тому числі, полікістозу яєчників, ожиріння печінки, утворення холестеринових жовчних каменів, астми, порушень сну і деяких форм раку, таких як рак молочної залози, підшлункової залози, товстої та прямої кишки, передміхурової залози [3, 4].

Незважаючи на великі зусилля, прикладені протягом останніх десятиліть з метою вивчення етіології МС, його основні чинники остаточно так і лишаються поки не з'ясованими. Перегляд критеріальних показників МС призвів до накопичення значного масиву принципово нових даних стосовно даного стану, що в свою чергу зумовило переосмислення ролі окремих факторів, які його зумовлюють.

Методичні підходи молекулярної біології та генетики, а також конкретні дані, що були одержані в ході реалізації декількох проектів з вивчення геному, змінили процес дослідження локалізації та ідентифікації генів, залучених до різних захворювань людини [5]. Інтерес до генетичної основи захворювань людини тривав десятиліттями, а останні повідомлення про відкриття генів, пов'язаних з тими чи іншими хворобами, вказують на те, що найближчим часом будуть розроблені експрес-тести для прогнозування здоров'я людини. Прогрес у боротьбі проти МС прискорюється також і наявністю загальної інформації щодо геномів людини, щурів, мишей та інших організмів.

Діагностичні критерії метаболічного синдрому [1]

Показник	Міжнародна федерація діабету (IDF)	Американська кардіологічна асоціація (AHA)	Національна програма з вивчення холестерину – панель лікування дорослих (NCEP-ATP)	Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ)	Європейська група з вивчення інсулінорезистентності (EGIR)
Ожиріння	Індекс маси тіла > 30 кг/м ² чи специфічні щодо статі та національності межі ожирінності талії	Ожирінність талії для чоловіків > 40 дюймів (102 см), для жінок > 35 дюймів (87 см)	Ожирінність талії для чоловіків > 40 дюймів (102 см), для жінок > 35 дюймів (87 см)	Співвідношення окружностей талії/стегон > 0,9 у чоловіків та > 0,85 у жінок чи індекс маси тіла > 30 кг/м ²	Ожирінність талії для чоловіків > 94 см, для жінок > 80 см
Підвищений рівень тригліцеридів	Тригліцериди > 150 мг/дл чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Тригліцериди (натщесерце) > 150 мг/дл чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Тригліцериди > 150 мг/дл чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Тригліцериди > 177 мг/дл	
Знижений вміст ліпопротеїнів високої щільності	Ліпопротеїни високої щільності < 40 мг/дл у чоловіків та < 50 мг/дл у жінок чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Ліпопротеїни високої щільності < 40 мг/дл у чоловіків та < 50 мг/дл у жінок чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Ліпопротеїни високої щільності < 40 мг/дл у чоловіків та < 50 мг/дл у жінок чи специфічне лікування цієї ліпідної аномалії	Ліпопротеїни високої щільності < 35 мг/дл у чоловіків та < 39 мг/дл у жінок	Ліпопротеїни високої щільності < 39 мг/дл
Гіпертензія	Систолічний тиск крові > 130 чи діастолічний тиск крові > 85 мм ртутного стовпа чи лікування раніше діагностованої гіпертензії	Тиск крові > 130/85 мм ртутного стовпа чи прийом засобів від гіпертензії	Систолічний тиск крові > 130 чи діастолічний тиск крові > 85 мм ртутного стовпа чи прийом засобів від гіпертензії	> 140/90 мм ртутного стовпа	> 140/90 мм ртутного стовпа чи прийом засобів від гіпертензії
Гіперлікемія	Уміст глюкози в плазмі крові (натщесерце) > 100 мг/дл чи раніше діагностований діабет 2 типу	Уміст глюкози в плазмі крові (натщесерце) > 100 мг/дл чи прийом гіпоглікемічних засобів	Уміст глюкози в плазмі крові (натщесерце) > 100 мг/дл чи прийом гіпоглікемічних засобів	Наявність інсулінорезистентності	Наявність інсулінорезистентності (Інсулін плазми > 75-й процентиль)
інші				Альбумін у сечі > 20 мкг/хв чи співвідношення альбумін/креатинін > 30 мг/г	

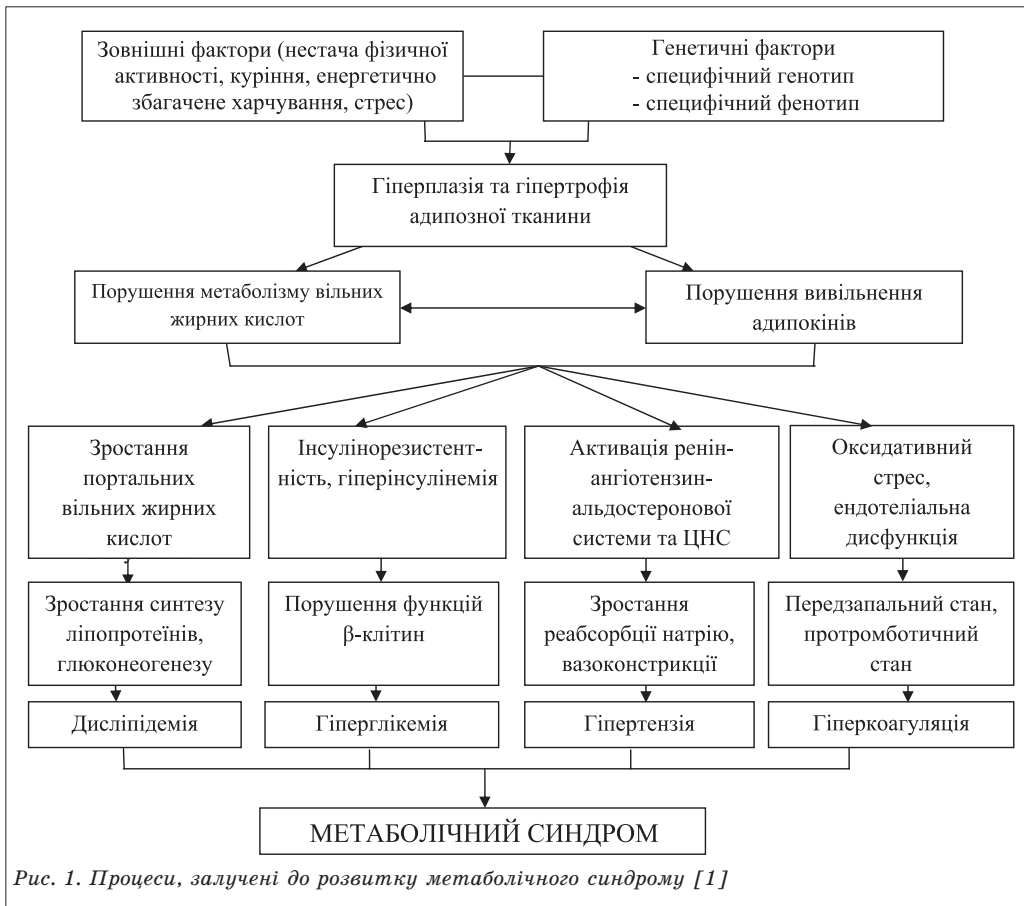


Рис. 1. Процеси, залучені до розвитку метаболічного синдрому [1]

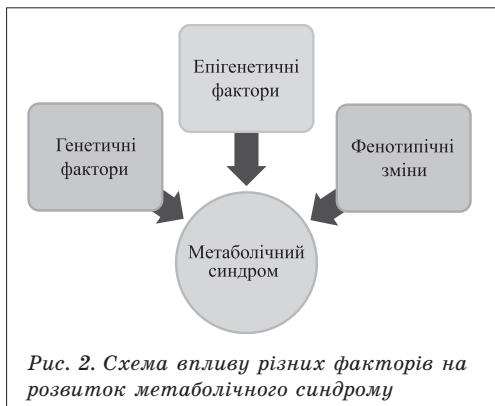
Проте знайти домінуючі гени для полігенних патологій, таких як МС, дуже важко [6]. Сподівання на те, що з'ясування детальних геномів людини, щура та миші дозволить остаточно виявити причини виникнення більшості захворювань виявились марними. Очевидно, що за умов мультисимптомних патологій не так легко знайти одну визначальну причину. Стало зрозумілим, що сумація численних невеликих змін, а не окремі великі зрушення, ймовірно, відіграють суттєву роль у запуску МС. Ці зміни можуть бути пов'язані з паралельними чи послідовними зрушеннями на рівні генів та білків, і тим самим, сприяти розвитку хвороби.

Наукова спільнота прийшла до усвідомлення того факту, що всі фенотипічні зміни в ході розвитку МС не можуть бути пояснені лише змінами в послідовності ДНК. Накопичено багато доказів того, що у певні моменти розвитку організму складні взаємодії між різними

групами генів та різними факторами навколишнього середовища можуть відігравати важливу роль у визначенні ризику індивідуума щодо МС [7].

У таких випадках важливу роль, крім генів, відіграють фактори навколишнього середовища, такі як стрес, зниження фізичної активності (наприклад, загальний життєвий стиль), ендокринні розлади тощо. Помилковою слід вважати концепцію, що лише послідовність ДНК і мутації в цій послідовності є відповідальними за еволюційні зміни та розвиток захворювань. У ході досліджень останніх років стало зрозумілим, що у виникненні та розвитку патологій беруть участь і раніше не встановлені додаткові механізми.

До розвитку МС вочевидь залучені нещодавно виявлені і тому ще серйозно не досліджувані епігенетичні фактори та механізми (рис. 2). Як приклад значення епігенетичних факторів можна навести різні прояви адаптації організму до навколишнього середовища,



особливо, якщо існує епігенетичне трансгенераційне успадкування [8, 9]. Взаємодії ген-ген та ген-навколишнє середовище є важливими процесами ініціювання окремих симптомів МС та їхнього прогресування. Нещодавні дослідження показали, що епігенетичні механізми, включаючи метилювання ДНК, модифікацію та ремоделювання хроматину, регулювання міРНК та різноманітну активність некодованих РНК, можуть призвести до більшості випадків розвитку МС. Проте епігенетичні процеси не лише беруть участь у патогенезі захворювань. Вони також необхідні для нормального росту та розвитку організмів.

Ряд авторів запропонував визначення епігенетичних факторів як молекулярних факторів і процесів, які є мітотично стабільними та регулюють експресію геному незалежно від послідовності ДНК [8, 10]. При цьому не слід забувати, що епігенетичні процеси не тільки беруть участь у патогенезі захворювань, але й також мають важливе значення для нормального росту та розвитку організму.

Було продемонстровано, що введення антисенсової кДНК рецептора ангіотензину II типу за допомогою ретровірусно-опосередкованої системи доставки молодим щурам запобігає розвитку артеріальної гіпертензії в дорослих тварин [11]. Цей захист був переданий у спадок наступним поколінням щурів внаслідок його геномної інтеграції. Іншим прикладом того, що зниження артеріального тиску, спричинене екзогенними маніпуляціями (рання антигіпертензивна терапія щурів каптопри-

лом), може бути успадковане наступним поколінням, є результати досліджень J. Wu та K. Berecek [12].

K. Lindpaintner [13] припустив, що «конформаційні зміни через змінене нейрогуморальне середовище» або «хімічні модифікації, такі як різні схеми метилювання ДНК» можуть бути механізмом реалізації такого успадкування.

Згодом дві британські дослідницькі групи повідомили про те, що гіпертонія, індукована в потомства щурів за допомогою рестрикції материнського протеїну, може бути передана наступним поколінням [14, 15]. Те саме стосується й гіпертонії, викликаной в потомства шляхом обмеження поживних речовин у материнському організмі, яка також передається тваринам F3 покоління [16]. Підвищення кров'яного тиску, що спостерігається в поколіннях F2 або F3, зазвичай виражено в самців, ніж у самиць потомства, і збільшується, коли щурам додають інші стимулятори, такі як раціон з високим вмістом жиру [15]. Основним патофізіологічним механізмом подібних ефектів трансгенераційного програмування може бути ендотеліальна дисфункція [14, 16] унаслідок зменшення утворення NO та посилення продукції супероксиду [16].

Останнім часом нові аспекти епігенетичного трансгенераційного успадкування були досліджені іншими авторами [9, 17]. Це успадкування визначалося ними як «передача зародків епігенетичної інформації між поколіннями за відсутності прямого впливу навколишнього середовища або генетичних маніпуляцій» [9, 18]. Дослідження [19] показали, що стрес у матері або кумулятивний ефект повторюваних стресів впливають на ризик передчасних пологів та погане здоров'я потомства протягом трьох поколінь. Було продемонстровано, що пренатальний стрес здатний програмувати розвиток мозку плода, функціонування гіпоталамо-гіпофізарної вісі та стан психічного здоров'я [20, 21]. Молекулярні механізми стресу в ранньому житті та вплив глюкокортикоїдів можуть передбачати епігенетичні зміни, в основному, шляхом метилювання глюкокортикоїдних рецепторів [22]. Окрім

власне стану стресу, стресорні фактори харчування (наприклад, високий вміст солі, жиру, різних хімічних речовин типу консервантів тощо) також можуть сприяти епігенетичному трансгенераційному успадкуванню та ненормальному розвитку нового організму, а отже й розвитку хвороби [23, 24]. Dunn і Vale встановили, що існує епігенетичний трансгенераційний вплив раціону з високим вмістом жиру, що реалізувався в збільшенні розмірів тіла та зменшенні чутливості до інсуліну в потомства, який зберігався протягом двох поколінь як по лінії матері, так і по лінії батька. Автори висунули гіпотезу, що до цього епігенетичного програмування можуть бути залучені імпринтні гени [25].

Згідно з «гіпотезою програмування», порушення внутрішньоматкового середовища факторами навколишнього середовища позбавляє плід можливості оптимального розвитку, що призводить до виникнення серцево-судинних ускладнень у більш пізньому житті [26–29]. Дослідження щодо конкретних механізмів реалізації таких впливів показали, що епігенетичні зміни були тканинозалежними, а погіршення внутрішньотробного середовища і дієти впливали на метилювання гістонів та експресію лізи-

нових метилтрансфераз у клітинах ендотелію судин і гладких м'язів [30].

Проте така гіпотеза щодо програмування плода все ще виглядає досить суперечливо стосовно причин та механізмів, які лежать в основі хвороби дорослої людини.

Загальна схема передбачає зміни внутрішньоматкового стану матері, що призводить до ремоделювання тканин у плода та порушення фізіологічних функцій (рис. 3). Наприклад, зміни в харчуванні матері (недоїдання або надмірне харчування) призводять до ненормального живлення плода, що прямо чи опосередковано впливає на ріст і дозрівання різних органів [31].

Гіпотеза «економного» фенотипу припускає, що погане харчування людини в ранньому житті призводить до МС та серцево-судинних захворювань [32, 33]. Детальні дослідження показали, що епігенетичні зміни були тканиноспецифічними.

Результати, одержані в дослідях на щурах, добре корелюють з ситуацією в людини [34]. Одним з найцитованих прикладів наслідків недоїдання матерів є дані дослідження так званого «голландського голоду» [35, 36]. В осіб, що народились від матерів, які знаходились

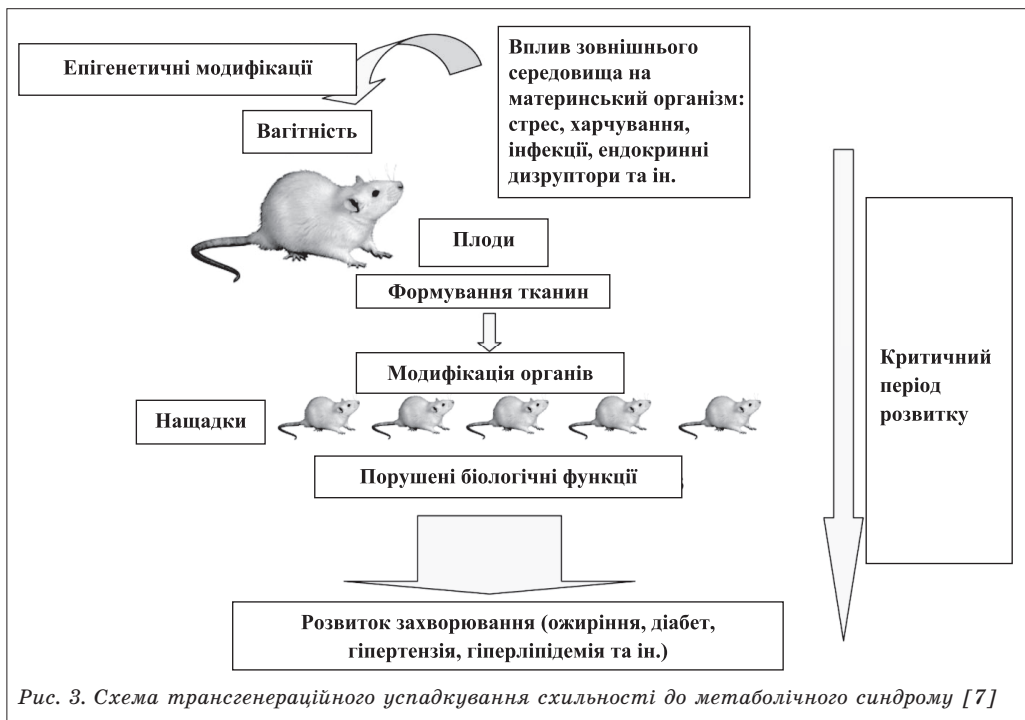


Рис. 3. Схема трансгенераційного успадкування схильності до метаболічного синдрому [7]

під впливом голоду в 1944–1945 роках, були знижені рівні метилювання ДНК імпринтного гена *Igf2* порівняно з їхніми братами-сестрами, народженими за нормальних умов. У цих дітей у подальшому житті було продемонстровано більш високий рівень хронічних соматичних захворювань, таких як ожиріння [37], непереносимість глюкози [38], гіпертензія [39] та інші. Було продемонстровано, що терміни недоїдання в процесі розвитку плода визначають величину порушень метаболічного та серцево-судинного фенотипу дитини.

Інша ситуація виникла за умов застосування моделі надмірного харчування під час вагітності. У щурів материнська дієта з високим вмістом жиру (HFD) підвищує масу тіла та рівень інсуліну плазми, рівень глюкози та тригліцеридів [40]. Крім того, дієта з високим вмістом жиру змінює якість молока, у якому рівень білка, холестерину та тригліцеридів був підвищений [41], так само, як і концентрація лептину [42], що вказує на можливі шляхи впливу на нащадків і виникнення в них ожиріння. Подібні ефекти можна побачити й у досліді на мишах [25, 43]. С. Gallou-Kabani та співавт. [44] годували вагітних мишей раціоном з високим вмістом жиру протягом 2 тижнів з моменту настання вагітності. Вони виявили, що цей режим харчування викликав deregulation імпринтованих генів, серед яких особливо важливим був *Igf2r*. Таким чином, як материнське ожиріння, так і недоїдання здатні зумовлювати розвиток МС у потомства.

Загалом було показано, що взаємодії генів та факторів зовнішнього середовища (наприклад, поживних речовин і генетичного фону) можуть мати суттєвий вплив на розвиток МС. Проте очевидно, що ми тільки на початку розуміння масштабів внеску епігенетики в розвиток захворювань людини, включаючи МС. Нещодавні дослідження показали, що такі епігенетичні механізми, як метилювання ДНК, модифікації та ремодельовання хроматину, регуляція функціонування міРНК і некодуючих РНК, також можуть бути причиною більшості випадків ініціювання розвитку МС [8, 9, 18, 35, 36].

Ця гіпотеза знайшла своє підтвердження й у наших власних дослідженнях [45] щодо впливу МС на процеси фрагментації ДНК та стабільність хроматину в різному віці (рис. 4). В експериментах розвиток МС супроводжувався інтенсифікацією фрагментації нуклерної ДНК. Фрагментація ДНК у гепатоцитах дорослих і пубертатних щурів за умов експериментального МС була значно інтенсивнішою, ніж у контрольних групах. У групі дорослих тварин з МС було виявлено 9 фракцій низькомолекулярних фрагментів ДНК (20–250 п.О.), тоді як у контролі – лише 2. У пубертатних щурів відповідні зміни були ще більшими: 13 фракцій низькомолекулярних фрагментів ДНК у разі МС проти 1 у контролі.

Зміни структури будь-яких внутрішньоклітинних макромолекул (ДНК, РНК,

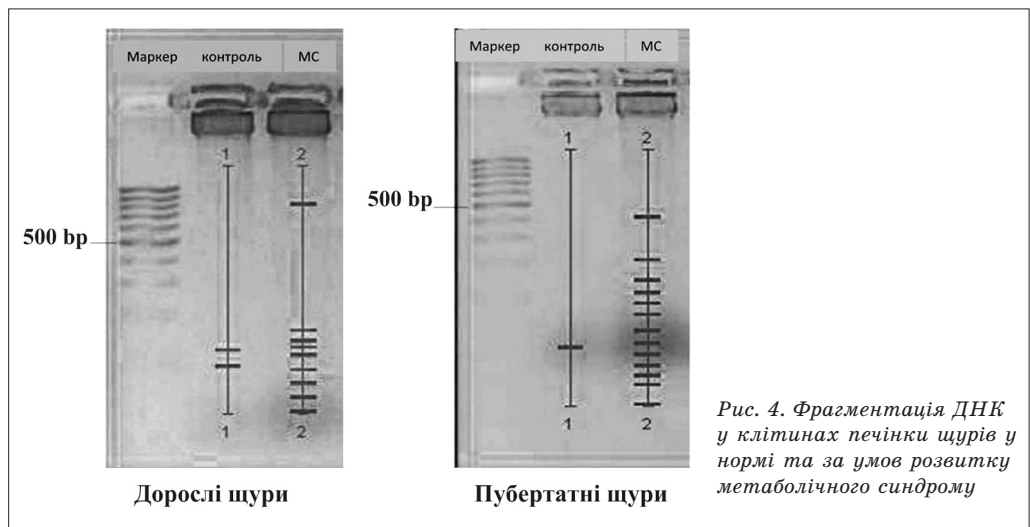


Рис. 4. Фрагментація ДНК у клітинах печінки щурів у нормі та за умов розвитку метаболічного синдрому

білків, ліпідів), опосередковані МС, можуть відігравати ключову роль, викликаючи пошкодження та смерть клітин. Існує чіткий зв'язок між порушеннями структури ДНК і низкою показників, що характеризують розвиток МС [46]. Оскільки швидкість і характер розвитку фрагментації ДНК є одним з маркерів розвитку апоптозу клітин [47], такі дані можуть вказувати на стимуляцію апоптотичних процесів у пубертатних і дорослих щурів з МС.

Це припущення підтверджується нашими даними щодо наявності клітин з псевдо Пельгер-Х'юїтт синдромом (ППХС) у мазках крові пубертатних і дорослих щурів з МС [45], оскільки такі порушення структури хроматину пов'язані зі стимуляцією апоптотичних процесів [48]. Мікроскопічне дослідження мазків крові дозволило засвідчити розвиток ППХС у щурів з МС. У дорослих щурів з МС ППХС клітини становили до $(25,08 \pm 0,85)$ % від загальної кількості нейтрофілів, тоді як у пубертатних тварин з МС їхня кількість була $(3,67 \pm 0,45)$ % від загальної кількості нейтрофілів (рис. 5). У дорослих щурів контрольної групи ППХС клітини становили до $(0,25 \pm 0,11)$ % від загальної кількості нейтрофілів, тоді як у пубертатних тварин вони взагалі були відсутні.

Присутність ППХС у крові дорослих і пубертатних щурів з МС вказує на можливі серйозні опосередковані МС зміни структури та функції хроматину ядра [48], раніше зареєстровані також у хворих на цукровий діабет [49]. Дані дослідження

добре узгоджуються з результатами інших авторів щодо змін гематологічних показників у людини з МС [50, 51].

Висновки

Зростаюча глобальна проблема МС вимагає пошуку нових стратегій для виявлення осіб та груп населення, які найбільше ризикують. Навіть після декількох десятиліть інтенсивних досліджень етіологія окремих симптомів МС усе ще є недостатньо добре відомою. Проблема полягає ще й у тому, щоб вказати єдиний універсальний патофізіологічний маркер для всіх симптомів МС, який може бути використаний для швидкого діагностування. Основним ускладненням є та обставина, що всі ці симптоми є полігенними ознаками з мультифакторною етіологією, що включає взаємодії генів, ген-середовище та епігенетичні фактори. Знання молекулярних механізмів, за допомогою яких ранні дрібні стимули з оточуючого середовища модифікують експресію генетичної інформації, можуть бути ключовими для розуміння змін фенотипу в дорослому віці. Ці зміни можуть бути пов'язані з модифікаціями на рівні генів, білків тощо, і таким чином сприяти розвитку захворювання. Останнім часом було чітко визнано, що епігенетичні впливи є дуже важливими у формуванні фенотипів і що ці ефекти можуть бути за певних умов передані наступним поколінням через трансформацію в тому випадку, коли зовнішні фактори сприяють постійним змінам епігеному гамет.

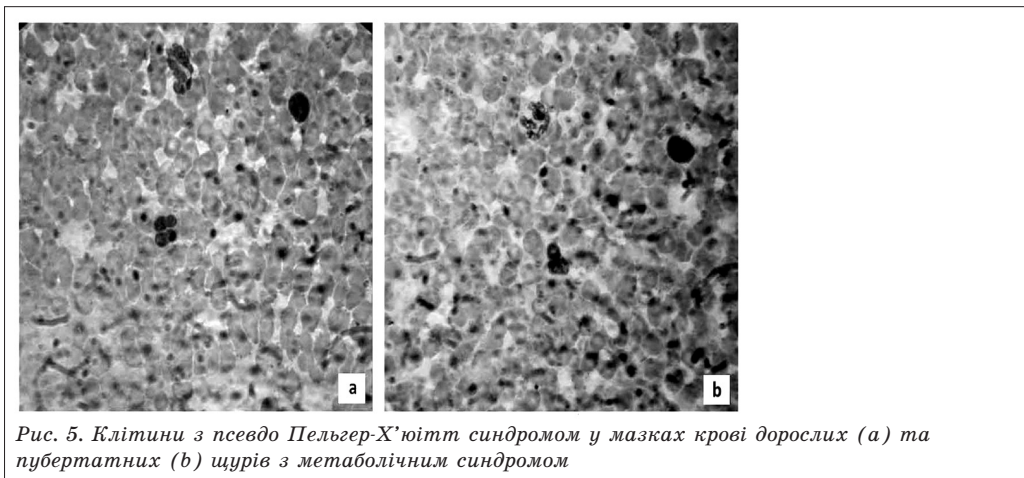


Рис. 5. Клітини з псевдо Пельгер-Х'юїтт синдромом у мазках крові дорослих (а) та пубертатних (б) щурів з метаболічним синдромом

1. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: a panel for early detection, management, and risk stratification in the west virginian population / K. Srikanthan, A. Feyh, Y. Visweshwar [et al.] // International Journal of Medical Sciences. – 2016. – V. 13, № 1. – P. 25–38. doi: 10.7150/ijms.13800
2. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity / K. G. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy [et al.] // Circulation. – 2009. – V. 120, № 16. – P. 1640–1645. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
3. American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition / S. M. Grundy, H. B. Jr. Brewer, J. I. Cleeman [et al.] // Circulation. – 2004. – V. 109. – P. 433–438.
4. Metabolic syndrome is associated with increased breast cancer risk: a systematic review with meta-analysis / R. Bhandari, G. A. Kelley, T. A. Hartley, I. R. Rockett // International journal of breast cancer. – 2014. – V. 2014. – P. 189–384.
5. Altshuler D. Genetic mapping in human disease / D. Altshuler, M. J. Daly, E. S. // Science. – 2008. – V. 322. – P. 881–888.
6. Glazier A. M. Finding genes that underlie complex traits / A. M. Glazier, J. H. Nadeau, T. J. Aitman // Science. – V. 298. – P. 2345–2349.
7. Kuneš J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension / J. Kuneš, J. Zicha // Physiol Res. – 2009. – V. 58 (Suppl 2). – P. S33–S41.
8. Skinner M. K. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology / M. K. Skinner, M. Manikkam, C. Guerrero-Bosagna // Trends Endocrinol Metab. – 2010. – V. 21. – P. 214–222.
9. Skinner M. K. Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance / M. K. Skinner // BMC Med. – 2014. – V. 12. – P. 153.
10. Ordovas J. M. Epigenetics and cardiovascular disease / J. M. Ordovas, C. E. Smith // Nat Rev Cardiol. – 2010. – V. 7. – P. 510–519.
11. Permanent cardiovascular protection from hypertension by the AT1 receptor antisense gene therapy in hypertensive rat offspring / P. Y. Reaves, C. H. Gelband, H. Wang [et al.] // Circ Res. – 1999. – V. 85. – P. e44–e50.
12. Wu J. N. Prevention of genetic hypertension by early treatment of spontaneously hypertensive rats with the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril / J. N. Wu, K. H. Berecek // Hypertension. – 1993. – V. 22. – P. 139–146.
13. Lindpaintner K. Blood pressure and heredity. Is it all in the genes, or not? / K. Lindpaintner // Hypertension. – 1993. – V. 22. – P. 147–149.
14. Torrens C. Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation / C. Torrens, L. Poston, M. A. Hanson // Br J. Nutr. – 2008. – V. 100. – P. 760–766.
15. Harrison M. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy / M. Harrison, S. C. Langley-Evans // Br J. Nutr. – 2009. – V. 101. – P. 1020–1030.
16. Implications of maternal nutrient restriction in transgenerational programming of hypertension and endothelial dysfunction across F1–F3 offspring? / B. F. Ponzio, M. H. Carvalho, Z. B. Fortes [et al.] // Life Sci. – 2012. – V. 90. – P. 571–577.
17. Nilsson E. E. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility / E. E. Nilsson, M. K. Skinner // Transl Res. – 2015. – V. 165. – P. 12–17.
18. Skinner M. K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability / M. K. Skinner // Epigenetics. – 2011. – V. 6. – P. 838–842.
19. Yao B. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis / B. Yao, P. Jin // Genes Dev. – 2014. – V. 28. – P. 1253–1271.
20. Cottrell E. C. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease / E. C. Cottrell, J. R. Seckl // Front Behav Neurosci. – 2009. – V. 3. – P. 19.
21. Early determinants of mental health / K. Raikkonen, A. K. Pesonen, T. J. Roseboom [et al.] // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2012. – V. 26. – P. 599–611.
22. Self-reported depression and anxiety after prenatal famine exposure: mediation by cardio-metabolic pathology? // S. R. De Rooij, R. C. Painter, D. I. Phillips [et al.] // J. Dev Orig Health Dis. – 2011. – V. 2. – P. 136–143.
23. Dunn G. A. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage / G. A. Dunn, T. L. Bale // Endocrinology. – 2011. – V. 152. – P. 2228–2236.
24. Waterland R. A. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers / R. A. Waterland // Annu Rev Nutr. – 2014. – V. 34. – P. 337–355.
25. Dunn G. A. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice / G. A. Dunn, T. L. Bale // Endocrinology. – 2009. – V. 150. – P. 4999–5009.
26. Barker D. J. Low birth weight and hypertension / G. A. Dunn, T. L. Bale // BMJ. – 1988. – V. 297. – P. 134–135.
27. Huxley R. R. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature / R. R. Huxley, A. W. Shiell, C. M. Law // J. Hypertens. – 2000. – V. 18. – P. 815–831.

28. De Boo H. A. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis / H. A. De Boo, J. E. Harding // Aust NZ J. Obstet Gynaecol. – 2006. – V. 46. – P. 4–14.
29. Eriksson J. G. Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies / J. G. Eriksson // Int J. Obes (Lond). – 2006. – V. 30. – P. 18–22.
30. Prenatal exposure to apoE deficiency and postnatal hypercholesterolemia are associated with altered cell-specific lysine methyltransferase and histone methylation patterns in the vasculature / F. E. Alkemade, P. Van Vliet, P. Henneman [et al.] // Am J. Pathol. – 2010. – V. 176. – P. 542–548.
31. Kuneš J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension / J. Kuneš, J. Zicha // Physiol Res. – 2009. – V. 58 (Suppl 2). – P. S33–S41.
32. Brons The thrifty phenotype hypothesis revisited / A. A. Vaag, L. G. Grunnet, G. P. Arora, C. // Diabetologia. – 2012. – V. 55. – P. 2085–2088.
33. Hales C. N. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis / C. N. Hales, D. J. Barker // Int J. Epidemiol. – 2013. – V. 42. – P. 1215–1222.
34. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero / C. Bertram, A. R. Trowern, N. Copin [et al.] // Endocrinology. – 2001. – V. 142. – P. 2841–2853.
35. DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism / E. W. Tobi, J. J. Goeman, R. Monajemi [et al.] // Nat Commun. – 2014. – V. 5. – P. 5592.
36. Prenatal famine and genetic variation are independently and additively associated with DNA methylation at regulatory loci within IGF2/H19 / E. W. Tobi, P. E. Slagboom, J. Van Dongen [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. e37933
37. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally / A. C. Ravelli, J. H. Van der Meulen, C. Osmond [et al.] // Am J Clin Nutr. – 1999. – V. 70. – P. 811–816.
38. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine / A. C. Ravelli, J. H. Van der Meulen, C. Osmond [et al.] // Lancet. – 1998. – V. 351. – P. 173–177.
39. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine / T. J. Roseboom, J. H. Van der Meulen, A. C. Ravelli [et al.] // J. Hypertens. – 1999. – V. 17. – P. 325–330.
40. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood / M. Srinivasan, S. D. Katewa, A. Palaniyappan [et al.] // Am J. Physiol Endocrinol Metab. – 2006. – V. 291. – P. E792–E799.
41. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning / J. G. Franco, T. P. Fernandes, C. P. Rocha [et al.] // J. Physiol. – 2012. – V. 590. – P. 5503–5518.
42. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity / B. Sun, R. H. Purcell, C. E. Terrillion [et al.] // Diabetes. – 2012. – V. 61. – P. 2833–2841.
43. Maternal high-fat feeding during pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver / N. G. Ashino, K. N. Saito, F. D. Souza [et al.] // J. Nutr Biochem. – 2012. – V. 23. – P. 341–348.
44. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet / C. Gallou-Kabani, A. Gabory, J. Tost [et al.] // PLoS One. – 2010. – V. 5. – P. 14398.
45. Specificity of metabolic syndrome model reproduction at pubertal and adult male rats / L. Bondarenko, T. Karatzuba, G. Shayakhmetova [et al.] // Rom J. Diabetes Nutr Metab Dis. – 2015. – № 22, V. 3. – P. 251–260.
46. Erol A. Systemic DNA damage response and metabolic syndrome as a premalignant state / A. Erol // Curr Mol Med. – 2010. – V. 10. – P. 321–334.
47. Wang X. Induction of cytochrome P450 2E1 increases hepatotoxicity caused by Fas agonistic Jo2 antibody in mice / X. Wang, Y. Lu, A. I. Cederbaum // Hepatology. – 2005. – V. 42. – P. 400–410.
48. Historical perspectives and clinical implications of the Pelger-Huet cell / J. M. Cunningham, M. M. Patnaik, D. E. Hammerschmidt, G. M. Vercellotti // Am Journal Hematol. – 2009. – V. 84. – P. 116–119.
49. Gingold N. Another family with the “Pelger-Huet” anomaly associated with familial diabetes. Study including 4 generations. (Preliminary note) / N. Gingold, T. Papahagi, J. Gottlieb // Stud Cernet Med Interna. – 1965. – V. 40. – P. 287–293.
50. The effects of a high-fat and high-energy diet on the hepatic expression of CYP3A in developing female rats / S. Ni, X. Wang, J. Wang [et al.] // Xenobiotica. – 2012. – V. 42. – P. 587–595
51. Bulava S. V. Hemorheological profile with metabolic disorders / S. V. Bulava, A. V. Zamyshlyayev // Yaroslavl Pedagogical Bulletin. – 2012. – V. 4. – P. 161–164.

Л. Б. Бондаренко

Метаболічний синдром: епігенетичні фактори

Огляд літератури узагальнює інформацію щодо критеріїв діагностики та факторів, що зумовлюють розвиток метаболічного синдрому (МС). Зростаюча глобальна проблема МС вимагає пошуку нових стратегій для виявлення осіб та груп населення, які найбільше ризикують. Навіть після декількох десятиліть інтенсивних досліджень етіологія окремих симптомів МС усе ще недостатньо добре

відома. Проблема полягає ще й у тому, щоб вказати єдиний універсальний патофізіологічний маркер для всіх симптомів МС, який може бути використаний для швидкої діагностики. Основним ускладненням є та обставина, що всі ці симптоми є полігенними ознаками з мультифакторною етіологією, що включає взаємодії генів, ген-середовище та епігенетичні фактори. Знання молекулярних механізмів, за допомогою яких ранні дрібні стимули з оточуючого середовища модифікують експресію генетичної інформації, можуть бути ключовими для розуміння змін фенотипу в дорослому віці. Ці зміни можуть бути пов'язані з модифікаціями на рівні генів, білків тощо й таким чином сприяти розвитку захворювання. Останнім часом було чітко визнано, що епігенетичні впливи є дуже важливими у формуванні фенотипів і що ці ефекти можуть бути за певних умов передані наступним поколінням через трансформацію в тому випадку, коли зовнішні фактори сприяють постійним змінам епігеному гамет. Наведено результати власних досліджень низки показників щодо впливу епігенетичних факторів на розвиток МС у різному віці.

Ключові слова: метаболічний синдром, епігенетичні фактори, ДНК-фрагментація, псевдо Пельгер-Х'юїтт синдром

Л. Б. Бондаренко

Метаболический синдром: эпигенетические факторы

Обзор литературы обобщает информацию о критериях диагностики и факторах, которые обуславливают развитие метаболического синдрома (МС). Растущая глобальная проблема МС требует поиска новых стратегий для выявления лиц и групп населения, которые больше всего подвержены риску. Даже после нескольких десятилетий интенсивных исследований этиология отдельных симптомов МС все еще недостаточно хорошо известна. Проблема заключается еще и в том, чтобы указать единственный универсальный патофизиологический маркер для всех симптомов МС, который может быть использован для быстрой диагностики. Основным осложнением является то обстоятельство, что все эти симптомы являются полигенными признаками с мультифакторной этиологией, включающей взаимодействия самих генов, ген-среду и эпигенетические факторы. Знание молекулярных механизмов, с помощью которых ранние мелкие стимулы из окружающей среды модифицируют экспрессию генетической информации, может быть ключевым для понимания изменений фенотипа во взрослом возрасте. Эти изменения, возможно, связаны с модификациями на уровне генов, белков и т. д., и таким образом способствуют развитию заболевания. В последнее время было четко признано, что эпигенетические влияния очень важны в формировании фенотипов, и эти эффекты могут быть при определенных условиях переданы следующим поколениям через трансформацию в том случае, когда внешние факторы способствуют постоянным изменениям эпигенома гамет. Приведены результаты собственных исследований ряда показателей, характеризующих воздействия эпигенетических факторов на развитие МС в разном возрасте.

Ключевые слова: метаболічний синдром, епігенетические факторы, ДНК-фрагментация, псевдо Пельгера-Хьюитт синдром

L. B. Bondarenko

Metabolic syndrome: epigenetic factors

The review summarizes information on diagnostic criteria and factors causing the development of metabolic syndrome (MS). The growing global problem of MS requires the search for new strategies to identify individuals and groups most at risk. Even after several decades of intense studies, the etiology of individual symptoms of MS is still not well clear. The problem is also to establish a single unique pathophysiological marker for all MS symptoms that can be used for rapid diagnosis. The main complication is that all these symptoms are polygenic with multifactorial etiology, which includes gene-gene and gene-environment interactions, as soon as epigenetic factors. Knowledge of molecular mechanisms by which early small stimuli from the environment modify the genetic information expression could be the key to understanding the mechanisms that lead to phenotype changes in adulthood. These changes may be related to modifications at the level of genes, proteins, etc., and thus contribute to the development of the disease. Recently, it has been clearly recognized that epigenetic influences are very important for phenotypes formation and that these effects can be inherited by subsequent generations through transformations in case of constant external press on gametes epigenome. There are presented the results of own studies of some indices characterizing the epigenetic factors influence on the MS development at different age groups.

Key words: metabolic syndrome, epigenetic factors, DNA fragmentation, pseudo Pelger-Hewitt syndrome

Надійшла: 23 червня 2017 р.

Контактна особа: Бондаренко Лариса Борисівна, доктор біологічних наук, відділ токсикології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03057.
Тел.: + 38 0 44 457 78 65. Електронна пошта: larabon04@yahoo.com

В. О. Шляховенко, О. А. Орловський,
О. А. Самойленко, А. В. Вербиненко

Рибонуклеази – можливий новий напрям у розробці методів лікування пухлин

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р. Є. Кавецького Національної академії наук України, м. Київ*

*Ключові слова: рибонуклеази, апоптоз,
протипухлинна активність*

Рибонуклеази (РНКази) – велика група гідролітичних ферментів, що розщеплюють різні види РНК з утворенням як окремих нуклеотидів (у разі дії екзо-РНКаз), так і фрагментів різного розміру (за дії ендо-РНКаз), які можуть виявляти біологічний вплив на процеси розвитку, проліферації, дозрівання та загибелі клітин. РНКази виявляють багатосторонню біологічну дію, що реалізується як на рівні процесів транскрипції, так і трансляції. У цьому разі частина інформаційних молекул (мРНК) може бути значно модифікована або повністю знищена. Під час транскрипції утворюються великі молекули-попередники (про-РНК), які внаслідок сплайсингу та процесингу за участю РНКаз формуються у вигляді зрілих інформаційних, транспортних чи рибосомних РНК.

Рибонуклеази виявляють цитотоксичну дію в зв'язку з руйнуванням окремих видів РНК і як наслідок – блокуванням синтезу білка.

Серед ендорибонуклеаз вирізняють: РНКазуА, РНКазуР, РНКазуН, РНКазуШ, РНКазуТ1, РНКазуТ2, РНКазуU2, РНКазуV1, РНКазу1, РНКазу РнУМ та РНКазуV. Екзорибонуклеази представлені олігорибонуклеотидфосфорилазою (PNPase), РНКазою РН, РНКазоюII, РНКазоюR, РНКазоюТ, олігорибонуклеазою, екзорибонуклеазою I та екзорибонуклеазою II. Ці ферменти розщеплюють різні послідовності в молекулах РНК. Останнім часом дослідники звернули увагу на РНКази як на можливі засоби спрямованого керування експресією генів і можливого лікування раку. Ідея використання РНКаз

для лікування раку полягає в можливості пошкодження злоякісних клітин без впливу на навколишні здорові тканини [1]. Цитотоксична дія РНКаз ґрунтується на руйнуванні внутрішньоклітинних РНК, що веде до апоптозу [2]. Цитотоксична дія РНКаз проявляється і при зовнішньому впливі на клітини, але цитотоксичність зростає приблизно в 1000 разів, коли фермент штучно вводиться в цитозоль, що свідчить про важливість етапу інтерналізації для прояву цитотоксичності ферменту [3].

Було показано, що зміни поліморфізму гена РНКази L (RNASEL) у послідовностях Arg462Gln та Asp541Gln асоціюються з ризиком раку простати і можуть бути віднесені до біомаркерів цього раку [4, 5]. Результати цих досліджень свідчать про те, що мутації в RNASEL збільшують ризик захворювання на рак простати в чоловіків, а в деяких випадках сприяють більш агресивному його перебігу навіть у молодих осіб.

Для з'ясування можливої ролі РНКази2 в апоптозі ракових клітин Malathi з співавторами знизили рівень РНКази L у клітинах простати DU145 у декілька разів за допомогою малих інтерферуючих РНК (siRNA). Такі клітини виявились резистентними до апоптозу, індукованого 2'-5'-олігоденілатом (2'-5'A). Цікаво, що клітини, дефіцитні за РНКазою L, виявились також резистентними до інгібітора топоізомерази I топотокану та індуктора інтерферону TRAIL (Apo2L).

Asquati та ін. [6] показали, що екстрацелюлярна РНКаза бере участь у контролі туморогенезу яєчника. Вони встановили, що втрата функції РНКази T2, давнього та філогенетично консервованого

ферменту, відіграє ключову роль у туморогенезі яєчника [7, 8].

Дослідження механізму противірусної дії інтерферону та роботи з генетики раку простати зійшлися на одному ферменті, специфічному до одониткових послідовностей РНК – рибонуклеазі, що регулюється системою 2'-5'A, яка забезпечує вроджений імунітет проти вірусних інфекцій. 2'-5'A активує латентну РНКазу L, що становиться активною в разі приєднання 2'-5'A. РНКазу L також бере участь у процесі апоптозу у відповідь на дію вірусних та невірусних індукторів [9]. Активація РНКазу L 2'-5' – олігоаденілатом призводить до специфічного розщеплення 18S рибосомної РНК, наслідком чого є розвиток апоптозу. Апоптоз у відповідь на дію РНКазу L супроводжується вивільненням цитохрому C з мітохондрій. Ці дані свідчать також про доцільність можливого застосування 2'-5'A для підсилення протипухлинного впливу інтерферону [10].

Вищезгадані дані стали основою для багатьох спроб використати РНКазу для терапії раку. Сьогодні показано, що РНКазу, ізольовані з різних джерел, виявляють протипухлинну активність. У деяких випадках дослідження дійшли до клінічних випробувань. Однією з перших була випробувана РНКазу зі сперми та тестикул великої рогатої худоби (BS-РНКазу). BS-РНКазу виявила протипухлинну, антисперматогенну та імуносупресивну активність. Ця РНКазу є гомологом панкреатичної РНКазу А, що належить до групи ферментів з особливими біологічними властивостями RISBASEL (Ribonucleases with Special Biological Actions), до якої також входять ангіогенін, селективні нейротоксичні РНКазу, лектини та фактор міжвидової несумісності квіткових рослин [11]. Виділений фермент був гомогенним за багатьма критеріями чистоти, але виявляв три субфракції за умов його обмінної хроматографії на карбоксиметилцелюлозі. Ця гетерогенність пов'язана з співвідношенням субодиниць у молекулі ферменту. На відміну від РНКазу А, BS-РНКазу виявляє значну токсичність щодо злоякісних клітин

людини. Особливо чутливими до дії ферменту виявились клітини злоякісної мезотеліоми [12].

Іншим ферментом, що виявив цитотоксичну дію до пухлинних клітин, виявилась РНКазу, ізольована з тканин леопардової жаби *Rana pipiens*. Фермент одержав назву Onconase (Ranpirnase). У попередніх лабораторних, а пізніше в клінічних дослідженнях було показано, що фермент вибірково впливає на клітини злоякісних пухлин, не пошкоджуючи нормальних, близьких за походженням і структурою клітин. Фермент запускає апоптоз кількома сигнальними шляхами [13]. Протипухлинна дія ферменту була продемонстрована на декількох пухлинних моделях [14, 15]. У I фазі клінічних випробувань було показано, що максимально толерантною дозою для ранпірнази є 960 г/м², а головним дозолімітуючим показником є ниркова токсичність.

У великих дослідженнях II фази було встановлено, що ранпірназа впливає на ріст злоякісної мезотеліоми. У 2006 році об'єднання Alfacell (США) опублікувало проміжні дані III фази клінічних випробувань Онконази в поєднанні з доксорубіцином. У дослідженнях, що охоплювали 316 пацієнтів з мезотеліомою, було показано зростання середньої тривалості життя до 12 місяців порівняно з одним доксорубіцином (10 міс.). У дослідженнях також було показано, що цитотоксичність ферменту залежить від руйнування РНК. Одночасно була показана антивірусна активність ферменту проти вірусу папіломатозу людини (HPV), який, як відомо, пов'язаний з виникненням генітального та анального раку.

Дві РНКазу одержані з мікроскопічних грибів. РНКазу T1 (RNaseT1) (ЕС3.1.27.3) розрізає одониткові РНК по гуанілових залишках на 3'-кінцях. Фермент є малим білком з двома субодиницями $\alpha + \beta$, які складаються з 104 амінокислот. Третинна структура його фіксується двома дисульфідними зв'язками Cys2-Cys10 та Cys6-Cys103 [16], а відновлення цих зв'язків веде до розгортання (unfolding) молекули з втратою фер-

ментної активності [17]. Фермент секретується грибами з роду *Aspergillus* та *Penicillium*. Ця РНКаза розщеплює консервативні великі одониткові послідовності рРНК, відомі як сарцин-рицинова петля. Це розщеплення призводить до інгібування білкового синтезу з наступною загибеллю клітин шляхом апоптозу. Оскільки жодних рецепторів до ферменту не описано, вважається, що вони призводять до загибелі клітин внаслідок пошкодження мембрани.

Фермент сам по собі не є цитотоксичним через нездатність інтерналізуватися у пухлинні клітини. У зв'язку з цим Shunji Yuki з співавт. [18] інтерналізували РНКазу T1 у пухлинні клітини людини, застосувавши новий засіб переносу – гемаглютинуючий вірусний вектор (HVJ), застосування якого призвело до загибелі пухлинних клітин. Ця цитотоксичність різко зростала, якщо HVJ попередньо обробляли протамінсульфатом, причому цитотоксичність виявилася більшою, ніж у Онконази, яка знаходиться на III фазі клінічних випробувань як немутагенний протипухлинний засіб. На жаль, дія ферменту виявилася неспецифічною для пухлинних клітин, і тому дотепер фермент не вважається перспективним для створення протипухлинних ліків [16, 19].

Останнім часом увагу дослідників привертає фермент Актибінд (Actibind, РНКаза T2). Цей білок продукується чорною пліснявою *Aspergillus niger* – мікроорганізмом, що використовується в біотехнологіях і харчовій промисловості [20]. У рослин Актибінд зв'язує актин, внаслідок чого блокується ріст трубочок пилку, чим блокується клітинний ріст. Показано, що Актибінд пригнічує ріст злоякісних клітин у савців. РНКаза T2 також зв'язує актин у клітинах людини та тварин, які мігрують, зокрема клітин, пов'язаних з утворенням нових судин у пухлинах (ангіогенез), а також злоякісних клітин, що мігрують у кров'яне русло, утворюючи метастази [20]. Таким чином, Актибінд з грибів та його аналог РНКази T2 у людини можуть представляти інтерес для створення нового класу ліків для боротьби з раком.

α -сарцин (мітоглілн, рестриктоцин) – невеликий рибосом-інактивуючий білок величиною 17 кДа, що продукується грибами роду *Aspergilli*, і здатен каталітично інактивувати велику рибосомну субодиницю.

Усі три вищезгадані грибні риботоксини діють як специфічні РНКази, гідролізуючи один фосфодієфірний зв'язок у домені 23-28S рРНК, і знаходяться серед найпотужніших інгібіторів білкового синтезу. Молекулярні дослідження риботоксинів зі застосуванням методів ПЛР показали, що певні домени риботоксинів мають гомологічні послідовності з білками рибосом, що може бути причиною їхньої прицільної дії на рибосоми. У зв'язку з цим розглядається можливість використання риботоксинів як інструментів для досліджень, а також їхнє використання з діагностичною та терапевтичною метою [21].

α -сарцин – циклізуюча РНКаза, в якій His50, Glu96 та His137 утворюють каталітичний центр молекул. Гідроліз 3'-5' фосфодієфірного зв'язку в молекулах РНК призводить до утворення 2'-3' циклічних мононуклеотидів з наступними перетвореннями їх на відповідний 3'-монофосфат, як кінцевий продукт реакції. У цьому разі розщеплюється 28S-рРНК і блокується білковий синтез. Крім того, α -сарцин взаємодіє з ліпідним бішаром мембран, що призводить до їхнього злиття та витікання внутрішньоклітинного вмісту. Відомо, що кожен токсин, що призводить до інгібування білкового синтезу, індукує апоптоз [22, 23].

Випробовувались також РНКази з вищих грибів. Одна з РНКаз виділена з гриба *Pleurotus sajor-caju*. Вона виявила антипроліферативну дію на клітини гепатоми та лейкозу, а також антимиотичну дію на клітини селезінки мишей [39]. Останнім часом чинники, що інактивують синтез білка, виділені з кількох видів грибів *Calvatia caelata*, *F. velutipes*, *H. marmoreus*, *Lyophyllum shimeiji*, *Pleurotus tuber* та ін. [24, 25].

На особливу увагу заслуговують дослідження РНКази Р. РНКаза Р – унікальний фермент, оскільки він представляє собою рибозим, тобто особливої

структури молекулу РНК, що діє в такий самий спосіб, як фермент білкової природи. Його особливістю є здатність гідролізувати певні послідовності в молекулах РНК. Каталітичною субодиницею РНКаз Р є так звана РНК М1. Ця субодиниця каталізує гідролітичне видалення 5'-лідерної послідовності в молекулі тРНК. Вивчення цього механізму призвело до розробки стратегії «генного націлювання» М1 РНК [26]. М1 РНК може бути націлена на мРНК просто шляхом приєднання так званої керуючої послідовності (guide sequence) на своєму 3'-кінці. Розщеплення мРНК перешкоджатиме утворенню (fusion) білків, специфічних для злоякісних клітин. Перспективність цього напрямку була продемонстрована на моделі онкогена BCR-ABL [26]. Онкоген BCR-ABL утворюється за транслокації послідовностей від гена ABL на 9 хромосомі до гена BCR на хромосомі 22 [27]. Два таких онкогена утворюють дві «злиті» послідовності відповідно до BCR-ABL p190 та BCR-ABL p210. Обидві вони мають ідентичні ABL-послідовності, але відрізняються за числом нуклеотидів у BCR. Утворені онкогени є причиною утворення специфічного білка та виникнення відповідно мієлоїдного лейкозу та гострого лімфобластного лейкозу [28].

Онкоген BCR-ABL інгібує апоптоз за шляхом Bcl-2 і є частиною онкогенного фенотипу. Тому пригнічення експресії BCR-ABL шляхом гідролізу відповідної «зливої» РНК буде відновлювати природний фенотип і спрямовувати клітини до апоптозу. Сконструйована таким чином послідовність VIGS виявилася націленою тільки на «злиту» послідовність мРНК і була здатна блокувати проліферацію лейкозних клітин [26].

Наведені дані показують, що РНКазі можуть бути різними за будовою та походженням і виявляти різну біологічну дію. Особливий інтерес представляють РНКазі, що виявляють

протиухлинну дію відносно пухлинних і лейкозних клітин. Приклади протиухлинної дії РНКаз з різних джерел, таких як фермент із сім'яників великої рогатої худоби або зародкового матеріалу жаби, свідчать про можливість пошуку нових РНКаз як перспективних протиухлинних засобів. У цьому сенсі ферменти рослинного походження представляють величезні можливості для пошуків, перші роботи в цьому напрямі свідчать про те, що РНКазі з рослинного матеріалу можуть виявляти протиухлинну дію [29–31]. У той самий час одна рослина може бути джерелом кількох різних РНКаз. Наприклад, у роботі Y. Yen, P. J. Green у *Arabidopsis thaliana* виявлено 15 різних РНКаз [32].

Висновки

З викладеного вище можна передбачити проведення досліджень протиухлинної дії РНКаз у кількох напрямках:

- пошук нових джерел РНКаз з протиухлинною активністю. Важливими об'єктами пошуку можуть бути мікроорганізми, рослини та гриби;
- дослідження нових індукторів продукування РНКаз у пухлинах та нормальних тканинах. Відомо, наприклад, що активація латентного ферменту – РНКазі L (RNaseL) під впливом інтерферону, яка реалізується через 2'-5'-олігоаденілат, призводить до протиухлинного ефекту;
- хімічна модифікація відомих рибонуклеаз з метою покращання їхньої інтерналізації та резистентності до інгібіторів;
- створення нових рибозимів, або рибозимоподібних ферментів, націлених на знищення продуктів онкогенів;
- перспективним може виявитись також комбінування РНКаз з існуючими протиухлинними засобами.

Розвиток цих досліджень може стати передумовою для створення нових перспективних підходів у терапії злоякісних новоутворень.

1. Benito A. On the track of antitumour ribonucleases / A. Benito, M. Ribo, M. Vilanova // Molecular BioSystems. – 2005. – V. 1, № 4. – P. 294–302.
2. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis / M. S. Iordanov, O. P. Ryabinina, J. Wong [et al.] // Cancer Research. – 2000. – V. 60, № 7. – P. 1983–1994.

3. Mechanism of ribonuclease cytotoxicity / J. Kim, J. Soucek, J. Matousek, R. T. Raines // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270, № 52. – P. 31097–31102.
4. Arg462Gln and asp541glu polymorphisms in ribonuclease I and prostate cancer risk: a meta-analysis / Y. Mi, Q. Yu, Z. Min [et al.] // *Journal of biomedical research*. – 2010. – V. 24, № 5. – P. 365–373.
5. Effects of rnae I mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2', 5'-oligoadenylates / Y. Xiang, Z. Wang, J. Murakami [et al.] // *Cancer research*. – 2003. – V. 63, № 20. – P. 6795–6801.
6. Loss of function of ribonuclease t2, an ancient and phylogenetically conserved rnae, plays a crucial role in ovarian tumorigenesis / F. Acquati, M. Lualdi, S. Bertilaccio[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V. 110, № 20. – P. 8140–8145.
7. *Silverman R. H.* Implications for rnae I in prostate cancer biology / R. H. Silverman // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42, № 7. – P. 1805–1812.
8. Prevention of human prostate tumor metastasis in athymic mice by antisense targeting of human angiogenin / K. A. Olson, H. R. Byers, M. E. Key, J. W. Fett // *Clinical cancer research*. – 2001. – V. 7, № 11. – P. 3598–3605.
9. Hpc1/rnaeI mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2', 5'-oligoadenylates, topoisomerase inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand / K. Malathi, J. M. Paranjape, R. Ganapathi, R. H. Silverman // *Cancer research*. – 2004. – V. 64, № 24. – P. 9144–9151.
10. *Rusch L.* Caspase-dependent apoptosis by 2, 5 -oligoadenylate activation of rnae I is enhanced by ifn-beta / L. Rusch, A. Zhou, R. H. Silverman // *Journal of Interferon and Cytokine Research*. – 2000. – V. 20, № 12. – P. 1091–1100.
11. Seminal rnae: a unique member of the ribonuclease superfamily / G. D'Alessio, A. Di Donato, A. Parente, R. Piccoli // *Trends in biochemical sciences*. – 1991. – V. 16. – P. 104–106.
12. *Lee J.* Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer / J. Lee, R. T. Raines // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44, № 48. – P. 15760–15767.
13. Comparative molecular modeling and crystallization of p-30 protein: a novel antitumor protein of rana pipiens oocytes and early embryos / S. C. Mosimann, K. L. Johns, W. Ardel[et al.] // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 1992. – V. 14, № 3. – P. 392–400.
14. A cytotoxic ribonuclease. study of the mechanism of onconase cytotoxicity / Y. Wu, S. M. Mikulski, W. Ardel[et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – V. 268, № 14. – P. 10686–10693.
15. A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases / Y. Wu, S. K. Saxena, W. Ardel[et al.] // *Journal of Biological chemistry*. – 1995. – V. 270, № 29. – P. 17476–17481.
16. *Yoshida H.* The ribonuclease t1 family / H. Yoshida // *Methods in enzymology*. – 2001. – V. 341. – P. 28.
17. *Maquat L. E.* Rna turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mrna decay / L. E. Maquat, M. Kiledjian. – Academic Press, 2009.
18. Noncytotoxic ribonuclease, rnae t1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of japan envelope vector / S. Yuki, Y. Kondo, F. Kato [et al.] // *The FEBS Journal*. – 2004. – V. 271, № 17. – P. 3567–3572.
19. The therapeutic potential of fungal ribotoxins / N. Carreras-Sangrà, E. Alvarez-García, E. Herrero-Galán [et al.] // *Current pharmaceutical biotechnology*. – 2008. – V. 9, № 3. – P. 153–160.
20. Actibind, an actin-binding fungal t2-rnae with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics / L. Roiz, P. Smirnov, M. Bar-Eli [et al.] // *Cancer*. – 2006. – V. 106, № 10. – P. 2295–2308.
21. *Kao R.* Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? / R. Kao, J. Davies // *Biochemistry and cell biology*. – 1995. – V. 73, № 11–12. – P. 1151–1159.
22. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. induction of cell death via apoptosis / N. Olmo, J. Turnay, G. de Buitrago [et al.] // *The FEBS Journal*. – 2001. – V. 268, № 7. – P. 2113–2123.
23. Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -sarcin / N. Carreras-Sangrà, J. Tomé-Amat, L. García-Ortega [et al.] // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 2012. – V. 25, № 8. – P. 425–435.
24. Bioactive proteins from mushrooms / X. Xu, H. Yan, J. Chen, X. Zhang // *Biotechnology advances*. – 2011. – V. 29, № 6. – P. 667–674.
25. *Wasser S. P.* Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S. P. Wasser, A. L. Weis // *Critical Reviews™ in Immunology*. – 1999. – V. 19, № 1.
26. *Cobaleda C.* *In vivo* inhibition by a site-specific catalytic rna subunit of rnae p designed against the bcr-abl oncogenic products: a novel approach for cancer treatment / C. Cobaleda, I. Sánchez-García // *Blood*. – 2000. – V. 95, № 3. – P. 731–737.
27. *Sanchez-Garcia I.* Tumorigenic activity of the bcr-abl oncogenes is mediated by bcl2 / I. Sanchez-Garcia, G. Grütz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – V. 92, № 12. – P. 5287–5291.
28. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice / N. Heisterkamp, G. Jenster, J. Ten Hoeve[et al.] // *Nature*. – 1990. – V. 344, № 6263. – P. 251.
29. Mung bean sprout (*Phaseolus aureus*) nuclease and its biological and antitumor effects. / J. Soucek, J. Skvor, P. Pouckova [et al.] // *Neoplasma*. – 2006. – V. 53, № 5. – P. 402–409.

30. Effect of wheat leaf ribonuclease on tumor cells and tissues / J. Skvor, P. Lipovova, P. Pouckova [et al.] // *Anti-cancer drugs*. – 2006. – V. 17, № 7. – P. 815–823.
31. Antitumor and biological effects of black pine (*pinus nigra*) pollen nuclease. / P. Lipovova, T. Podzimek, L. Orctova [et al.] // *Neoplasma*. – 2008. – V. 55, № 2. – P. 158–164.
32. Yel Y. Identification and properties of the major ribonucleases of *arabidopsis thaliana* / Y. Yen, P. J. Green // *Plant Physiology*. – 1991. – V. 97, № 4. – P. 1487–1493.

В. О. Шляховенко, О. А. Орловський, О. А. Самойленко, А. В. Вербиненко
Рибонуклеази — можливий новий напрям у розробці методів лікування пухлин

В огляді аналізуються результати досліджень, які демонструють різноманітні механізми включення рибонуклеаз (РНКази) у метаболічні та сигнальні шляхи клітини, що призводять до загибелі пухлинних клітин і гальмування росту пухлин.

Цитотоксичність РНКази базується здебільшого на індукції апоптозу за руйнування внутрішньоклітинних РНК. Показано, що цей ефект збільшується приблизно в 1000 разів за умов штучної інтерналізації РНКази до цитозолу. Цей факт вказує на фундаментальну роль процесу інтерналізації в цитотоксичності РНКази та є принципово важливим для терапевтичних підходів, що використовують екзогенні РНКази. Крім того, РНКази, присутні в міжклітинному середовищі за природних умов, можуть бути дуже важливими для протипухлинної резистентності. Наприклад, показано, що дисфункція позаклітинної РНКази T2 є ключовим чинником у канцерогенезі яєчника. Важливо також, що дослідження РНКази виявили деякі ключові точки перетину між механізмами протипухлинної та протівірусної резистентності, такі як інтерферон-залежна індукція експресії РНКази L.

Багато які з цих механізмів забезпечують вибірковий цитотоксичний ефект лише щодо пухлинних, але не щодо нормальних клітин, що робить РНКази перспективною групою протипухлинних чинників. Останнім часом були проведені різні стадії клінічних випробувань низки РНКази та виявлена їхня значна протипухлинна активність. Серед них, зокрема: BS-РНКаза великої рогатої худоби, яка проявила переважну активність щодо злоякісної мезотеліоми; онконаза (ранпіраза) з *Rana pipiens*, яка ініціює апоптоз різними шляхами та демонструє активність як проти клітин злоякісної мезотеліоми, так і проти вірусу папіломатозу людини (HPV), що пов'язаний з виникненням генітального та анального раку; РНКази T1 і T2 та α -сарцин, одержані з мікроскопічних грибів, та деякі інші.

Особливо цікавою є РНКаза Р, що є рибозимом, тобто унікальною молекулою РНК, яка має ферментативну (РНКазну) активність і порушує процес утворення «злитих» (fusion) білків шляхом специфічної взаємодії з відповідними тРНК та мРНК.

Таким чином, такі дослідницькі напрями як пошук нових РНКази з протипухлинною активністю в різноманітних біологічних об'єктах, нових індукторів та модифікаторів РНКази, цілеспрямоване створення нових рибозимів і різних комбінацій РНКази та традиційних хімотерапевтичних препаратів можуть бути вельми перспективними для розробки нових ефективних підходів до протипухлинної терапії.

Ключові слова: рибонуклеази, апоптоз, протипухлинна активність

В. А. Шляховенко, А. А. Орловский, Е. А. Самойленко, А. В. Вербиненко
Рибонуклеазы – возможное новое направление в разработке методов лечения опухолей

В обзоре анализируются результаты исследований, демонстрирующих различные механизмы включения рибонуклеаз (РНКази) в метаболіческие и сигнальные пути клетки, приводящие к гибели опухолевых клеток и торможению роста опухолей.

Цитотоксичность РНКази основана главным образом на индукции апоптоза при разрушении внутриклеточных РНК. Показано, что этот эффект возрастает примерно в 1000 раз при искусственной интернализации РНКази в цитозоль. Этот факт указывает на фундаментальную роль процесса интернализации в цитотоксичности РНКази и принципиально важен для терапевтических подходов, использующих экзогенные РНКази. Кроме того, РНКази, присутствующие в межклеточной среде в естественных условиях, могут быть очень важны для противоопухолевой резистентности. Например, показано, что дисфункция внеклеточной РНКази T2 является ключевым фактором в канцерогенезе яичника. Примечательно, что исследования РНКази выявили некоторые ключевые точки пересечения между механизмами противоопухолевой и противовирусной резистентности, такие как интерферон-зависимая индукция экспрессии РНКази L.

Многие из этих механизмов обеспечивают избирательный цитотоксический эффект лишь для опухолевых, но не для нормальных клеток, что делает РНКази перспективной группой противоопухолевых агентов. За последнее время были проведены различные стадии клинических испытаний ряда РНКази и выявлена их значительная противоопухолевая активность. Среди них, в частности, BS-РНКаза крупного рогатого скота, проявившая преимущественную активность против злокачественной мезотелиомы; онконаза (ранпіраза) из *Rana pipiens*, которая инициирует апоптоз различными путями и демонстрирует активность как против клеток злокачественной мезотелиомы, так и против вируса папилломатоза человека (HPV), связанного с возникновением генитального и анального рака; РНКази T1 и T2 и α -сарцин, полученные из микроскопических грибів, и некоторые другие.

Особый интерес представляет РНКазы Р, являющаяся рибозимом, то есть уникальной молекулой РНК, обладающей ферментативной (РНКазной) активностью и нарушающей процесс образования «слипных» (fusion) белков путем специфического воздействия на соответствующие тРНК и мРНК.

Таким образом, такие исследовательские направления, как поиск новых РНКаз с противоопухолевой активностью в различных биологических объектах, новых индукторов и модификаторов РНКаз, целенаправленное создание новых рибозимов и различных комбинаций РНКаз и традиционных химиотерапевтических препаратов могут быть весьма перспективны для разработки новых эффективных подходов к противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рибонуклеазы, апоптоз, противоопухолевая активность

V. O. Shlyakhovenko, O. A. Orlovsky, O. A. Samoilenko, A. V. Verbinenko **Ribonucleases — a new possible direction in elaboration of the cancer treatment**

A review of the investigations demonstrates different mechanisms of the RNAases involvement into the cellular metabolic and signaling pathways, resulting in the tumor cell death and tumor growth inhibition.

RNAase cytotoxicity is mainly based on apoptosis induction due to the intracellular RNA destruction. This effect was shown to be magnified for near 1000 times if an exogenous RNAase would be artificially internalized into the cytosol. This fact demonstrates a fundamental role of the internalization process in RNAase cytotoxicity and is a matter of principle for the therapeutic approach using exogenous RNAases. In addition, naturally existing extracellular RNAases may be very important for anticancer resistance. For example, disfunction of the RNAase T2 was shown to be a key factor in the ovarian carcinogenesis. It is notable that the RNAases investigations have demonstrated some crucial crosspoints between the mechanisms of anticancer and antiviral resistance, such as interferon-dependent induction of the RNAase L expression.

Many of these mechanisms provide differential cytotoxic effect on the cancer but not normal cells, making the RNAases a prospective group of anticancer agents. Nowadays, there were performed the different stages of the clinical trials of a series of RNAases and have demonstrated significant anticancer activity. Especially, they are: bovine BS-RNAase with preferential activity against the malignant mesothelioma; Onconase (Ranpirinase) from *Rana pipiens*, which initiates apoptosis through different pathways and demonstrates activity against both malignant mesothelioma cells and human papillomavirus (HPV) associated with appearance of genital and anal cancer; RNAases T1 and T2 and α -sarcin, obtained from the microscopic fungi, and some others.

Of a special interest is the RNAase P, which is a ribozyme, i.e. the unique RNA molecule which has an enzyme (RNAase) activity and disturbs formation of the fusion proteins through specific effects on corresponding tRNA and mRNA.

Thus, such research directions as search for new RNAases with anticancer activity in different biological objects, new RNAases inducers and modifiers, purposeful creation of new ribozymes and different combinations of the RNAases with the traditional chemotherapeutic agents may be highly prospective in elaboration of new efficient approaches in anticancer therapy.

Key words: ribonucleases, apoptosis, anticancer activity

Надійшла: 29 серпня 2017 р.

Контактна особа: Шляховенко Володимир Олексійович, доктор медичних наук, професор, провідний науковий співробітник, відділ біохімії пухлин та онкофармакології, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, буд. 45, вул. Васильківська, м. Київ, 03022. Тел.: + 38 0 44 259 91 95.
Електронна пошта: doctorvlad38@gmail.com

И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко

Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: тиол-дисульфидная система, NR2-пептид, глутаматная эксайтотоксичность, модуляторы глутатионовой системы

Проблема острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) продолжает сохранять чрезвычайную медицинскую и социальную значимость. Несмотря на значительные достижения современной ангионеврологии, показатели летальности при ишемических нарушениях мозгового кровообращения остаются на высоком уровне [1, 2]. Вполне очевидно, что улучшить результаты лечения ОНМК и сократить число осложнений возможно путем использования фармакологических подходов, воздействующих на механизмы эндогенной нейропротекции [1]. Основным патологическим процессом в тканях мозга, развивающимся в ответ на гипоксию, являются реакции глутамат-кальциевого каскада, которые запускаются в первые минуты и часы церебральной ишемии [1–4]. Активация NMDA-рецепторов глутаматергического синапса приводит к гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) (пероксинитрита, гидроксилрадикала и супероксидрадикала) и повышению содержания внутриклеточного Ca^{2+} . Гиперпродукция АФК усугубляет дисбаланс в антиоксидантной системе клетки, и в частности системе глутатиона и системе антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза), что приводит к повреждению макромолекул и в конечном итоге гибели нейрона [5, 6]. В этом отношении в качестве приоритетного звена-мишени для модуляции эндогенной нейропротекции рассматривается

глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы (ТДС). Глутатион является сквенджером активных форм кислорода и азота, а также регулирует реакции утилизации свободных радикалов. Участие глутатиона восстановленного в механизмах эндогенной нейропротекции реализуется путем снижения гипервозбудимости NMDA-рецепторов и прерывания реакций глутамат-кальциевого каскада. В этом случае глутатион в концентрации 0,2–5,0 ммоль/л модулирует –SH группы NMDA [1, 2, 7]. Важность системы глутатиона в регуляции множества защитных функций клетки определяет глутатионовое звено ТДС как перспективную мишень для фармакологической коррекции в условиях церебральной ишемии [8, 9]. В предыдущем исследовании впервые были получены убедительные данные о нейропротекторном действии модуляторов глутатионовой системы в условиях экспериментальной ОНМК. Однако до конца не ясны истинные механизмы этого действия данных лекарственных средств.

Цель исследования – изучение нейропротекторных свойств модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима и глутаредоксина) в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

Материалы и методы. *Получение нейрональной культуры клеток.* Выделение обогащенных фракций нейронов и нейроглии проводили в два этапа. На первом этапе мозговую ткань дезинтегрировали с целью получения клеточной суспензии, на втором – осуществляли дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и фиколла. Для исследований *in vitro*

нейроны выделяли из коры головного мозга 10-дневных крысят линии Вистар (кора почти не содержит глиальных клеток). Для получения нейронов животных декапитировали и быстро извлекали мозг. Кору головного мозга отделяли, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7,5 % поливинилпирролидона (ПВП), 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 10 ммоль/л CaCl_2 . Полученную суспензию фильтровали под незначительным давлением, создаваемым водоструйным насосом, на тefлоновой воронке с двумя нейлоновыми ситами – 258 мкм и 82 мкм и металлическим ситом с диаметром пор 58 мкм. После последовательного пропускания через сита клеточную суспензию наслаивали на градиент, состоящий из 6 мл 1 моль/л и 5 мл 1,75 моль/л сахарозы на 1 % бычьим сывороточном альбумине, и центрифугировали при 60 000 g 30 мин (10 °C) в рефрижераторной центрифуге SIGMA 3-30K. Полученную таким образом клеточную суспензию разделяли на серии: интактная; контрольная, в которой индуцировали развитие глутаматной «эксайтотоксичности»; опытные, в которых индуцировали глутаматную «эксайтотоксичность» с добавлением исследуемых субстанций и препаратов в концентрации 10^{-5} моль/л, и группа сравнения, в которой индуцировали глутаматную «эксайтотоксичность» с добавлением мексидола в концентрации 10^{-5} моль/л [10–12].

Для моделирования глутаматной эксайтотоксичности в культуре нейронов нейробазальную среду (NBM) заменяли на NERES-солевой буфер (NBSS) и далее клетки инкубировали 60 мин в присутствии глутамата (100 мкмоль/л) при температуре 37 °C. Состав NBSS в ммоль/л: NaCl – 145, KCl – 5, CaCl_2 – 1,8, MgCl_2 – 1,0 (без MgCl_2 в случае экспозиции клеток с глутаматом); Gly – 0,01; NERES-20; глюкоза – 5 (pH 7,4) [12]. Исследуемые вещества, в концентрации 10^{-5} моль/л, добавляли за 15 мин до последующего добавления глутамата [13].

Исследования на животных проводили в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU. Для

изучения действия препаратов использовали селеназу Arzneimittel GmbH, Germany (раствор для инъекций, содержащий натрия селенита пентагидрат, что эквивалентно содержанию селена 50 мкг/мл), глутоксим ФАРМА-ВАМ, РФ (1 % раствор для инъекций, содержащий глутамил-цистеинил-глицин динатрия 10 мг/мл) и глутаредоксин Sigma, Aldrich (50 % глицерина, содержащий 1 ммоль/л глутатиона). В качестве референс-препарата использовали раствор мексидола ЗАО «АЛСИ Фарма», Москва (5 % раствор для инъекций содержащий этилметилгидроксипиридина сукцинат 50 мг/мл).

Нейропротекторные эффекты изучаемых препаратов оценивали по их влиянию на изменение уровней глутатиона восстановленного (GSH), нитротирозина и пептидного фрагмента NMDA-рецепторов – NR2-пептида. Содержание GSH определяли спектрофотометрически [14]. Содержание NR2-пептида и нитротирозина определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием тест-наборов «Gold Dot NR2 Peptide test», (CIS Biotech, Inc., Атланта, США) и «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology») в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Нормальность распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова (D) и Shapiro-Wilk (W). Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате нейротоксичности, вызванной высокими дозами глутамата, происходит перевозбуждение NMDA-рецепторов с последующей их деградацией на пептидные фрагменты (NR2-пептид) [15]. В контрольной нейрональной

суспензии нами был зарегистрирован значительный рост (в 5 раз) уровня NR2-пептида в сравнении с интактной суспензией. Внесение глутамата вызвало усиленную продукцию активных форм кислорода и генерацию активных дериватов оксида азота в исследуемой нейрональной суспензии, о чем свидетельствует повышение уровня маркера NO-зависимого оксидативного стресса – нитротирозина (в 2 раза). Образующийся в результате нитрозирующего стресса нейротоксичный пероксинитрит (ONOO-) взаимодействуют с SH-группами цистеиновых остатков белков и SH-группами восстановленного глутатиона, что приводит к их окислению в дисульфиды и нитрозилированию тиолов. Это истощает запасы восстановленного глутатиона, смещая ТДС-равновесие в сторону дисульфидов [1, 10, 11, 22]. Зарегистрировано снижение уровня восстановленной формы глутатиона на 65,48 % на 60 мин в сравнении с первоначальными значениями (табл.1).

Преинкубация нейрональной суспензии с модуляторами системы глутатиона способствовала ограничению гиперактивности NMDA-рецепторов (табл. 2), что выражалось в снижении уровня NR2-пептида (селеназа – на 18,8 %, глутоксим – на 19,6 %, глутаредоксин – на 68,5 %, мексидол – на 10,9 %). Следует отметить, что для селеназы, глутоксима и препарата сравнения – мексидола эти изменения не были статистически значимыми. Также зарегистрировано снижение накопления токсичного нитротирозина (селеназа – 12,5 %, глутоксим – 25 %, глутаредоксин – 49,1 %, мексидол – 17,85 %), что сви-

детельствует о некотором ограничении развития реакций нитрозирующего и оксидативного стресса (табл. 2). Ограничение оксидативного и нитрозирующего стресса, а также глутаматной эксайтотоксичности, по-нашему мнению, является следствием повышения уровня восстановленного глутатиона (повышение уровня глутатиона восстановленного: селеназа – 7,87 %, глутоксим – 25,19 %, глутаредоксин – 10,23 %, мексидол – 5,5 %) – интегрального показателя ТДС.

По нашему мнению, нейропротекторные эффекты исследуемых препаратов *in vitro* связаны с активацией редокс-чувствительных транскрипционных факторов AP-1, NF-κB, NF-1, которые приводят к увеличению экспрессии генов антиоксидантных ферментов (GPR, GR, GST, SOD, каталазы) и генов ферментов, обеспечивающих поддержание стабильной внутриклеточной концентрации GSH (γ-глутамилтрансферазы, γ-глутамилцистеинсинтетазы) за счет его синтеза *de novo* [16]. Особенною таким действием исследуемых препаратов явилось повышение уровня GSH и снижение уровня нитротирозина и NR2-пептида. Однако причина этих изменений зависела от типа препарата. В случае действия глутаредоксина изменения биохимических маркеров были обусловлены повышением активности γ-GCS – скорость-лимитирующего фермента синтеза GSH *de novo*, так и активности GR, восстанавливающей GSH из его окисленной формы (GSSG), что приводит к росту содержания GSH. Таким образом, рост GSH при действии глутаредоксина является результатом

Таблица 1

Биохимические показатели в нейрональной суспензии в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* ($M \pm m, n = 10$)

Показатели	Интактная суспензия	Суспензия с внесением 100 мкмоль/л глутамата (контроль)
Нитротирозин, нмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)	5,52 ± 0,65	11,2 ± 1,12*
NR2- пептид, нг/мл (на 60 мин наблюдения)	0,91 ± 0,32	5,05 ± 1,54*
Глутатион восстановленный, мкмоль/ г белка (на 60 мин наблюдения)	3,68 ± 0,19	1,27 ± 0,08*

Примечание. * $p < 0,005$ относительно интактной суспензии.

Уровень биохимических маркеров в суспензии мозга при моделировании глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и под влиянием модуляторов тиол-дисульфидной системы ($M \pm m$, $n = 10$)

Экспериментальная группа	Нитротирозин, нмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)	NR2-пептид, нг/мл (на 60 мин наблюдения)	Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)
Суспензия нейронов с добавлением глутамата (100 мкмоль/л)	11,20 ± 1,12	5,05 ± 1,54	1,27 ± 0,08
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и селеназы (10 ⁻⁵ моль/л)	9,80 ± 0,59	4,10 ± 0,52	1,37 ± 0,13
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и глутоксима (10 ⁻⁵ моль/л)	8,40 ± 0,54	4,06 ± 0,65	1,59 ± 0,1**
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и глутаредоксина (10 ⁻⁵ моль/л)	5,70 ± 0,48**	1,59 ± 0,31**	1,41 ± 0,09*
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и мексидола (10 ⁻⁵ моль/л)	9,20 ± 0,74	4,50 ± 0,53	1,34 ± 0,06

Примечание. * $p \leq 0,005$ по сравнению с контрольной суспензией (с добавлением глутамата); ** $p \leq 0,05$ по сравнению с группой мексидола.

активации синтеза GSH и его ресинтеза из GSSG вследствие повышения активности транскрипционных факторов, регулирующих гены, ответственные за повышение синтеза ферментов γ -GCS и GR соответственно.

Действие глутоксима, содержащего аминокислоты цистеин, глицин, глутаминовую кислоту, заключается в активации синтеза GSH *de novo*, а также подавлении активации транскрипционного фактора NF-kB [16], что приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов IL-1, TNF- α , вызывающих увеличение продукции АФК и развитие процессов воспаления [17, 18]. Известно, что окислительный стресс может индуцировать транспорт цистеина, глутаминовой кислоты, глицина через клеточную транспортную систему, тем самым стимулируя синтез глутатиона восстановленного в γ -глутамиловом цикле. Следует отметить, что глутоксим в этом случае будет являться субстратом для γ -GCS [19, 20].

Незначительное ограничение проявлений окислительного и нитрозирующего стресса, а также повышение

уровня GSH под действием селеназы можно отнести на счет ее способности играть роль «ловушки» свободных радикалов [21]. Таким образом, из полученных нами результатов следует, что действие глутаредоксина и глутоксима на антиоксидантный статус нейронов, подвергшихся воздействию токсических доз глутамата, сопровождается увеличением GSH и снижением нитротирозина и NR2-пептида в результате синтеза GSH *de novo* и его ресинтеза из GSSG. Напротив, селеназа в используемой дозе (10⁻⁵ моль/л) вызывает рост GSH, по-видимому, благодаря способности выступать в роли «ловушки» свободных радикалов. Наибольший эффект установлен у глутаредоксина, в меньшей степени – у глутоксима, минимальный – у селеназы. Сочетание у исследуемых препаратов антиоксидантных свойств и способности активировать транскрипцию генов, в том числе и антиоксидантных ферментов, повышает устойчивость нейронов к окислительному стрессу, что свидетельствует о важном вкладе данных препаратов в нейропротекцию.

Анализ полученных результатов в нейрональной суспензии, преинкубированной с исследованными модуляторами тиол-дисульфидной системы, может служить основанием для дальнейшего изучения их нейропротекторных свойств при моделировании ОНМК у животных.

Выводы

Таким образом, результаты проведенных опытов *in vitro* на нейрональной

суспензии показали наличие эффекта в отношении ограничения оксидативного и нитрозирующего стресса у исследованных препаратов. По выраженности действия лидировал глутаредоксин.

Экспериментальные данные указывают, что препараты селеназа, глутоксим и глутаредоксин оказывают умеренное нейропротекторное действие и могут быть использованы с целью потенцирования действия базовой нейропротекторной терапии.

1. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 510 с.
2. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др.]. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. – С. 262.
3. Исайкин А. И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта/ А. И. Исайкин // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 27–30.
4. Novel Role for Glutathione S-Transferase: Regulator of Protein S-Glutathionylation Following Oxidative and Nitrosative Stress / D. M. Townsend, Y. Manevich, L. He. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, № 1. – P.436–445.
5. Гомазков О. А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга / О. А. Гомазков. – Москва : Высшая школа, 2003. – 200 с.
6. Современные представления о механизмах патогенеза повреждений мозга и нейропротекторной терапии / Ю. Г. Шанько, А. Л. Танин, А. Н. Наледько [и др.] // ARS MEDICA. – 2009. – № 3 (13). – С. 97–105.
7. Антиоксиданти: клініко-фармакологічний аспект / І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова [та ін.] // Український медичний часопис. – 2014. – № 1 (99). – С. 22–28.
8. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, В. В. Шпрах [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 1 (39). – С. 63–65.
9. Способность клеток адаптироваться к условиям низкого содержания кислорода связана с глутатионилированием Na,K-АТФазы / И. Ю. Петрушанко, О. В. Симоненко, К. М. Бурнышева [и др.] // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 175–183.
10. Горбачева С. В. Показатели тиол-дисульфидной системы и нитрозативного стресса в нейронах в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и на фоне применения ингибиторов NOS различной селективности / С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев // Світ медицини та біології. – 2015. – № 4 (54). – С. 112–116.
11. Глутатион-зависимые механизмы нейропротективного действия нового метаболитотропного препарата «Ангиолин» в условиях индукции нитрозирующего стресса *in vitro* / С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 6 (46). – С. 12–18.
12. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: методические рекомендации // И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев [и др.]. – Киев, 2010. – 81 с.
13. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т / В. В. Алексеев; под ред. А. И. Карпищенко. – Т. 2. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.
14. Волошина И. Н. Прогностическая значимость элевации нейроиммунных маркеров у больных с эссенциальной артериальной гипертензией и последствиями инфаркта мозга / В. А. Визир, И. Н. Волошина // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 4 (60).
15. Калинина Е. В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редоксзависимых процессах / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, А. Н. Саприн // Успехи биол. химии. – 2008. – Т. 48. – С. 319–358.
16. NOV-002, a Glutathione Disulfide Mimetic, as a Modulator of Cellular Redox Balance/ D. M. Townsend, Lin He, S. Hutchens [et al.] // Cancer Res. – 2008. – № 68 (8). – P. 2870–2877.
17. Townsend D. M. Pharmacology of a mimetic of glutathione disulfide, NOV-002 / D. M. Townsend, K. D. Tew // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2009. – V. 63, № 2. – P. 1–4
18. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом глутоксим в клетках A 431 / Е. Б. Бурова, К. П. Василенко, В. Г. Антонов, Н. Н. Никольский // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 404, № 1. – С. 1–3.
19. *Rahmanto A. S. Selenium-containing Amino Acids as Direct and Indirect Antioxidants / A. S. Rahmanto, M. J. Davies // Life. – 2012. – № 64 (11). – P. 863–871.*

20. Буй Тхи Минь Тху. Фармакологическая характеристика селеносодержащих соединений (обзор) / Буй Тхи Минь Тху // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА, Пятигорск. – 2007. – Вып. 62. – С. 448–450.
21. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia / S. L. Mehta, S. Kumari, N. Mendeleev, P. A. Li // BMC Neuroscience. – 2012. – № 12 (3). – P. 45–50.
22. Горбачева С. В. Роль соотношения тиол- дисульфидной системы и оксида азота в механизмах выживания нейронов при церебральной ишемии: автореф. дисс. на соискание степени доктора биол. наук: спец. 14.01.32 – медицинская биохимия/ Горбачева Светлана Владимировна; ДЗ «Луганський Державний медичний університет». – Рубіжне, 2017. – 22 с.

И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко

Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*

Цель исследования – изучение нейропротекторных свойств модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима, глутаредоксина) в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

Эффективность модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима, глутаредоксина) и препарата сравнения мексидола оценивали по их влиянию на уровень маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина, концентрацию пептида NR2 (продукта протеолитической деградации NMDA-рецепторов) и содержание глутатиона восстановленного в суспензии нейронов.

Введение глутамата в суспензию нейронов вызвало неконтролируемую продукцию активных форм кислорода и развитие нитрозирующего стресса с увеличением уровня нитротирозина более чем в 2,0 раза на 60-й мин после введения глутамата. Это также вызвало депривацию глутатионного звена тиол-дисульфидной системы, о чем свидетельствует дефицит эндогенного глутатиона. Перевозбуждение NMDA-рецепторов, вызванное высокими концентрациями глутамата, привело к значительному росту (в 5 раз) уровня NR2-пептида. С целью фармакологической коррекции данных патологических изменений изучаемые препараты селеназа, глутоксим, глутаредоксин вводили в концентрации 10^{-5} моль/л в нейрональную суспензию. Более детальное исследование показало, что введение изучаемых препаратов вызывало снижение интенсивности нитрозирующего стресса и глутаматной эксайтотоксичности. Это подтверждается уменьшением содержания нитротирозина и NR2-пептида и восстановлением тиол-дисульфидного баланса. Установлено, что реализация нейропротекторного действия исследуемых препаратов связана с их положительным влиянием на глутатионное звено тиол-дисульфидной системы. Препараты способны поддерживать стабильный уровень эндогенного глутатиона, что по нашему мнению, связано с активацией редокс-чувствительных транскрипционных факторов AP-1, NF- κ B, NF-1, которые приводят к экспрессии генов ферментов, ответственных за синтез GSH *de novo* и его ресинтез из GSSG. Определен наиболее эффективный препарат – глутаредоксин, который значительно превысил вышеупомянутые препараты по всем изученным показателям. Глутаредоксин также в соответствии с исследованными параметрами значительно превышал эффекты референтного препарата – мексидола.

Полученные результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротекторной терапии при ишемическом инсульте и могут быть теоретическим фундаментом для разработки новых фармакологических подходов к терапии с использованием модуляторов системы глутатиона.

Ключевые слова: тиол-дисульфидная система, NR2-пептид, глутаматная эксайтотоксичность, модуляторы глутатионовой системы

І. Ф. Беленічев, Е. С. Литвиненко

Нейропротекторна активність модуляторів тіол-дисульфідної системи за умов моделювання глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*

Мета дослідження – вивчення нейропротекторних властивостей модуляторів глутатионові системи (селенази, глутоксиму, глутаредоксину) за умов моделювання глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*.

Ефективність модуляторів глутатионові системи (селенази, глутоксиму, глутаредоксину) і препарату порівняння мексидолу оцінювали за їхнім впливом на рівень маркера нітрозуючого стресу – нитротирозину, концентрацією пептиду NR2 (продукту протеолітичної деградації NMDA-рецепторів) і вмістом глутатіону відновленого в суспензії нейронів.

Введення глутамату в суспензію нейронів викликало неконтрольовану продукцію активних форм кисню та розвиток нітрозуючого стресу зі збільшенням рівня нитротирозину більше ніж у 2,0 разу на 60-й хв після введення глутамату. Це також призвело до депривації глутатионові ланки тіол-дисульфідної системи, про що свідчить дефіцит відновленої форми глутатіону. Перезбудження NMDA-рецепторів, викликане високими концентраціями глутамату, призвело до значного зростання (у 5 разів) рівня NR2-пептиду. З метою фармакологічної корекції даних патологічних змін досліджувані препарати селеназу, глутоксим, глутаредоксин вводили в концентрації 10^{-5} моль/л у нейрональну

суспензію. Більш детальне дослідження показало, що введення досліджуваних препаратів викликало зниження інтенсивності нітрозуючого стресу та глутаматної ексайтотоксичності. Це підтверджується зменшенням вмісту нітротирозину та NR-2 пептиду, відновленням тіол-дисульфідного балансу. Встановлено, що реалізація нейропротекторної дії досліджуваних препаратів пов'язана з їхнім позитивним впливом на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи. Препарати здатні підтримувати стабільний рівень ендогенного глутатіону, що на нашу думку пов'язано з активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів AP-1, NF- κ B, NF-1, які призводять до експресії генів ферментів, відповідальних за синтез GSH *de novo* і його ресинтез з GSSG. Визначений найефективніший препарат – глутаредоксин, який значно перевищив вищезгадані препарати за всіма вивченими показниками. Глутаредоксин також значно перевищував ефекти референтного препарату – мексидолу.

Отримані результати розкривають значення глутатіонової системи нейрона як важливої мішені нейропротекторної терапії за ішемічного інсульту та можуть бути теоретичним фундаментом для розробки нових фармакологічних підходів до терапії з використанням модуляторів системи глутатіону.

Ключові слова: тіол-дисульфідна система, NR2-пептид, глутаматна ексайтотоксичність, модулятори глутатіонової системи

I. F. Belenichev, E. S. Lytvynenko

Neuroprotective action of glutathione system modulators in conditions of glutamate excitotoxicity modeling *in vitro*

The aim of the work was to study the neuroprotective properties of glutathione system modulators (selenase, glutoxim, glutaredoxin) in neurons in conditions of glutamate excitotoxicity modeling *in vitro*.

Efficiency of glutathione system modulators (selenase, glutoxim, glutaredoxin) and comparison drug-mexidol evaluated by their influences on the marker of nitrosative stress (content of nitrotyrosine), concentration of the NR2-peptide (product of the proteolytic degradation of NMDA-receptors) and the reduced glutathione level in neuronal suspension.

Introduction of glutamate to the incubated neuronal suspension evoked uncontrolled reactive oxygen species production and development of nitrosative stress with an increase of nitrotyrosine level by more than 2,0 times in neuronal suspension on 60th min after glutamate introduction. This also caused deprivation of glutathione link of thiol-disulfide system. Evidence of that is deficient of reduced form of glutathione. Overexcitation of NMDA receptors, caused by high concentration of glutamate, led to a significant increase (5-fold) of the NR2-peptide level. With the purpose of pharmacological correction of pathological changes the selenase, glutoxim, glutaredoxin were used in concentration 10^{-5} M. The introduction of this drugs into the neuronal suspension caused preservation of reduced glutathione level. More detailed investigation showed, that drug administration (10^{-5} M) caused the decrease of nitrosative stress and glutamate excitotoxicity intensity. That is proved by the decrease of nitrotyrosine and NR-2 peptide content and renovation of thiol-disulfide balance. It has been established that realization of neuroprotective action of studied drugs is connected with its positive influence on glutathione link of thiol-disulfide system. The drugs were able to maintain the level of endogenous glutathione, which in our opinion is associated with the activation of redox-sensitive transcription factors AP-1, NF- κ B, NF-1, which lead to the expression of the enzymes genes responsible for the synthesis of GSH *de novo* and its resynthesis from GSSG. Glutaredoxin was determined as the most effective drug, which significantly exceeded the above-mentioned drugs in all studied indicators. Glutaredoxin also according to the investigated parameters significantly exceeded the effects of referent drug – mexidol.

The data obtained suggest that glutathione system of neurons is an important target for neuroprotective therapy when ischemic stroke arises and this fact may be an experimental ground for clinical application of glutathione system modulators.

Key words: thiol-disulfide system, NR2-peptide, glutamate excitotoxicity, glutathione system modulator

Надійшла: 6 липня 2017 р.

Контактна особа: Беленічев І. Ф., Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 061 224 64 69.
Електронна пошта: vitalena90@gmail.com

І. В. Кабачна, С. М. Дроговоз, В. І. Кабачний, Н. Ю. Палагіна

Дослідження аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів на моделі кетамінового наркозу

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: гетерозид, наркоз, кетамін, аналептики, пробуджуючий ефект, частота дихання

Аналіз патогенетичних механізмів розвитку невідкладних станів (шок, колапс, наркоз та випадки його передозування, асфіксія, гіпоксія, бактеріальна інтоксикація, отруєння хімічними сполуками або ліками, що пригнічують функції центральної нервової системи (ЦНС), свідчить, що серед препаратів ургентної терапії аналептичні препарати (АП) мають відігравати першорядну роль [1, 2]. Однак їхня реальна кількість, як і використання, вкрай обмежені. За останні 50 років арсенал АП не поповнювався й налічує 6 препаратів: бемегрид, сульфокамфокаїн, нікетамід, кофеїн, етимізол, коразол [3]. Однак вибірковість впливу на певні структури мозку, ризик небажаних побічних ефектів, обмежена широта терапевтичної дії, досить висока токсичність різко обмежують коло їхнього застосування [3, 4]. У реальній лікарській практиці України застосовуються тільки сульфокамфокаїн, кофеїн і кордіамін (нікетамід) [4].

Суттєвою перепоною в розширенні асортименту АП є відсутність стандартизованої моделі (СМ) для їхнього цілеспрямованого пошуку, що ускладнює або не дозволяє порівнювати результати, визначати пріоритети наукових досліджень, оптимізувати пошук та збільшити їхній асортимент.

Таким чином, створення СМ як бази для цілеспрямованого відбору субстанцій з аналептичною дією, що здатні швидко, ефективно та без шкоди прискорювати загальну детоксикацію, переривати наркоз, буде вирішувати одразу широкий спектр медико-соці-

альних проблем невідкладних станів – є вельми актуальною проблемою хіміків, фармакологів та клініцистів.

Мета дослідження – вивчення аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів (Гетерозиду-21) на моделі кетамінового наркозу.

Матеріали та методи. Оцінку аналептичного (пробуджуючого) ефекту речовин проводили на самцях білих нелінійних мишей масою 20–30 г. Як препарат для наркозу використовували кетамін (Кетамін-ЗН, Здоров'я народу, Україна) [5, 6]. Кетамін був обраний за наступними критеріями: як препарат першої лінії для внутрішньовенного наркозу тварин у ветеринарії; за механізмом дії пригнічує ЦНС загалом і дихальний центр мозку зокрема; характеризується коротким терміном дії, що суттєво скорочує час дослідів та спрощує експеримент; реально застосовується за умов польової хірургії (під час війни та природних катастроф), що вимагають термінового переривання наркозу*.

Препаратами порівняння були класичні комбіновані аналептики – сульфокамфокаїн (СКК) та кордіамін (нікетамід), що стимулюють дихальний і судиноруховий центри довгастого мозку [5]. Заздалегідь скринінг проводили серед 25 гетерозидів (похідних сірко- та азотвмісних гетероциклів),

*У польових умовах важливу роль відіграє тривалість операції, яка значною мірою залежить не тільки від тривалості хірургічних маніпуляцій, скільки від тривалості наркозу, що дуже індивідуально, і варіює в діапазоні від 30 хв до декількох годин. За обмеженості хірургічного та реабілітаційного персоналу це є фактором, що визначає швидкість і ефективність рятувальних заходів.

найбільшу достовірну аналептичну активність виявив Гетерозид-21.

Тварин утримували в стандартних умовах Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ відповідно до санітарно-гігієнічних норм ($t = 19-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість – не більше ніж 50 %, природний світловий режим – «день-ніч») у пластикових клітках на стандартному раціоні харчування з вільним доступом до води [7]. Дослідження було виконане відповідно до вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України про «Доклінічні дослідження лікарських засобів», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.) та ін. [8].

Під час дослідження тварин розподілили на 4 групи ($n = 5-23$). Спочатку всім тваринам внутрішньоочередовно вводили кетамін у дозі 150 мг/кг [9–11]. Перша група була контролем (отримувала тільки кетамін). Досліджувані речовини та препарати порівняння також вводили внутрішньоочередовно після входження тварин у третю фазу наркозу (знерухомлене бічне положення з рівномірним уповільненим диханням) на піку (15 хв) наркозного сну [11, 12]. Друга група отримувала Гетерозид-21 у дозі 1,0 мг/кг, група 3 – СКК 20 мг/кг, група 4 – кордіамін (нікетамід) у дозі 63 мг/кг [11, 12].

Ефективність досліджуваних речовин оцінювали за тривалістю наркозу (ТН). Вплив на дихальний центр визначали за частотою дихальних рухів за

1 хв (ЧДР/хв) у різних фазах наркозу, до та після введення пробуджуючих препаратів. Контролем були показники ТН і ЧДР/хв першої групи [11, 12].

ЧДР підраховувалася протягом 60 с починаючи з прийняття мишами бокового положення (ЧДР 1), ЧДР 2 – на 7-й, ЧДР 3 – на 14-й хв наркозного сну, ЧДР 4 заміряли (на 15-й хв) відразу після введення Гетерозиду-21 або СКК. Подальший облік ЧДР проводили в період пробудження тварин: на 20-й (ЧДР 5), 25-й (ЧДР 6) і 30-й (ЧДР 7) хв відповідно. Останній вимір (ЧДР 8) здійснювали після прийняття тваринами положення на чотирьох лапах (повне пробудження) [11, 12]. З цього моменту оцінювали психомоторний стан тварин (дезорієнтованість або цілеспрямованість руху); рівень їхньої постнаркозної адаптації (загальмованість, гіперактивність, цікавість до їжі та води); фізіологічні реакції (сечовиділення, дефекація) та ін. Достовірність отриманих результатів оцінювали за критеріями Ньюмана-Кейлса та Манна Уїтні за допомогою програми Statistica 10.0 [13].

Результати та їх обговорення. У ході проведених досліджень (табл.1) було встановлено, що оптимальна глибина та тривалість наркозу досягалася за внутрішньоочередовного введення 150 мг/кг кетаміну. Серед 25 досліджуваних субстанцій тільки Гетерозид-21 виявив пробуджуючу активність. Гетерозид-21 прискорював пробудження тварин на 11,83 %, у той час, як СКК – на 13,0 % швидше, а кордіамін лише на 7,02 %. Таким чином, Гетерозид-21 у дозі в 20 разів меншій, поступався за ефективністю СКК на 1,2 % та в дозі в 63 рази меншій, ніж кордіамін, скорочував ТН

Таблиця 1

Пробуджуючий ефект досліджуваних субстанцій на моделі кетамінового наркозу

Група	Середня тривалість наркозу, с	Пробуджуючий ефект, %
Кетамін (контроль, $n = 23$)	2017,96 ± 10,25	100,0 %
Кетамін + Гетерозид-21, 1,0 мг/кг ($n = 10$)	1779,33 ± 88,04	88,17 %
Кетамін + Сульфокамфокаїн, 20,0 мг/кг ($n = 10$)	1767,66 ± 51,74*	87,0 %
Кетамін + Кордіамін, 63,0 мг/кг ($n = 5$)	1876,33 ± 21,57	92,98 %

Примітка. * $p < 0,05$ порівняно з контролем (критерій Ньюмана-Кейлса), n – кількість мишей у групі.

у 1,7 разу більше. Усі інші гетерозиди, Гетерозид-21 в інших дозах та кордіамін не показали достовірних результатів, тому в подальшому не розглядаються та не порівнюються.

Порівняння результатів вимірювання ЧДР у різних фазах кетамінового наркозу з ТН (табл. 2) показало, що після введення кетаміну ЧДР 1–ЧДР 4 достовірно ($p < 0,05$) знижується зі 104 до 61 ДР/хв відповідно, досягаючи мінімуму в контрольній групі на 15-й хв наркозу. У той самий час після введення Гетерозиду-21 і СКК моментально (на кінчику голки) відзначалося суттєве збільшення ЧДР 4 відносно групи контролю в 2,1 (210 %) і 2,0 разу (205 %) відповідно. Потім показники ЧДР змінювалися наступним чином: ЧДР 5 збільшувалася на 72,2 і 84,7 %; ЧДР 6 – на 49,4 і 61,4 %; ЧДР 7 – на 59,0 і 60,3 %; ЧДР 8 – на 24,8 і 31,7% відповідно.

Отримані результати збігаються з класичними уявленнями про механізми дії кетаміну як засобу, пригнічуючого ЦНС загалом і ДЦ зокрема [1, 3, 5, 6], а також класичного аналептика – СКК [3, 4], що експериментально підтверджує адекватність обраної моделі досліджень і часу введення досліджуваних субстанцій (у період максимальної глибини наркозу).

Звертає на себе увагу той факт, що відразу після введення Гетерозиду-21

уже протягом 1-ї хв ЧДР 4 достовірно ($p < 0,05$) збільшується в 2,1 разу порівняно з контрольною групою, максимум (133 ДР/хв) у групі препарату порівняння досягається тільки через 6 хв (ЧДР 5), що свідчить про перевагу Гетерозиду-21 за швидкістю стимуляції ДЦ і дозволяє віднести останній до перспективних аналептиків. Подальша синхронна стабілізація ЧДР під впливом СКК і Гетерозиду-21 відбувалася вже на 20-й хв (ЧДР 5) і тривала аж до повного пробудження тварин (ЧДР 8). Зіставлення показників ЧДР 8 свідчить про те, що контрольна група (101 ДР/хв) навіть після повного пробудження так і не досягла рівня результатів групи Гетерозиду-21 (126 ДР/хв) та групи СКК – (133 ДР/хв). Це підтверджує наявність виразної постнаркозної інтоксикації ЦНС загалом і ДЦ зокрема.

Група тварин, що отримувала Гетерозид-21, після пробудження характеризувалася доброю координацією рухів (переміщення по прямій лінії в швидкому темпі), активним вживанням води та їжі, посиленням діурезом, у післянаркозний період миші взагалі не впадали в сплячку, що свідчить про наявні детоксикуючі властивості цієї субстанції. Миші з групи, яка отримувала СКК, після повного пробудження переміщалися повільніше з частими падіннями, здебільшого по периметру клітки, без особливої цікавості до

Таблиця 2

Частота дихальних рухів у різних фазах кетамінового наркозу та за впливу досліджуваних субстанцій, ЧДР/хв

Група ЧДР	Кетамін, 150,0 мг/кг (контроль, n = 23)	Кетамін, 150,0 мг/кг + Гетерозид-21, 1,0 мг/кг (n = 10)	Кетамін, 150,0 мг/кг + Сульфокамфокаїн, 20,0 мг/кг (n = 10)	p
ЧДР1	104 (90; 128)			
ЧДР 2	98 (80; 108)			
ЧДР 3	86 (82; 98)			
ЧДР 4	61 (60; 62)	128 (118; 141)*	125 (114; 141)*,**	0,0041
ЧДР 5	72 (64; 82)	124 (120; 128)*	133 (125; 142)*	0,0017
ЧДР 6	83 (80; 90)	124 (122; 134)*	134 (121; 140)*	0,0502
ЧДР 7	78 (72; 96)	124 (124; 136)*	125 (125; 139)*	0,0467
ЧДР 8	101 (92; 102)	126 (124; 142)*	133 (129; 139)*	0,0049

Примітка. p – рівень статистичної значущості в разі порівняння вибірок за допомогою дисперсного аналізу ANOVA, * $p < 0,05$ порівняно з контролем (критерій Манна Уїтні), ** $p \leq 0,05$ порівняно з групою Гетерозиду-21 (критерій Манна Уїтні), n – кількість мишей у групі.

води та їжі, сечовипускання було рідким, а потім вони впадали в сплячку (тривалістю близько 1 год). Тварини контрольної групи після кетамінового наркозу тривалий час були загальмовані та дезорієнтовані (завмирили або повільно переміщалися, падали з одного боку на інший, здійснювали кругові рухи, у них повністю був відсутній інтерес до води та їжі), і через деякий час вони впадали в тривалий сон (1–2 год), що повністю збігається з класичним симптомокомплексом постнаркозної (кетамінової) інтоксикації [6].

Наведені результати дослідження Гетерозиду-21 свідчать, що похідні

сірко- та азотвмісних гетероциклів є перспективними для пошуку оригінальних аналептиків.

Висновки

1. Модель кетамінового наркозу дозволяє порівнювати ефективність класичних препаратів та оригінальних речовин за ознаками пробуджуючого ефекту, впливом на ДЦ та може використовуватися для цілеспрямованого пошуку аналептиків.
2. Встановлено, що Гетерозид-21 не поступається за ефективністю сульфокамфокаїну, але виявляє аналептичну активність у значно нижчій дозі.

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. Т. 1 / М. Д. Машковский. – Москва, 2014. – 1216 с.
2. *Шабанов А. Н.* Справочник фельдшера / А. Н. Шабанов. – Москва : Медицина, 1976. – 678 с.
3. *Дрогвоз С. М.* Фармакологія на ладонях / С. М. Дрогвоз, К. Г. Щокина // Справочник. – Харьков : Плеяда, 2016. – 112 с.
4. Електронний ресурс, режим доступу: http://compendium.com.ua/search_full.
5. Електронний ресурс, режим доступу: http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec702.full?text_only=true.
6. *Лалим О. А.* Анестезия кетаминотом: побочные эффекты и их коррекция / О. А. Лалим // Бюллетень медицинских Интернет-конференций (ISSN 2224-6150). – 2014. –Т. 4, № 5. – 721 с.
7. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
8. *Deacon R. M.* Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments / R. M. Deacon // *Nature Protocols*. – 2006. – V. 1, № 2. – P. 936–946.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. В. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева [и др.] – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р. У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – Москва : ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
11. Заявка на патент на винахід: а 2017 06266 від 19.06.17 / Спосіб відбору субстанцій для цілеспрямованого пошуку оригінальних біологічно активних сполук з аналептичною активністю на моделі кетамінового наркозу / І. В. Кабачна, С. М. Дрогвоз, В. І. Кабачний – № а 2017 06266; заявл. 27.06.2017 № 264. – 13 с.
12. *Кабачна І. В.* Спосіб відбору субстанцій для цілеспрямованого пошуку оригінальних фармакологічно активних сполук аналептичної дії на моделі кетамінового наркозу: інформ. лист Укрмедпатентінформу МОЗ України № 240-2017 / І. В. Кабачна, С. М. Дрогвоз, В. І. Кабачний. – Київ, 2017. – 6 с.
13. *Прозоровский В. Б.* Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / Прозоровский В. Б. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва : Ремедиум, 2005. – С. 763–827.

І. В. Кабачна, С. М. Дрогвоз, В. І. Кабачний, Н. Ю. Палагіна

Дослідження аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів на моделі кетамінового наркозу

У світовій практиці анестезіології та реаніматології для пробудження пацієнта після наркозу використовують антагоністи наркозних препаратів – аналептики. Їхнє застосування спрямоване на зняття інтоксикації та зменшення побічних ефектів наркозу, пов'язаних з пригніченням центральної нервової системи. За останні 50 років асортимент аналептиків не поповнювався новими препаратами.

Мета дослідження – вивчення аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів (Гетерозиду-21) на моделі кетамінового наркозу.

Оцінку аналептичного (пробуджуючого) ефекту речовин проводили на самцях білих нелінійних мишей на моделі кетамінового наркозу. Препаратами порівняння були класичні аналептики – суль-

фокамфокаїн (СКК) і кордіамін, що стимулюють дихальний і судиноруховий центр довгастого мозку. Тварин рандомізували на 4 групи (n = 5–23): контрольна (кетамін) та експериментальні (кетамін + Гетерозид-21, кетамін + СКК, кетамін + кордіамін). Досліджувані речовини та препарати порівняння вводили внутрішньоочеревинно на 15-й хв після входження тварин у третю фазу наркозу (знерухомлене бічне положення з рівномірним уповільненням диханням).

Ефективність досліджуваних речовин оцінювали за тривалістю наркозу. Вплив на дихальний центр визначали за частотою дихальних рухів на 1 хв у різних фазах наркозного сну, до та після введення пробуджуючих препаратів. Частоту дихання враховували протягом 60 с, починаючи з прийняття мишами бокового положення, останній замір здійснювали після повного пробудження (прийняття положення на чотирьох лапах).

Отримані результати свідчать про те, що Гетерозид-21 прискорював пробудження тварин на 11,83 % відносно контролю, сульфокамфокаїн – на 13,0 %, а кордіамін – на 7,02 %. Гетерозид-21 у дозі, у 20 разів меншій за дозу СКК, не поступався йому за ефективністю, а в дозі, у 63 рази меншій, ніж кордіамін, скорочував тривалість наркозу в 1,7 разу.

Таким чином, експериментально підтверджено, що модель кетамінового наркозу дозволяє кількісно оцінювати пробуджуючу (аналептичну) дію оригінальних субстанцій (гетерозидів) і класичних аналептиків, а також їхній вплив на дихальний центр головного мозку. Встановлено, що гетерозиди (похідні сірко- та азотвмісних гетероциклів) є перспективними для пошуку оригінальних аналептиків.

Ключові слова: гетерозид, наркоз, кетамін, аналептики, пробуджуючий ефект, частота дихання

И. В. Кабачная, С. М. Дроговоз, В. И. Кабачный, Н. Ю. Палагина **Исследование аналептической активности производного серо- и азотсодержащих гетероциклов на модели кетаминового наркоза**

В мировой практике анестезиологии и реаниматологии для пробуждения пациента после наркоза используют антагонисты наркотических препаратов – аналептики. Их применение направлено на снятие интоксикации и уменьшение побочных эффектов наркоза, связанных с угнетением центральной нервной системы. За последние 50 лет ряд аналептиков не пополнялся новыми препаратами.

Цель исследования – изучение аналептической активности производного серо- и азотсодержащих гетероциклов (Гетерозида-21) на модели кетаминового наркоза.

Оценку аналептического (пробуждающего) эффекта вещества проводили на самцах белых нелинейных мышей на модели кетаминового наркоза. Препаратами сравнения были классические аналептики – сульфокамфокаин (СКК) и кордиамин, стимулирующие дыхательный и сосудодвигательный центр продолговатого мозга. Животных рандомизировали на 4 группы (n = 5–23): контрольная (кетамин) и экспериментальные (кетамин + Гетерозид-21, кетамин + СКК, кетамин + кордиамин). Исследуемые вещества и препараты сравнения вводили внутривентриально на 15-й мин после входжения животных в третью фазу наркоза (обездвиженное боковое положение с равномерным замедленным дыханием).

Эффективность исследуемых веществ оценивали по длительности наркоза. Влияние на дыхательный центр определяли одновременно по частоте дыхательных движений в 1 мин в разных фазах наркозного сна до и после введения пробуждающих препаратов. Частоту дыхания учитывали на протяжении 60 с, начиная с принятия мышами бокового положения, последний замер осуществляли после полного пробуждения (принятие положения на четырех лапах).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Гетерозид-21 ускорял пробуждение животных на 11,83 % по отношению к контролю, сульфокамфокаин – на 13,0 %, а кордиамин – на 7,02 %. Гетерозид-21 в дозе, в 20 раз меньшей не уступал в эффективности СКК, а в дозе, в 63 раза меньшей, чем кордиамин, сокращал длительность наркоза в 1,7 раза.

Таким образом, экспериментально подтверждено, что модель кетаминового наркоза позволяет количественно оценивать пробуждающее (аналептическое) действие оригинальных субстанций (гетерозидов) и классических аналептиков, а также их влияние на дыхательный центр головного мозга. Установлено, что гетерозиды (производные серо- и азотсодержащих гетероциклов) являются перспективными для поиска оригинальных аналептиков.

Ключевые слова: гетерозид, наркоз, кетамин, аналептики, пробуждающий эффект, частота дыхания

I. V. Kabachna, S. M. Drohovor, V. I. Kabachnyy, N. Yu. Palagina **Analeptic activity investigation of the derivative of sulfur and nitrogen containing heterocycles on the model of ketamin anesthesia**

In the world practice of anesthesiology and intensive care treatment for the awakening of a patient after anesthesia, antagonists of anesthetic drugs, analeptics are used. Their application is aimed the intoxication withdrawal and reducing the side effects of anesthesia associated with CNS depression. Over the past 50 years, a number of analeptics have not been replenished with new drugs.

The aim of the study was to investigate the analeptic activity of the of sulfur- and nitrogen-containing heterocycles derivative (Heterozide-21) on the model of ketamine anesthesia.

Evaluation of the analeptic (awakening) effect of the substances was carried out on male white nonlinear mice on the model of ketamine anesthesia. Comparison drugs were classical combined analeptics – sulfocamphocaine (SCC) and cordiamine, stimulating the respiratory and vasomotor centers of the medulla oblongata. The animals were randomized into 4 groups (n = 5–23): control (ketamine) and experimental (ketamine + heterozide, ketamine + reference preparations). The test and reference substances were injected intraperitoneally at the 15-th minute after the animals entered the third phase of anesthesia (immobilized lateral position with uniform slowed breathing).

The efficacy of the test substances was evaluated by duration of anesthesia. Influence on the respiratory center was determined by the frequency of respiratory movements per minute in different phases of anesthetic sleep before and after the introduction of awakening drugs. The respiration rate was taken into account for 60 seconds, starting when the animals take the lateral position, the last measurement was made after full awakening (the position on the four paws).

The results obtained indicate that Heterozide-21 accelerated the awakening of animals by 11,83 % in relation to control, SCC by 13,0 %, and niketamide by 7,02 %. Heterozide-21 in a dose of 20 times smaller than the sulfocamphocaine, has no difference in efficiency and in a dose of 63 times less than cordiamine, reduced the duration of anesthesia by 1,7 times.

Thus, it has been experimentally confirmed that the model of ketamine anesthesia allows the quantitative assessment of the awakening (analeptic) effect of the original substances (heterozides) and classical analeptics, as well as their effect on the respiratory center of the brain. It has been established that heterozides (derivatives of sulfur- and nitrogen-containing heterocyclic systems) are promising for the search for original analeptics.

Key words: heterozide, anesthesia, ketamine, analeptics, awakening effect, respiratory rate

Надійшла: 8 серпня 2017 р.

Контактна особа: Кабачна Ірина Володимирівна, аспірант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 4, вул. Валентинівська, м. Харків, 61168. Тел.: + 38 0 67 998 88 11. Електронна пошта: dr.kabachnaya@gmail.com

Т. М. Криворучко

Оцінка спектра антипаркінсонічної дії гліцину сумісно з амантадином у щурів за умов екстрапірамідних порушень

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», м. Дніпро

Ключові слова: амантадин, гліцин, паркінсонічний синдром, поведінка, м'язовий тонус, орієнтовно-дослідницька активність

Відомо, що екстрапірамідними порушеннями традиційно називають рухові розлади, котрі зумовлені ураженням базальних гангліїв чи структур, пов'язаних з ними, які входять до складу екстрапірамідної системи. Класифікація екстрапірамідних розладів включає як екстрапірамідні синдроми, так і екстрапірамідні захворювання. До останніх відносять хвороби, які вибірково уражають базальні ганглії та переважно проявляються екстрапірамідними синдромами (наприклад, хвороба Паркінсона (ХП), або есенціальний тремор). ХП, перш за все, характеризується акінезією (гіпокінезією) чи ригідністю (акінетико-ригідний синдром), до яких часто додаються тремор спокою та постуральна нестійкість. Близько 80 % випадків паркінсонізму становить власне ХП, яка клінічно характеризується однобічними чи асиметричними симптомами на початку захворювання, вираженою реакцією на засоби леводопи, наявністю тремору спокою (по типу «скатування пілюль») та патоморфологічними змінами – дегенерацією нейронів чорної субстанції з формуванням у неуражених нейронах внутрішньоклітинних включень – тілець Леві [1, 2].

Одним з лікарських засобів, з яких починають лікування паркінсонізму, є амантадин. Цей засіб сприяє утворенню дофаміна, зменшуючи його зворотний захват. За цих умов спостерігається захист нейронів чорної субстанції за рахунок блокади глутаматних рецепторів. Тому для корекції модельованих

екстрапірамідних порушень, що відповідають паркінсонічному синдрому, як засіб базової терапії вважали за доцільне застосувати амантадин. Важливо зазначити, що паркінсонічний синдром це не тільки порушення екстрапірамідної системи. Так, у 70–80 % випадків у хворих спостерігаються нейротропні розлади, а саме, порушення сну, депресія, когнітивний дефіцит та ін. Близько половини хворих на ХП без деменції мають легкі когнітивні розлади навіть на ранніх стадіях захворювання, а інколи навіть мнестичний дефіцит. Це, зокрема, порушення виконавчих (планування та оперативної пам'яті), візуально-просторових та мовних функцій [3]. Існує широкий вибір препаратів ноотропної дії, які використовують для зменшення та усунення когнітивного дефіциту, але далеко не всі вони є безпечними [4]. Гліцин проявляє м'який психостимулюючий вплив, поліпшує кровообіг мозку, внаслідок нормалізації рівня ГАМК має протисудомні та антигіпоксичні властивості, показаний у разі зниження пам'яті після травми, інсульту, на фоні хронічних захворювань тощо. Тому вибір оптимального засобу для зменшення проявів когнітивного дефіциту на фоні антипаркінсонічної терапії є, на наш погляд, дуже важливим та актуальним. Раніше нами було показано антипаркінсонічну дію гліцину сумісно з амантадином на прояви катаlepsії в щурів і тремору в мишей [5], але залишається невизначеною можливість корекції поведінкових реакцій та сили м'язового тонусу в щурів за формування екстрапірамідних порушень, а саме, «дофамінової патології».

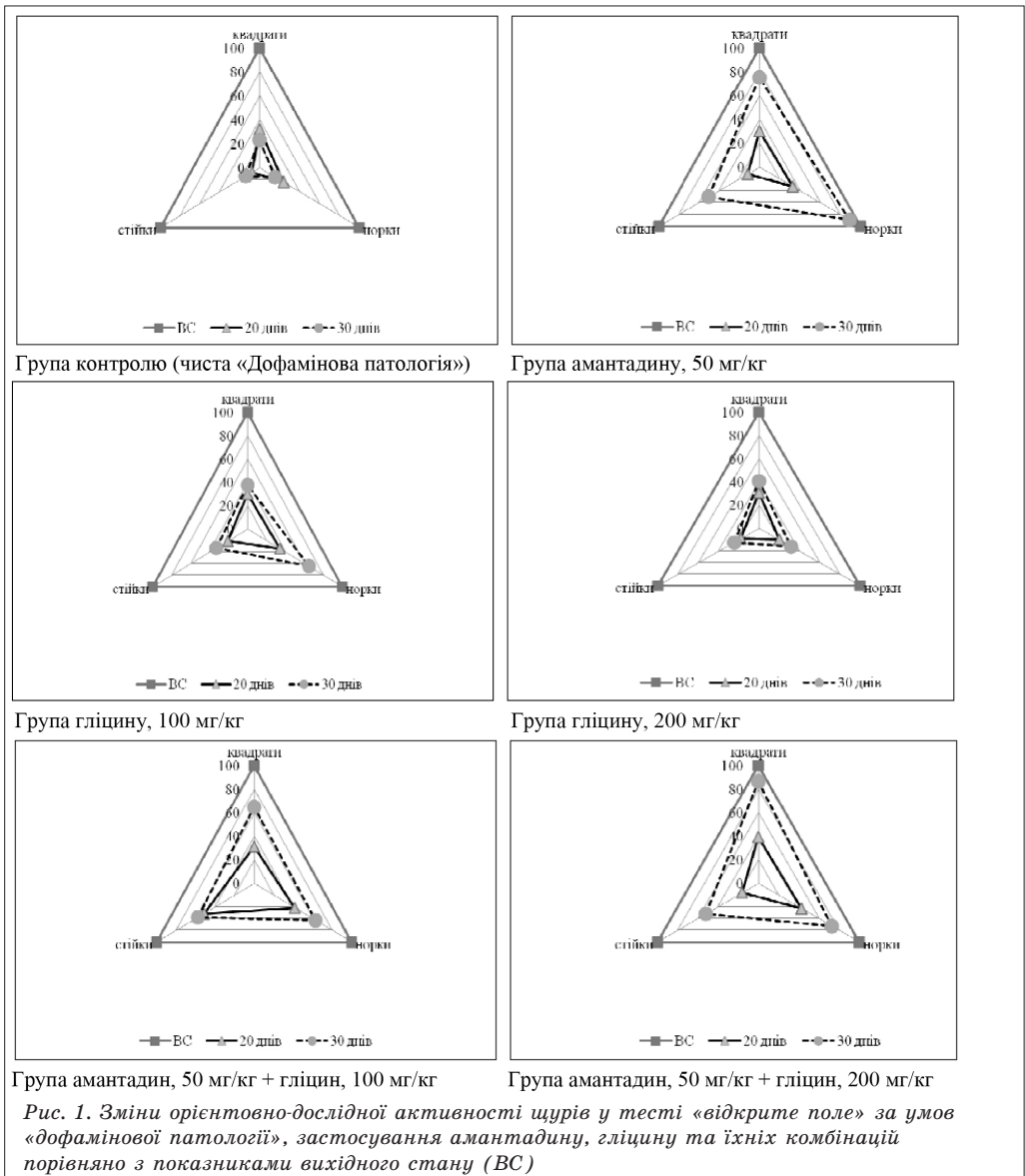
Мета дослідження – вивчити вплив гліцину сумісно з амантадином на прояви орієнтовно-дослідницької активності

в тесті «відкрите поле» та м'язову силу в щурів за умов екстрапірамідних порушень, викликаних введенням галоперидолу.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на 60 білих безпородних щурах, масою 270–310 г, яких утримували за стандартних умов віварію Дніпропетровської медичної академії МОЗ України [6]. Тварин розділили на 6 дослідних груп (по 10 тварин у кожній групі), у яких моделювали «дофамінову патологію» – експериментальний паркінсонічний синдром: I група – контроль (чиста «дофамінова патологія» (ДП); II група отримувала амантадин

(А) у дозі 50 мг/кг; III група – гліцин у дозі 100 мг/кг (Г100); IV група – гліцин у дозі 200 мг/кг (Г200); V група – А + Г100; VI – А + Г200.

ДП формували введенням внутрішньоочеревинно галоперидолу (Gedeon Richter) у дозі 0,5 мг/кг протягом 30 днів; останні 10 днів вводили амантадин, гліцин та їхні комбінації. Зміни поведінки та м'язового тонусу оцінювали у вихідному стані (BC), на 20 добу (максимальні прояви гіпокінезії, зменшення емоційних проявів, зниження м'язової сили тощо) та через 10 днів введення дослідних лікарських засобів та їх комбінацій на фоні пролонгації

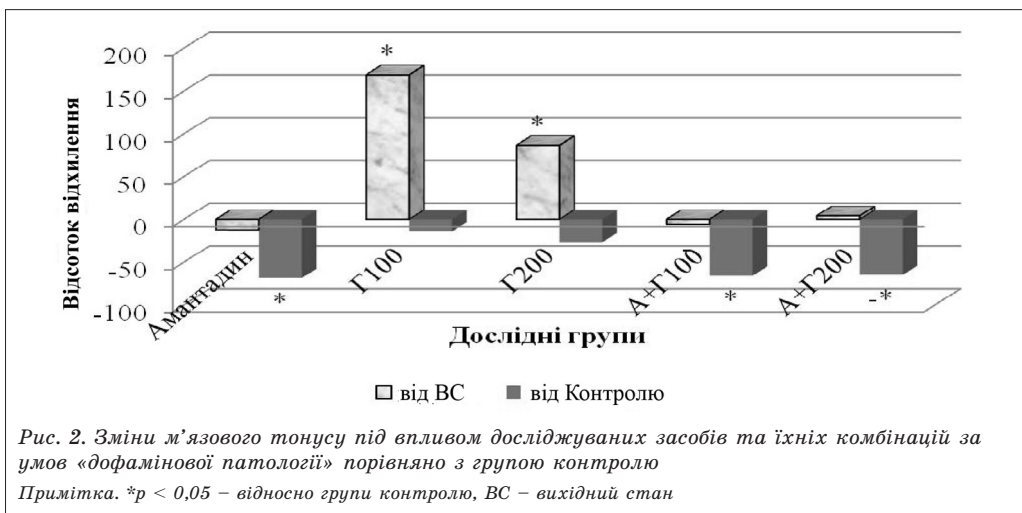


галоперидолом змін екстрапірамідної системи [7]. Поведінку тварин вивчали в тесті «відкрите поле», рівень рухової активності характеризували за кількістю перетнутих квадратів, дослідницької – за кількістю заглядань і вертикальних стійок, емоційний стан оцінювали за кількістю активів грумінгу та болюсів. Також оцінювали стан м'язового тону в тесті «міорелаксація» [8]. Дані експериментального дослідження обробляли за допомогою комп'ютера (Intel Pentium IV, програма Excel 2000) з розрахунком середніх значень, сигнальних відхилень та t-критерію Стьюдента [9].

Результати та їх обговорення. У тесті «відкрите поле» у вихідному стані поведінка тварин характеризувалась як дуже активна: кількість перетнутих квадратів коливалась від $(28,80 \pm 1,80)$ (група I) до $(33,40 \pm 3,03)$ (група III); кількість стійок – від $(6,38 \pm 1,72)$ (група I) до $(10,0 \pm 2,63)$ (група VI). Дослідницька активність (кількість заглядань у нірки) знаходилась у межах від $(6,88 \pm 0,91)$ (група II) до $(8,38 \pm 1,38)$ (група V). Показано, що на фоні 20-денного отримання галоперидолу кількість перетнутих квадратів знизилась на 60,1 % ($p < 0,05$) у групі А + Г200 та на 70,1 % ($p < 0,05$) у групі Г100 порівняно з показниками вихідного стану. Кількість стійок коливалась у межах від $(0,50 \pm 0,63)$ (група I) до $(4,0 \pm 0,50)$ (група V), що порівняно з показниками вихідного стану відповідало зниженню на 92,16 % ($p < 0,05$)

та на 48,4 % ($p < 0,05$) відповідно. У цілому, тварини характеризувалися загальною загальмованістю: їм було важко пересуватися на просторі тестової установки «відкрите поле».

Після 10-денного застосування амантадину, гліцину в різних дозах (100 та 200 мг/кг) та їхніх комбінацій відмічено, що в деяких групах збільшилася рухова активність: так, кількість перетнутих квадратів складала від $(11,80 \pm 2,06)$ (група III) до $(25,80 \pm 2,25)$ (група VI), що порівняно з показниками вихідного стану складало зниження на 62,3 % ($p \leq 0,05$) та на 35,6 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 2). Вертикальна активність також збільшилася порівняно з показниками 20-денного отримання галоперидолу. Кількість стійок залишалась зниженою на 66,6 % ($p < 0,05$) та 75,35 % ($p \leq 0,05$) у тварин групи III та групи IV відповідно порівняно з вихідним станом. Проте на фоні застосування амантадину та А + Г200 показники вертикальної активності порівняно з показниками 20-денного терміну експерименту збільшилися в 4,3 ($p \leq 0,05$) та 3,2 ($p \leq 0,05$) рази відповідно. Слід зазначити, що на 30 день експерименту поведінка тварин групи контролю залишалась більш пригніченою порівняно з показниками 20-го дня експерименту та показниками вихідного стану (рис. 1). Відбулося зниження рухової активності (кількість перетнутих квадратів) у 4,6 рази ($p \leq 0,05$) та вертикальних підйомів у 7,25 ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками вихідного стану. Залишалися



зниженими показники кількості актів грумінгу та дефекацій, проте для груп V та VI ці параметри співпадали з показниками вихідного стану.

Показано, що під впливом 20-денного застосування галоперидолу (0,5 мг/кг) значно збільшувався показник м'язового тону (рис. 2). У вихідному стані час, протягом якого щури «зависали» на спеціальному пруті, складав від (9,38 ± 2,20) с (група III) до (11,50 ± 2,25) с (група IV). Наприкінці 20-го дня експерименту, коли розпочинали введення амантадину та гліцину, цей показник збільшився майже в 1,9–2,1 разу для всіх дослідних груп. Проте після 10-денного застосування досліджуваних препаратів та їхніх комбінацій реєстрували зниження м'язового тону майже до показників вихідного стану, зокрема, у групах амантадину та

його комбінацій з гліцином А + Г100 та А + Г200. У контрольній групі м'язовий тонус на 30-й день введення галоперидолу залишався збільшеним у 2,77 разу порівняно з показниками вихідного стану.

Висновок

Отримані результати дослідження обґрунтовують рекомендацію щодо можливості використання гліцину як додаткового ноотропного засобу на фоні антипаркінсонічної терапії амантадином. У подальшому планується вивчити особливості механізму дії гліцину в комбінації з амантадином у щурів з паркінсонізмом, модельованим нейротоксином МФТП (N-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридином), та фармакокінетичну взаємодію гліцину та амантадину за сумісного застосування.

1. Голубев В. Л. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма / В. Л. Голубев, Я. И. Левин, А. М. Вейн. – Москва : МЕДпресс, 1999. – 416 с.
2. Экстрапирамидные расстройства: руководство по диагностике и лечению; под ред. В. Н. Штока, И. А. Ивановой-Смоленской, О. С. Левина. – Москва : МЕДпресс-информ, 2002. – 608 с.
3. Adler C. H. Nonmotor complications in Parkinson's disease / C. H. Adler // *Mov Disord.* – 2005. – V. 20, Suppl 11. – P. 23–29.
4. Correlations between plasma levels of amino acids and nonmotor symptoms in Parkinson's disease / Tong Q., Xu Q., Xia Q [et al.] // *J. Neural Transm (Vienna).* – 2015. – № 122 (3). – P. 411–417.
5. Макаренко О. В. Експериментальна оцінка нейротропних ефектів протипаркінсонічного засобу амантадину та гліцину у інтактних тварин / О. В. Макаренко, Т. М. Криворучко / Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.», Львів, 26-27 травня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 97–100.
6. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайретдинова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 155 с.
7. Алгоритм доклінічної оцінки (загальна фармакологія, специфічна активність) антипаркінсонічних засобів. Методичні рекомендації / В. Й. Мамчур, О. В. Макаренко, С. М. Дронов. – Київ, 2009. – 21 с.
8. Калуев А. В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных) / А. В. Калуев. – Киев : Энигма, 1998. – 96 с.
9. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2001. – 408 с.

Т. М. Криворучко

Оцінка спектра антипаркінсонічної дії гліцину сумісно з амантадином у щурів за умов екстрапірамідних порушень

Екстрапірамідні порушення часто є основними клінічними проявами деяких захворювань, у тому числі хвороби Паркінсона. Важливо відмітити, що паркінсонізм це не тільки рухові порушення, але й комплекс супутніх змін психічної діяльності, а саме: порушення уваги, пам'яті, когнітивний дефіцит, депресія, порушення сну та ін.

Мета дослідження – вивчити вплив гліцину сумісно з амантадином на прояви орієнтовно-дослідницької активності в тесті «відкрите поле» та м'язову силу в щурів за умов екстрапірамідних порушень, викликаних введенням галоперидолу. Вивчали дослідницьку та рухову активність тварин у тесті «відкрите поле» та зміни м'язової сили в динаміці експерименту на тлі використання амантадину (А, 50 мг/кг), гліцину в дозах 100 мг/кг (Г100) і 200 мг/кг (Г200) та їхніх комбінацій.

Встановлено, що найефективнішою комбінацією є А + Г200, позитивну динаміку спостерігали за показниками рухово-дослідної активності та м'язової сили. Так, у тесті «відкрите поле» показники рухової активності повернулися до вихідних значень, а дослідницька активність залишалась незнач-

но зниженою. М'язовий тонус повернувся до показників вихідного стану в усіх групах, яким застосовували амантадин.

Отримані експериментальні результати є обґрунтуванням для подальшого вивчення можливості використання гліцину сумісно з амантадином за умов експериментального еквіваленту паркінсонізму на моделі змішаної форми хвороби Паркінсона, викликаній нейротоксином МФТП у щурів.

Ключові слова: амантадин, гліцин, паркінсонічний синдром, поведінка, м'язовий тонус, орієнтовно-дослідницька активність

Т. Н. Криворучко

Оценка спектра антипаркинсонического действия глицина совместно с амантадином у крыс в условиях экстрапирамидных нарушений

Экстрапирамидные нарушения часто являются основными клиническими проявлениями некоторых заболеваний, в том числе болезни Паркинсона. Важно отметить, что паркинсонизм это не только двигательные нарушения, но и комплекс сопутствующих изменений психической деятельности, а именно: нарушение внимания, памяти, когнитивный дефицит, депрессия, нарушения сна и т. д.

Цель исследования – изучить влияние глицина совместно с амантадином на проявление ориентировочно-исследовательской активности в тесте «открытое поле» и мышечную силу у крыс в условиях экстрапирамидных нарушений, вызванных введением галоперидола. Изучены исследовательская и двигательная активность у животных в тесте «открытое поле» и изменения мышечного тонуса в динамике эксперимента на фоне применения амантадина (А, 50 мг/кг), глицина в дозе 100 мг/кг (Г100) и 200 мг/кг (Г200) и их комбинаций. Установлено, что наиболее эффективной комбинацией является А + Г200, при этом положительную динамику наблюдали по показателям двигательной-исследовательской активности и мышечного тонуса. Так, в тесте «открытое поле» показатели двигательной активности вернулись к исходным значениям, а исследовательская активность оставалась незначительно сниженной. Мышечный тонус вернулся к показателям исходного состояния у всех групп, которым применяли амантадин.

Полученные экспериментальные данные являются обоснованием для дальнейшего изучения возможности использования глицина совместно с амантадином в условиях экспериментального эквивалента паркинсонизма на модели смешанной формы болезни Паркинсона, вызванной нейротоксином МФТП у крыс.

Ключевые слова: амантадин, глицин, паркинсонический синдром, поведение, мышечный тонус, ориентировочно-исследовательская активность

Т. М. Kryvoruchko

Evaluation of the antiparkinson's effects of glycine compatible with amantadine in rats under extrapyramidal disorders

Extrapyramidal disorders are the main clinical manifestations of Parkinson's disease. It is important to note that Parkinson's disease is also manifested as a complex of accompanying changes in mental activity – impaired attention and memory, cognitive deficits, depression, sleep disorders, etc.

The aim of the research – to study the influence of glycine and combinations of glycine with amantadine on the phenomenological manifestations of Parkinson's disease in animals on the model of «dopamine pathology», induced by haloperidol.

We studied the exploratory and motor activity of rats in the «open field» test, the changes in muscle tone in the dynamics of the experiment, using amantadine (50 mg/kg) and glycine at doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg and their combinations.

It was found that the most effective is amantadine and glycine combination at dose 200 mg/kg for a long course of therapy due to positive dynamics in the parameters of motor-exploratory activity and the changes in muscle tone. The indices of motor activity in the «open field» test returned to the initial background. The indices of exploratory activity remained slightly reduced. Muscle tone returned to the baseline in all groups where Amantadine was used.

The experimental data obtained are the basis for further study of the use of glycine together with amantadine under the experimental equivalent of Parkinson's under the mixed-form model of Parkinson's disease caused by the MPTP neurotoxin in rats.

Key words: amantadine, glycine, parkinsonian syndrome, behavior, muscle tone, exploratory and motor activity

Надійшла: 29 серпня 2017 р.

Контакти: Криворучко Т. М., кафедра фармакології та клінічної фармакології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», буд. 9, вул. Володимир Вернадського, м. Дніпро, 49044. Тел.: + 38 056 713 52 57.

В. Б. Ларіонов, М. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінів – алостеричних модуляторів ГАМК-рецептора

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

Ключові слова: похідні 1,4-бенздіазепіну, докінг, спектр фармакологічної дії, ГАМК-рецептор

Фармакологічна дія лікарських засобів обумовлена їхньою фізико-хімічною або хімічною взаємодією з біологічними мішенями (рецепторами, ферментами, переносниками тощо). Послідовність положення атомів, просторова конфігурація молекули, величина та розташування зарядів, рухливість її фрагментів одного відносно іншого визначають міцність зв'язку і, тим самим, силу та тривалість фармакологічної дії. Молекула лікарської речовини в більшості випадків має незначний розмір порівняно з біологічною мішенню, тому вона може з'єднуватися тільки з невеликим фрагментом макромолекули. У цьому разі має місце утворення координаційних, водневих, Ван-дер-Ваальсових зв'язків, комплексів з переносом заряду [1]. Ступінь та селективність зв'язування також безпосередньо пов'язані з реалізацією внутрішньої активності низькомолекулярних сполук. Саме тому навіть незначні зміни у структурі вихідної молекули можуть призводити до зменшення чи посилення, інверсії або повного нівелювання біологічних ефектів. Саме цей підхід використовується для створення нових фізіологічно-активних речовин – потенційних лікарських засобів [2].

В арсеналі сучасної клінічної фармакології нараховується декілька десятків представників похідних 1,4-бенздіазепіну, але в той самий час ведеться постійний пошук серед сполук цієї групи з новими біологічними властивостями. Класичними компонентами фармакологічного спектра похідних 1,4-бенздіазепіну є протисудомна, гіпнosedативна й анксиолітична дії та міорелаксація. Втім, пропосазепаму влас-

тивий значний болетамуючий та протисудомний ефекти з незначним проявом депримууючої дії [3]. На наш погляд, для пояснення отриманих експериментальних даних найреальнішим є використання підходів біоінформатики, зокрема, молекулярного докінгу. Цей підхід дає можливість моделювати рецептор-лігандну взаємодію та отримати інформацію щодо загальної енергії зв'язування (інтегральна кількісна характеристика утворення комплексу) та виявлення локалізації місць зв'язування окремими амінокислотами, що залучені до цього процесу. Зазначена інформація є важливою та цінною як для розуміння механізму дії вже відомих молекул, так і для подальшого конструювання структур з очікуваною біологічною активністю [4]. Зазвичай, при проведенні молекулярного докінгу використовують структури референтних сполук з відомими місцями зв'язування, на підставі чого є можливість валідувати отримані результати. Однак слід враховувати, що різні сполуки можуть мати різні місця зв'язування на макромолекулі, а загальний напрям цих процесів залежить від енергетичних, стеричних і конформаційних чинників [5–7].

Мета дослідження – оцінка рецепторно-лігандної взаємодії низки похідних 1,4-бенздіазепіну різного спектра фармакологічної дії на підставі даних молекулярного докінгу.

Матеріали та методи. Параметри молекулярного докінгу було розраховано за допомогою програми iGEMDOCK v2.1 [8, 9]. Біологічною мішенню був ГАМК_A-рецептор, кристалічну структуру якого (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) було отримано з бази даних біологічних макромолекул [(http://www.rcsb.org/)]. Фізико-хімічні влас-

тивості похідних 1,4-бенздіазепіну (площа полярної поверхні, показники ліпофільності (у системі октанол-вода, logP та октанол-фосфатний буфер, logD), величини молярної рефракції та константи іонізації отримані нами безпосередньо з баз даних та розраховані за допомогою програм ACD/Labs та MedChem Designer v. 2.0.0.34.

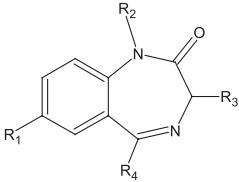
Розрахунок параметрів докінгу лігандів та рецептора проводили на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій (generations) гнучких конформацій ліганду (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Найвірогідніше з енергетичної точки зору рішення отримано з 4 послідовних наближень. Автоматична детекція центра зв'язування визначена параметрами локалізації референтного ліганду (benzamidine) [10]. Радіус центра зв'язування збільшено до 30 Å. Кластеризацію результатів докінгу здійснювали за процедурою K-середніх після попередньої оцінки топографії локалізації зв'язування досліджуваних сполук за величиною загальної енергії.

Досліджувані сполуки класифіковані у вигляді деревоподібної структури (ієрархічна кластеризація), де відношення до кожної «гілки» відбувалося відповідно до топографічного залучення та енергії зв'язку окремих залишків амінокислот. Аналіз порожнин та взаємне положення амінокислотних залишків у активних центрах рецептора здійснювали за програмою Mole 2.13.9.6.

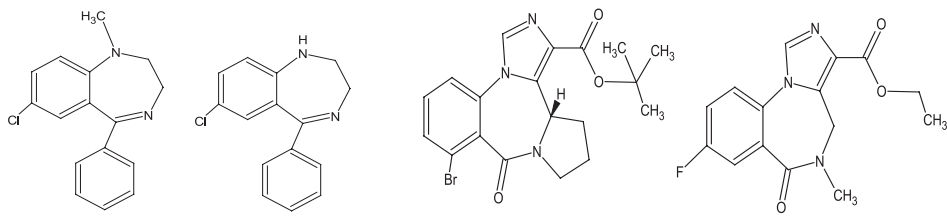
Результати та їх обговорення. Для процедури докінгу було обрано похідні 1,4-бенздіазепіну, що тривалий час використовуються в медичній практиці та є добре вивченими, а деякі з них мають активні метаболіти (табл. 1). Їхні структури різняться наявністю груп, які здатні до утворення різних типів зв'язків – електростатичних, водневих або Ван-дер-Ваальсових, оскільки їхні утворення з окремими групами центру зв'язування рецептора визначає силу й афінитет ліганду. Присутність полярних груп у молекулі не тільки змінює загальну величину площі полярної поверхні молекули (PSA), але й обумовлює загальну здатність молеку-

ли до електронної поляризуємості, тобто, набувати електричний дипольний момент в електричному полі, мірою якої є величина молекулярної (молярної) рефракції (MR) та характеристики ліпофільності сполук (розподіл у системі октанол-вода, logP за умов фізіологічного pH, logD, табл. 2). Вказані величини були розраховані за допомогою програм MedChem Designer та ACD/Labs. До сполук, що аналізували, було включено 3-алкоксипохідні – 3-пропілокси-7-бром-5(о-хлорфеніл)-1,4-бенздіазепін-2-он (пропексазепам) та 3-етокси-7-бром-5-феніл-1,4-бенздіазепін-2-он (етоксазепам). Також було використано сполуку з естерним зв'язком у положенні 3 гетерокільця (левана) та референтну сполуку фенілбенздіазепінон, що має типову для похідних 1,4-бенздіазепіну структуру та в якій відсутні інші замісники, а також медазепам, що не має полярної кетонної групи в положенні «2» у гетероциклі. Загалом вибірка сполук охоплювала не тільки найрепрезентативніші фізико-хімічні параметри, але й основні компоненти фармакологічного спектра. Незважаючи на те, що всі похідні 1,4-бенздіазепіну в тій чи іншій мірі проявляють близьку активність, кожний з препаратів має свій спектр фармакологічної дії. Так, бромазепам має седативний та міорелаксантийний ефект, клоназепам характеризується переважно антиепілептичною дією, медазепам – проявляє заспокійливу та транквілізуючу дію, тоді як міорелаксантийний ефект майже відсутній, нітразепам та його метаболічний прекурсор – німетазепам мають здебільшого снодійну дію, діазепам також виявляє седативну, міорелаксантийну та амнестичну дію та використовується як референтна сполука в біологічних та фармакологічних дослідженнях, а у фармакологічному спектрі феназепам значною мірою представлені майже всі компоненти. Лоразепам також проявляє властивості, притаманні похідним цього класу, але є найнаркогеннішим бенздіазепіном зі швидким розвитком звикання та подальшого синдрому відміни. Заміщені по положенню «3» гетерокільця бенздіазепіни представлені леваною

Структури похідних 1,4-бенздіазепіну, що використані в дослідженні



	№	R1	R2	R3	R4
3-гідроксибромазепам	I	Br	H	OH	-піридин-2-іл
3-гідроксифеназепам	II	Br	H	OH	o-Cl-феніл
Бромазепам	III	Br	H	H	-піридин-2-іл
Деметилдіазепам	IV	Cl	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Діазепам	V	Cl	CH ₃ -	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Етоксазепам	VI	Br	H	-O-CH ₂ -CH ₃	Феніл (C ₆ H ₅)
Клоназепам	VII	-NO ₂	H	H	o-Cl-феніл
Левана	VIII	Br	H	-OCO-(CH ₂) ₂ -COOH	o-Cl-феніл
Лоразепам	IX	Cl	H	H	o-Cl-феніл
Німетазепам	X	-NO ₂	CH ₃ -	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Нітразепам	XI	-NO ₂	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)
Оксазепам	XII	Cl	H	-OH	Феніл (C ₆ H ₅)
Пропоксазепам	XIII	Br	H	-O-(CH ₂) ₂ -CH ₃	o-Cl-феніл
Феназепам	XIV	Br	H	H	o-Cl-феніл
Фенілбенздіазепінон	XV	H	H	H	Феніл (C ₆ H ₅)



Medazepam XVI Demethylmedazepam XVII Bretazenil XVIII Flumazenil XIX

(естерний зв'язок, що легко піддається гідролізу з утворенням активного 3-гідроксипохідного) та алкоксипохідними – етоксазепамом та пропоксазепамом (естерний зв'язок є стабільним до гідролітичного розщеплення під дією неспецифічних тканинних естераз), фармакологічний ефект яких переважно представлений знеболюючою дією. Бретазеніл є імідазопіролбенздіазепіном з високою афінністю до бенздіазепінових рецепторів (парціальний агоніст, що зв'язується з усіма α -субодиницями бенздіазепінового рецептора), тоді як його близький аналог – флумазеніл є селективним антагоністом.

Окрім того, в експерименті використано структури, які утворюються за послідовної біотрансформації вихідної сполуки («феназепам – 3-гідроксифеназепам», «бромазепам – 3-гідроксибромазепам», «німетазепам – нітразепам», «медазепам – деметилмедазепам» та «діазепам – деметилдіазепам – оксазепам»).

Мірою здатності формування рецептор-лігандного комплексу є загальна енергія його утворення, яка для структур даної вибірки була в межах 75,8–112,5 ккал/моль. На підставі величини внесків кожної з взаємодій вони можуть бути віднесені відповідно до Ван-дер-Ваальсової (2,4–4,8 ккал/моль) взаємодії, водневого зв'язку (до 9,6 ккал/

Розраховані фізико-хімічні властивості похідних 1,4-бенздіазепіну

Назва		MR	PSA	LogP	logD	pK
3-гідроксибромазепам	I	76,40	74,58	1,274	1,274	-3,9 ± 0,2 2,0 ± 0,2 10,6 ± 0,7 12,3 ± 0,4
3-гідроксифеназепам	II	83,74	61,69	2,694	2,694	0,02 ± 0,50 10,8 ± 0,7 12,39 ± 0,40
Бретазеніл	XVIII	100,29	64,43	3,286	3,286	-2,6 ± 0,2 0,88 ± 0,20
Бромазепам	III	75,20	54,35	1,757	1,757	-3,9 ± 0,2 2,0 ± 0,2 11,4 ± 0,7
Деметилдіазепам	IV	74,92	41,46	2,751	2,751	3,4 ± 0,1 11,72 ± 0,70
Деметилмедазепам	XV		24,39	3,586	3,565	-2,35 ± 0,40 6,18 ± 0,10
Діазепам	V	79,09	15,6	3,570	3,570	-5,83 ± 0,40 3,4 ± 0,1
Етоксазепам	VI	88,43	50,69	3,005	3,005	3,01 ± 0,50 10,81 ± 0,70
Флумазеніл	XIX	77,59	64,55	-0,002	-0,002	-2,97 ± 0,20 0,81 ± 0,20
Клоназепам	VII	81,25	70,21	3,159	3,159	1,6 ± 0,3 11,2 ± 0,7
Левана	VIII	103,78	105,06	2,901	0,487	0,43 ± 0,50 4,25 ± 0,17 10,0 ± 0,7
Лоразепам	IX	80,92	61,69	2,596	2,596	0,03 ± 0,50 10,8 ± 0,7 12,4 ± 0,4
Медазепам	XVI	80,85	15,6	3,905	3,885	-0,43 ± 0,40 6,18 ± 0,10
Німетазепам	X	82,33	78,49	2,119	2,119	-9,34 ± 0,40 3,19 ± 0,10
Нітразепам	XI	76,64	70,21	2,671	2,671	3,19 ± 0,10 11,35 ± 0,70
Оксазепам	XII	76,20	64,85	3,073	1,591	1,68 ± 0,50 10,94 ± 0,70 12,45 ± 0,40
Феназепам	XIV	82,54	41,46	3,296	3,296	1,74 ± 0,25 11,58 ± 0,70
Фенілбенздіазепінон	XV	70,11	41,46	2,173	2,172	-4,8 ± 0,4 3,62 ± 0,50 12,7 ± 0,7
Пропоксазепам	XIII	97,76	50,69	3,962	3,962	1,2 ± 0,5 10,65 ± 0,70

моль) та електростатичної взаємодії. Втім, електростатична взаємодія виявлена лише для нітразепаму, як більш полярної молекули, та вона не перевищує 1,1 ккал/моль (табл. 3). Представленість водневого зв'язку для даних сполук також є різною та визначається від ~2 % до ~30 % від величини загальної енергії утворення. Найбільший внесок водневих зв'язків визначається серед сполук з полярними групами, які містять електронегативні елементи та рухомий атом водню (гідрокси- та нітропохідні) (табл. 3). Наявність електростатичних зв'язків здебільшого можлива між іонізованими сполуками, але з наведених величин констант іонізації (pK_a , табл. 2) помітно, що лише медазепам, його метаболіт – деметилмедазепам та левана здатні існувати в іонізованому вигляді за умов фізіологічного рН. Однак це позначається лише на здатності левани до утворення

водневих зв'язків (22,6 ккал/моль). Ймовірно, ця невідповідність обумовлена тим, що алгоритм розрахунку не враховує здатність сполук до іонізації та підвищення полярності молекул. Окремо слід зазначити, що розраховані величини ліпофільності для медазепаму та деметилмедазепаму є досить близькими (табл. 1), та лише для левани спостерігається значна різниця, що відповідає емпіричним даним, тому вплив можливої іонізації для зазначених молекул слід визнати незначним.

Найбільший внесок в утворення зв'язку між проаналізованими лігандами та рецептором здійснюється за рахунок Ван-дер-Ваальсових взаємодій (71–99 %), що є цілком очікуваним, беручи до уваги присутність ароматичних структур та здатних до поляризації атомів галогенів у похідних 1,4-бенздіазепіну.

Візуалізація та групування (кластеризація за локалізацією місця зв'язу-

Таблиця 3

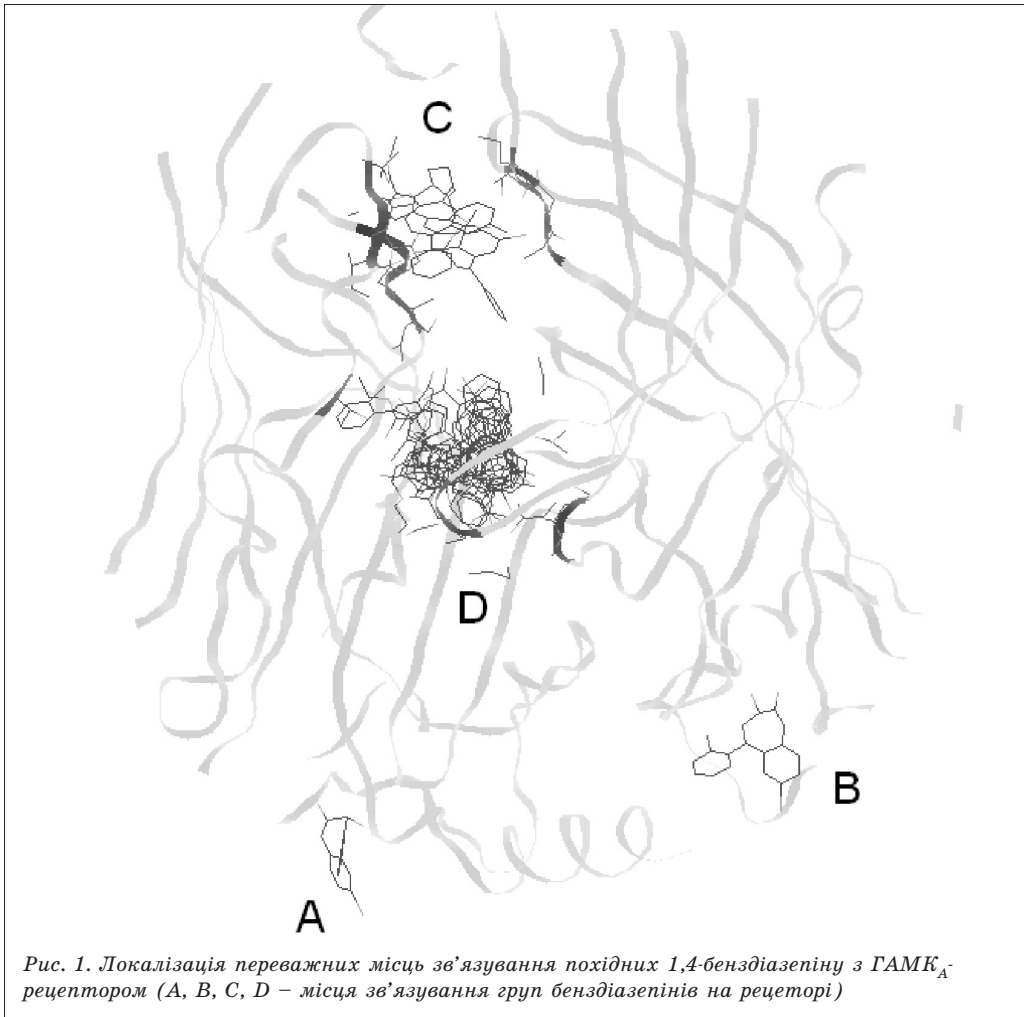
Розраховані величини загальної енергії зв'язування (водневих зв'язків, Ван-дер-Ваальсової та електростатичної взаємодії) похідних 1,4-бенздіазепіну с ГАМК_A-рецептором

Ліганд	Загальна енергія зв'язування, ккал/моль	Ван-дер-Ваальсова взаємодія		Водневі зв'язки	
		ккал/моль	%	ккал/моль	%
3-Гідроксибромазепам	-90,1	-70,8	78,6	-19,3	21,4
3-Гідроксифеназепам	-86,9	-66,4	76,4	-20,4	23,5
Бретазеніл	-86,2	-68,2	79,1	-17,9	20,8
Бромазепам	-92,7	-79,0	85,2	-13,7	14,8
Клоназепам	-97,9	-72,9	74,5	-24,9	25,4
Деметилдіазепам	-86,9	-85,6	98,5	-1,4	1,6
Деметилмедазепам	-88,8	-79,8	89,9	-9,1	10,2
Діазепам	-84,6	-75,4	89,1	-9,2	10,9
Етоксазепам	-81,6	-71,8	88,0	-9,9	12,1
Флумазеніл	-92,0	-68,1	74,0	-23,8	25,9
Левана	-80,0	-57,3	71,6	-22,6	28,3
Лоразепам	-91,0	-86,0	94,5	-5,0	5,5
Медазепам	-89,1	-82,1	92,1	-7,0	7,9
Німетазепам	-96,1	-92,1	95,8	-4,0	4,2
Нітразепам	-112,5	-77,6	69,0	-33,8	30,0
Оксазепам	-101,9	-80,6	79,1	-21,3	20,9
Феназепам	-90,4	-85,2	94,2	-5,3	5,9
Фенілбенздіазепінон	-88,9	-82,1	92,4	-6,8	7,6
Пропоксазепам	-75,8	-70,3	92,7	-5,6	7,4

вання) результатів докінгу похідних 1,4-бенздіазепіну дозволила виявити принаймні чотири місця зв'язування (рис. 1, групи А–D). Для переважної кількості сполук вибірки (14 структур, кластер D) ідентифіковано єдине місце зв'язування, хоча за розташуванням у просторі цієї порожнини сполуки значно різняться, тому емпірично неможливо визначити, які структурні елементи зумовлюють їхню відповідну орієнтацію відносно функціональних груп рецептора. Для частини молекул (бретазеніл, діазепам, оксазепам, кластер C), місце зв'язування локалізується на відстані близько 7–8 Å від першого центру. Виявлено, що 3-гідроксибромазепам та 3-гідроксифеназепам, незважаючи на близькість їхньої структури, мають окремі місця зв'язування (кластери А та В), які розраховані, виходячи

з геометричних характеристик та можливості утворення зв'язків між залишками амінокислот та функціональними групами сполук.

Для компонентів другого локального кластеру (бретазеніл, діазепам, етоксазепам) визначені 11 залишків амінокислот, що беруть участь у взаємодії (табл. 4), хоча, зважаючи на значну різницю в енергії зв'язків та різне положення лігандів у цій порожнині, можна зазначити, що вони не є специфічними для зв'язування залишків з цим сайтом. Більш того, ці сполуки мають різний фармакологічний спектр дії – сполука-лідер цього кластеру (бретазеніл) майже не викликає таких побічних дій, як амнезія та втрата координації руху, тоді як у фармакологічному спектрі діазепаму присутні міорелаксантні та амнестичні компоненти. Етоксазепам, що значно



**Компоненти третього кластеру взаємодії похідних
1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-рецепторним комплексом
(M – головний (main) ланцюг S – бічний (side) ланцюг)**

Сполука	Бретазеніл	Діазепам	Етоксазепам
Енергія, ккал/моль	-86,2	-84,6	-81,6
S-Lys-102	-3,5	-	-
S-Ser-46	-	-	-3,4
M-Ile-47	-7,0	-3,3	-3,5
M-Asp-48	-7,4	-2,4	-
S-Asp-48	-	-	-2,9
M-Glu-182	-	-3,5	-
M-Asn-54	-5,0	-2,0	-1,8
M-Asn-100	-	-	-4,7
S-Lys-102	-3,2	-0,3	-4,2
M-Ala-135	-1,0	-3,0	-4,8
M-Cys-136	-0,9	-4,2	-2,7
S-Met-137	-3,3	-7,5	-4,6
M-Ser-46	-0,3	-4,4	-4,9
M-Asp-48	-11,6	-6,4	-5,8
S-Asp-48	-2,6	-0,3	-5,6
M-Met-49	-8,3	-1,4	-0,8
S-Met-49	-4,3	-0,2	-
M-Val-50	-5,1	-	-
S-Arg-180	-	-0,7	-
M-Glu-182	-3,0	-8,4	-3,9
S-Pro-184	-5,8	-2,4	-

різняється від попередників, навпаки, характеризується переважно знеболюючою дією. Тому можливим є те, що зазначений сайт не є індивідуальним, а зв'язування з ним може мати неспецифічний характер.

Більшу увагу привертає до себе центр зв'язування, що є спільним для 14 сполук з вихідної вибірки (табл. 5). У формуванні зв'язків цього центру бере участь загалом 29 залишків амінокислот, хоча близько 80 % представників цього кластеру зв'язуються лише з 13–15 амінокислотними залишками.

Аналіз розташування цих залишків на рецепторі показав, що вони не групуються в безпосередній близькості, а формують два підцентри, що віддалені один від одного.

Перший підцентр представлений двома порожнинами, що мають форму

каналів з довжинами 13,23 та 13,56 Å відповідно. Він розташовується між двома субодинами пентамерного рецептора та, ймовірно, виконує модуляторну функцію щодо його афінитету до ГАМК. Другий підцентр зв'язування має порожнину об'ємом близько 647 Å³ та розташований на певній відстані від першого. Загалом вони формують єдину структуру, що відповідає за утворення зв'язків з похідними 1,4-бенздіазепіну. Привертає до себе увагу, що в обох підцентрах присутні залишки амінокислот з досить високою енергією зв'язування – у першому це фенілаланін (200-й амінокислотний залишок головного ланцюга рецептора), а у другому – тирозин (позиція 62). Показовим є те, що вони являють собою ароматичні структури, тому слід очікувати, що фіксація ліганду в цих підцентрах відбувається за

Компоненти четвертого кластеру взаємодії похідних 1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-рецепторним комплексом (M – головний (main) ланцюг, S – бічний (side) ланцюг, енергія взаємодії з амінокислотними залишками, ккал/моль)

Сполука	XI	XII	VII	X	III	XIX	IX	XIV	XVI	XV	XV	IV	VIII	XIII
Сумарна енергія взаємодії, ккал/моль	-112,5	-101,9	-97,9	-96,1	-92,7	-92	-91	-90,4	-89,1	-88,9	-88,8	-86,9	-80	-75,8
Залишок амінокислоти														
S-Tyr-97	-6,0	-5,5	-3,2		-3,5		-2,5	-1,8	-3,5	-3,5				
S-Glu-155	-6,0	-4,3			-3,5			-3,5	-3,5	-3,5				
M-Ser-156	-2,5	-2,5												
M-Tyr-157	-2,5	-3,7										-1,4		
M-Thr-202													-3,5	
S-Thr-202	-1,1	-3,5	-2,2		-2,3	-2,5							-3,9	
S-Tyr-205		-2,5	-8,9											
M-Asp-43														-3,5
S-Asp-43	-1,4		-3,2	-4,7	-3,5	-9,8							-1,8	
S-Tyr-62		-4,9					-2,5							
S-Gln-64		-3,5											-3,5	
S-Thr-176						-3,5							-1,8	
S-Arg-180	-5,4				-4,5								-6,8	
S-Tyr-97	-3,8	-3,9	1,2	-2,5	-2,5	-1,6	-2,8	-4,7	-5,5	-5,2	-1,7	-2,6		
S-Glu-155	-3,8	-4,1	-3,0	-3,6	-4,9	-2,3	-2,2	-4,7	-5,0	-4,9	3,7	-2,3		-0,2
M-Tyr-157	-1,9	-2,6	2,8	-1,8	-0,3	-1,3	4,8	-1,6	0,8	1,2	-5,7	-1,9		-0,9
S-Tyr-157	-2,3	-3,6	-4,0	-2,9	-7,4	-2,0	-1,3	-2,7	-5,9	-4,2	-7,8	-7,7		-1,0
M-Phe-200	-1,2	-1,1	-2,0	-1,3	-2,7	-1,9	-0,5	-1,2	-1,3	-1,8	-0,8	-0,2	-9,2	-2,0
S-Phe-200	-21,7	-18,9	-2,3	-21,9	-17,4	-16,3	-14,3	-19,8	-19,5	-18,9	-12,0	-9,2	-12,9	-1,3
M-Ala-201	-3,6	-1,8	-3,8	-2,3	-3,3	-2,9	-1,6	-1,5	-1,3	-2,9	-1,7	-0,5	-7,3	-5,8
S-Thr-202	-3,8	-3,3	-1,4	-2,8	-1,8	-3,2	-4,7	-1,4	-4,2	-4,7	-3,8	-2,3	-2,5	-2,7
S-Tyr-205	-7,5	-9,0	-9,2	-5,9	-7,8	-3,4	-7,5	-5,8	-9,4	-7,5	-1,3	-4,5	-0,4	-2,1
M-Asp-43	-0,5	-0,3	-0,2	-0,8	-0,2	-0,5	-0,6	-1,2				-2,6	-0,3	-4,8
S-Asp-43	3,0	-2,7	-6,6	-8,6	-5,4	-4,7	-4,4	-7,7	-3,5	-3,2	-2,8	-8,6	-4,5	-5,8
S-Tyr-62	-15,6	-16,5	-14,2	-23,8	-16,3	-12,4	-19,9	-23,5	-21,9	-2,2	-13,8	-22,6		-7,4
S-Gln-64	-3,4	-2,6	-4,4	-4,2	-3,1	-3,7	-1,9	-2,5	-2,4	-3,7	-7,3	-5,4	-1,9	-8,6
S-Met-115		-0,7	-2,2	-0,7	-1,3		-5,3		-0,4		-2,4	-2,4		
S-Thr-176	-1,4	-1,7	-0,9	-1,9	-0,3	-1,6	-0,9	-1,3		-0,9		-1,1	-5,6	-5,9
S-Arg-180	-1,8	-0,6	-0,7	-0,8	-3,2		-0,2						-4,7	-2,4

рахунок π - π взаємодії. Також привертає увагу те, що пропоксазепам має відносно низьку енергію зв'язку з цими амінокислотними залишками (2,0 та 7,4 ккал/моль відповідно). Зазначений кластер похідних 1,4-бенздіазепіну вміщує сполуки з досить різними проявами компонентів фармакологічного спектра – від снодійної дії в нітразепаму та левани, до міорелаксантної та транквілізуючої у феназепаму та навіть майже провідної аналгетичної в пропоксазепаму. Не виключена можливість, що така закономірність обумовлена як силою зв'язку з певними амінокислотними залишками, так і кількістю цих зв'язків, що впливає на конформаційну стабільність рецептора та в подальшому визначає спрямованість фармакологічних ефектів в організмі.

Амінокислотні залишки, зокрема, тирозин у положенні 97 (Tyr-97) та глутамін у положенні 155 (Glu-155) характеризуються високою енергією утворення зв'язків з нітразепамом та оксазепамом. Відомо [11], що нітразепам має потужну снодійну дію, а оксазепам також використовується в разі порушень сну (при цьому його міорелаксантна та протисудомна дії виражені в меншому ступені). Оскільки для інших бенздіазепінів, для яких виявлена знижена здатність до зв'язування з цими залишками (бромазепам та феназепам), у фармакологічному спектрі присутня значна міорелаксантна дія, можна припустити, що ці амінокислотні залишки не відповідають за її розвиток.

Також аномально високі значення утворення зв'язку виявлені для амінокислотних залишків у другому підцентрі, три з яких (аспарагін головного ланцюга (Asp-43), гліцин (Gln-64) та треонін (Thr-176) бокового ланцюга) беруть участь у взаємодії з пропоксазепамом, а останній (Thr-176) також здійснює внесок у зв'язування левани. Щодо останнього, то, враховуючи здатність левани до іонізації та гідролізу в тканинах, ця величина не може бути показовою характеристикою фармакологічних властивостей. У той самий час для пропоксазепаму, який проявляє значну аналгетичну дію, зазначені амінокислотні залишки з високою вірогід-

ністю можуть корелювати з цим типом біологічної активності.

Виходячи з локалізації кількості та подібності амінокислотних залишків, що беруть участь у формуванні комплексу ліганд-рецептор, було виділено декілька підцентрів, що здатні утворювати водневий зв'язок за рахунок Gln-64, Asp-43 та Thr-202, а також ті, що відповідають за водневий зв'язок та π - π взаємодію (Tyr-205, Phe-200), або схильні до гідрофобної взаємодії (Ala-201). Другий підцентр є більш гетерогенним, на якому переважно фіксуються 3-гідроксифеназепам, 3-гідроксибромазепам з одного боку та вже зазначені бретазепіл, діазепам та етоксазепам. У формуванні зв'язків цього центру бере участь значна частина більш полярних амінокислотних залишків (Ile-47, Asn-54, Lys-102, Als-135, Ser-46, Gln-182), а також сірковмісні амінокислотні залишки (Cys-136 та Met-137). Ймовірно, він є більш вигідним з енергетичної точки зору для сполук, що здатні до поляризації, з одночасним обмеженням за розміром молекул (оскільки порожнина цього підцентру є меншою, ніж попереднього).

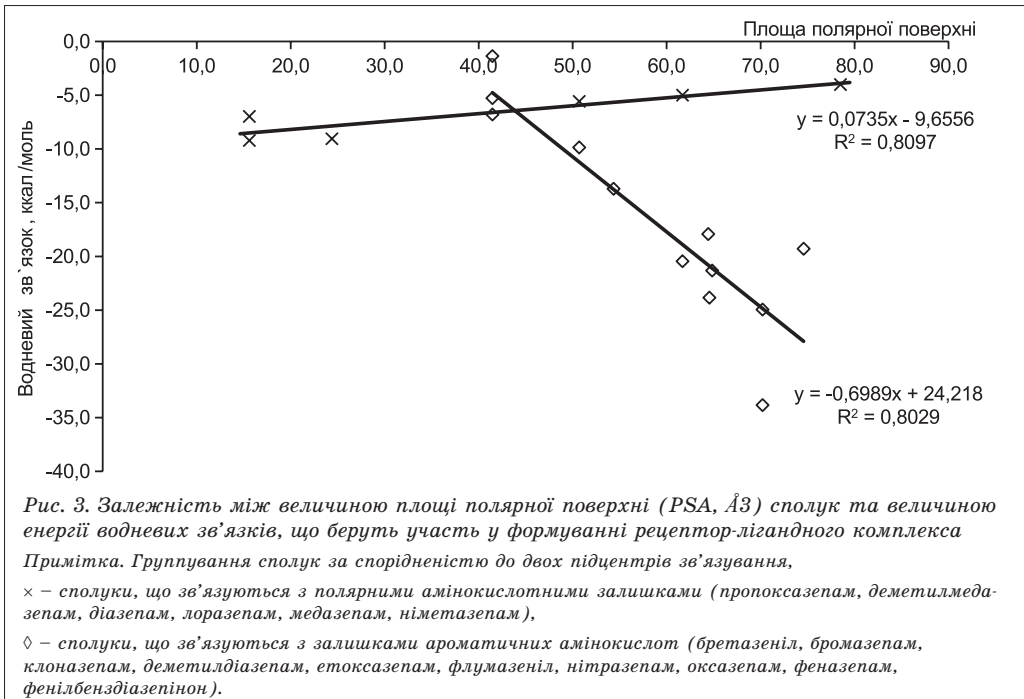
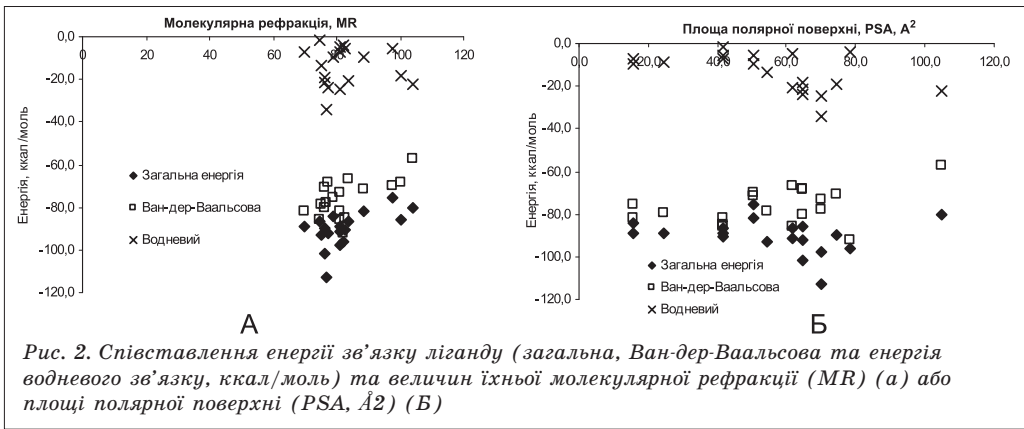
Незважаючи на те, що формування ліганд-рецепторного комплексу відбувається за рахунок різних міжмолекулярних зв'язків, водневий зв'язок та Ван-дер-Ваальсова взаємодія є найефективнішими для утримання бенздіазепінів у центрі рецептора. Вони утворюються між групами та атомами, що мають велику електронегативність або схильні до тимчасового зсуву електронної щільності та формування диполів.

З метою визначення впливу поляризації ліганду на можливість зв'язування було піддано аналізу такі фізико-хімічні властивості бенздіазепінів, як молекулярна рефракція (міра електронної поляризованості речовини) та величина площі полярної поверхні (яка є інтегральною мірою центрів з підвищеною або зниженою електронною густиною в проекції молекули). Так як величини ліпофільності ($\log P$ та $\log D$) сполук вибірки не зазнавали суттєвих змін, цей параметр не застосовували в аналізі. Втім, для молекулярної рефракції (рис. 1, А), що характеризує здатність

сполук до поляризованості, не знайдено певної кореляції між показниками енергії зв'язку, Ван-дер-Ваальсових чи водневих зв'язків. Можливим поясненням цього є те, що представлені структури (за винятком левани) у фізіологічному середовищі не здатні до утворення заряджених сполук (величини рKa та logD, табл. 1).

Для величини полярної поверхні (рис. 2, Б) також не виявлено суттєвої закономірності за співставлення як з загальною енергією взаємодії, так і з Ван-дер-Ваальсовою. Навпаки, була визначена певна залежність між площею полярної поверхні та загальним внеском водневих зв'язків.

Втім, сполуки у виборці класифікуються на дві групи (рис. 3), для однієї з яких спостерігається повільне зменшення енергії зв'язку (кут нахилу прямої $k = 0,0735$) з підвищенням площі полярної поверхні, а для іншої – значне підвищення енергії зв'язку (кут нахилу $0,6989$). Ймовірно, що ця закономірність пов'язана з існуванням двох підцентрів, які були виявлені при аналізі параметрів докінгу сполук цієї групи. Так, другий підцентр, що вміщує полярні амінокислоти, є високоафінним для лігандів, що мають полярні ділянки в молекулі, тоді як ароматичні структури першого підцентру зазнають негативного впливу при збільшенні полярності бенздіазепінів.



З аналізу було виключено левану (рис. 3), оскільки, як було вказано, вона в значному ступені піддається гідролізу в тканинах організму з утворенням активного метаболіту, тому її взаємодія з рецептором не може бути однозначно інтерпретована.

Виходячи з вищенаведеного, можна зробити висновок, що навіть серед обраних представників похідних 1,4-бенздіазепіну спостерігається гетерогенність по локалізації місць зв'язування з ГАМК_A-рецептором у процедурі молекулярного докінгу, а здатність молекули до поляризації відіграє значно меншу роль, ніж величина площі полярної поверхні.

Висновки

1. За результатами молекулярного докінгу низки похідних 1,4-бенздіазепіну встановлено, що внесок водневого зв'язку у формування комплексу «ліганд-рецептор» знаходиться в межах від ~2 до ~30 % від величини загальної енергії зв'язку. Найбільша доля водневих зв'язків визначається серед сполук з полярними групами,

які містять електронегативні елементи та рухомий атом водню (гідрокси-похідні, нітропохідні).

2. Серед 19 вивчених лігандів 14 представників мають спільне місце зв'язування на макромолекулі. Аналіз розташування амінокислот на рецепторі показав, що вони формують два підцентри, віддалені один від одного. Аномально високі значення утворення зв'язку виявлені для амінокислот у другому підцентрі, три з яких (Asp-43 головного ланцюга, Gln-64 та Thr-176 бокового) беруть участь у взаємодії з пропоксазепамом. У другому підцентрі активними є більша кількість більш полярних амінокислотних залишків (Phe-47, Asn-54, Lys-102, Ala-135, Ser-46, Glu-182), а також сірковмісні (Cys-136 та Met-137). Для молекулярної рефракції не визначено певної кореляції з показниками енергії зв'язку, а за величиною площі полярної поверхні визначається розділення сполук на дві групи, що, ймовірно, пов'язане з існуванням двох підцентрів, виявлених за аналізу параметрів докінгу сполук цієї групи.

1. Williams M. Receptors as Drug Targets / M. Williams, R. Raddatz // Current Protocols in Pharmacology. – 2006. – V. 32 (1.1) – P. 1.1.1–1.1.18.
2. De Benedetti P. G. Ligand-receptor communication and drug design / P. G. De Benedetti, F. Fanelli // Cuerr Protein Pept Ski. – 2009. – № 10 (2). – P. 186-93.
3. Analgesic Effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms / V. I. Pavlovsky, O. V. Tsybalyuk, V. S. Martynyuk [et al.] // Neurophysiology. – 2013. – V. 45, № 5/6. – P. 427–432.
4. A critical assessment of docking programs and scoring functions / G. L. Warren, C. W. Andrews, A. M. Capelli [et al.] // J. Med Chem. – 2006. – V. 5, № 49 (20). – P. 5912–5931.
5. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery / X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui // Curr Comput Aided Drug Des. – 2011. – V. 7 (2). – P. 146–157.
6. Molecular docking and structure-based drug design strategies / L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo // Molecules. – 2015. – V. 20 (7). – P. 13384–13421.
7. Grinter S. Z. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design / S. Z. Grinter, X. Zou // Molecules. – 2014. – V. 11, № 19 (7). – P. 10150–10176.
8. Yang J.-M. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking / J.-M. Yang, C.-C. Chen // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. – 2004. – V. 55. – P. 288-304.
9. Consensus Scoring Criteria for Improving Enrichment in Virtual Screening / J.-M. Yang, Y.-F. Chen, T.-W. Shen [et al.] // J. Chem Inf Model. – 2005. – V. 45 (4). – P. 1134-46.
10. Miller P. S. Crystal structure of a human GABA_A receptor / P. S. Miller, R. Aricescu A. // Nature. – 2014. – V. 512 (7514). – P. 270–275.
11. Pharmacological profiles of benzodiazepinergic hypnotics and correlations with receptor subtypes / M. Yasui, A. Kato, T. Kanemasa [et al.] // Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. – 2005. – V. 25 (3). – P. 143–151.

В. Б. Ларіонов, М. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінів – алостеричних модуляторів ГАМК-рецептора

Мета дослідження – оцінка рецепторно-лігандної взаємодії низки похідних 1,4-бенздіазепіну різного спектра фармакологічної дії на підставі даних молекулярного докінгу.

Розрахунок параметрів молекулярного докінгу з рецептором (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) було здійснено з використанням програми iGEMDOCK v2.1. Аналіз порожнин та взаємне положення амінокислотних залишків в активних центрах здійснювали на базі програми Mole 2.13.9.6.

Встановлено, що внесок водневого зв'язку у формування комплексу ліганд-рецептор для використаних похідних 1,4-бенздіазепіну знаходиться в межах від ~2 до ~30 % від величини загальної енергії зв'язку. З 19 похідних 1,4-бенздіазепіну для 14 представників визначено спільне місце зв'язування. Аналіз розташування залишків амінокислот на рецепторі показав, що вони формують два підцентри, що віддалені один від одного: у першому – переважно активні залишки аспарагінової кислоти (Asp-43), глутаміну (Gln-64) й треоніну (Thr-176), у другому – активними є більша кількість більш полярних амінокислотних залишків (ізолейцин Ile-47, аспарагін Asn-54, лізин Lys-102, аланін Ala-135, серин Ser-46, гліцин Glu-182), а також сірковмісні амінокислотні залишки (цистеїн Cys-136 та метіонін Met-137). За величиною площі полярної поверхні визначається розділення сполук на дві групи, що, ймовірно, пов'язане з існуванням двох підцентрів, виявлених за аналізом параметрів докінгу сполук цієї групи.

Ключові слова: похідні 1,4-бенздіазепіну, докінг, спектр фармакологічної дії, ГАМК-рецептор

В. Б. Ларионов, Н. Я. Головенко

Молекулярний докінг бенздіазепінов – аллостерических модуляторів ГАМК-рецептора

Цель исследования – оценка рецепторно-лигандного взаимодействия ряда производных 1,4-бенздиазепина с разным спектром фармакологического действия на основании данных молекулярного докинга.

Расчет параметров молекулярного докинга с рецептором (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF) был осуществлен с использованием программы iGEMDOCK v2.1. Анализ полостей и взаимного расположения аминнокислотных остатков осуществляли на базе программы Mole 2.13.9.6.

Установлено, что вклад водородных связей в формирование комплекса лиганд-рецептор для использованных производных 1,4-бенздиазепина находится в пределах от ~2 до ~30 % от величины общей энергии связи. Из 19 производных 1,4-бенздиазепина для 14 представителей определено одно общее место связывания. Анализ расположения остатков аминнокислот на рецепторе показал, что они формируют два подцентра, удаленных друг от друга: в первом – преимущественно активны остатки аспарагиновой кислоты (Asp-43), глутамина (Gln-64) и треонина (Thr-176), во втором – склонны к взаимодействию в большей степени полярные аминнокислотные остатки (серин Ser-46, глицин Glu-182, аспарагін Asn-54, лізин Lys-102, а также ізолейцин Ile-47 и аланін Ala-135), и серосодержащие аминнокислотные остатки (цистеин Cys-136 и метионин Met-137). По величине площади полярной поверхности установлено разделение соединений на две группы, что, вероятно, связано с существованием двух подцентров, выявленных при анализе параметров докинга представителей этой группы.

Ключевые слова: производные 1,4-бенздиазепина, докинг, спектр фармакологического действия, ГАМК-рецептор

V. B. Larionov, N. Ya. Golovenko

Molecular docking of benzodiazepines – GABA-receptor allosteric modulators

The aim of this work was a theoretical evaluation of the receptor-ligand interaction of some 1,4-benzodiazepine derivatives with different spectrum components of the pharmacological action using the molecular docking data.

Molecular docking parameters calculation with receptor (GABA_A R-beta3 homopentamer, 4COF) was performed using the program iGEMDOCK v2.1. The analysis of the cavities and amino acid residues locations was carried out on the basis of the program Mole 2.13.9.6.

It was found that the contribution of hydrogen bonds to the formation of the ligand-receptor complex for the 1,4-benzodiazepine derivatives is in the range from ~2 to ~30 % of the total energy of binding. From the 19 1,4-benzodiazepine derivatives for 14 compounds one common binding site has been identified. Analysis of the location of amino acid residues at the receptor revealed that they form two subcenters on a certain distance from each other – in the first one, the residues of asparaginic acid (Asp-43), glutamine (Gln-64) and threonine (Thr-176) are predominantly active, in the second subcenter – more polar amino acids (serine SER-46, glycine Glu-182, asparagine Asn-54, lysine Lys-102, isoleucine Ile-47 and alanine Ala-135), as well as sulfur-containing amino acid (cysteine Cys-136 and methionine Met-137). For the polar surface area division of the compounds into two groups has been found, which is probably due to the existence of two subcenters revealed in the analysis of the docking parameters of compounds of this group.

Key words: 1,4-benzodiazepine derivatives, docking, pharmacological action spectrum, GABA-receptor

Надійшла: 6 липня 2017 р.

Контактна особа: Ларионов В. Б., Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, буд. 86, Люстдорфська дорога, м. Одеса, 65080.

С. Ю. Штриголь¹, В. В. Цивунін¹, Д. В. Штриголь²,
І. О. Лебединець¹, О.О. Койро¹

Експериментальне обґрунтування доцільності використання фітопрепаратів у комбінованій фармакотерапії судомних станів

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків
²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Ключові слова: протисудомні засоби, лікарські рослини, екстракти, пентилентетразолові судоми, миші

Використання засобів допоміжної та альтернативної медицини є досить розповсюдженим, у тому числі серед хворих на епілепсію [1, 2]. Фітотерапію вважають безпечною та ефективною більшість пацієнтів [3]. Окремі фітопрепарати здатні потенціювати протисудомні властивості класичних проти-епілептичних засобів (ПЕЗ), збільшуючи ефективність фармакотерапії судомного синдрому, а також коригувати специфічні зміни особистості у хворих на епілепсію, суттєво зменшувати виразність та частоту виникнення несприятливих побічних ефектів традиційних антиконвульсантів [3–11].

Лікарські рослини та рослинні біологічно активні речовини (БАР) активно взаємодіють із сучасними ПЕЗ як на фармакодинамічному, так і на фармакокінетичному рівні. Так, етилацетатна фракція густого екстракту плодів фікуса священного (*Ficus religiosa* L.) у діапазоні доз від 2,5 до 10 мг/кг (внутрішньоочередово (в/о) потенціює протисудомні властивості фенітоїну в субефективній дозі 15 мг/кг, зменшуючи тяжкість нападів, рівень депресивності та когнітивний дефіцит у мишей за умов пентилентетразолового кіндлінгу [12]. Автори пов'язують цей ефект з потужними антиоксидантними властивостями багатого на флавоноїди фракції. Водно-спиртовий екстракт зизифусу справжнього (*Ziziphus jujuba* Mill.) потенціює антиконвульсивні властивості фенітоїну, фенобарбіталу та карбама-

зепіну в субтерапевтичних дозах на моделі судом, індукованих максимальним електрошоком. У цьому разі застосування фітоекстракту разом з ПЕЗ не спричиняло суттєвих змін їхніх сироваткових концентрацій [13]. Етанольний екстракт коренів *Nardostachys jatamansi* DC. виявляє синергізм із фенітоїном [14]. Сумісне застосування водного та ліофілізованого екстрактів *Gladiolus dalenii* Van Geel з діазепамом спричиняє виразніший протисудомний ефект на моделях пентилентетразолових пароксизмів та конвульсій, індукованих максимальним електрошоком [15]. Багата на ресвератрол харчова рослина *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc. збільшує концентрацію карбамазепіну в головному мозку, імовірно, за рахунок інгібування цитохрому СYP3A [16]. Отже, сумісне застосування *P. cuspidatum* з карбамазепіном може призводити як до підвищення ефективності протисудомної терапії, так і до збільшення токсичності препарату за рахунок досить малої широти терапевтичної дії ПЕЗ [17]. Аналогічний вплив на концентрацію карбамазепіну, але в сироватці крові, чинить аюрведичний трав'яний чай, головним компонентом якого є *Cassia auriculata* L. [18], що також треба брати до уваги хворим на епілепсію.

Потенціюють дію синтетичних антиконвульсантів і окремі БАР. Зокрема, сесквітерпенол β-еудесмол потенціює протисудомний ефект фенітоїну на моделі пароксизмів, індукованих максимальним електрошоком [19]. Тритерпеноїд урсолова кислота – активний компонент *Prunella vulgaris* L. – посилює ГАМК-ергічний вплив пентабарбі-

талу [20]. Куркумін при сумісному застосуванні з вальпроатом, фенітоїном, фенобарбіталом та карбамазепіном у низьких дозах збільшує захисний ефект традиційних ПЕЗ на експериментальних моделях епілепсії в щурів [21]. Здатність посилювати захисний ефект фенобарбіталу та фенітоїну притаманна також хіноліновому алкалоїду хелідоніну [22]. Флавоноїди апігенін та (-)-епігалокатехін галлат *in vitro* сенсibilізують рекомбінантні рецептори ГАМК_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ та посилюють стимулювальний вплив діазепаму на ГАМК-трансмісію [23].

Отже, отримані дані припускають застосування фітопрепаратів у допоміжній терапії епілепсії. Лікарські рослини здатні потенціювати протисудомний ефект ПЕЗ, дозволяють зменшити дозу препаратів та, таким чином, знизити частоту розвитку побічних реакцій.

У попередніх дослідженнях на моделях судом з різним патогенезом виразні антиконвульсивні властивості верифіковано в сухих екстрактах рутки Шлейхера (СЕРШ) та базиліку камфорного (СЕБК) [24–26].

Мета дослідження – визначити фармакодинамічну взаємодію СЕРШ та СЕБК з найуживанішим антиконвульсантом – вальпроатом натрію.

Матеріали та методи. Досліди виконано на 41 білих рандомбредних мишах-самцях масою 18–26 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію ЦНДЛ Національного фармацевтичного університету, що атестований МОЗ України (посвідчення від 8 грудня 2015 р. № 058/15, чинне до 7 грудня 2019 р.), відповідно до санітарно-гігієнічних норм з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), що засвідчено висновком комісії Національного фармацевтичного університету з біоетики (протокол від 17 лютого 2016 р. № 2). Під час дослідів тварини знаходились у віварії за температури – 19–24 °С, вологості – не більше 60 %, при-

родного світлового режиму «день/ніч» у поліпропіленових клітках на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Дослідження проводили на базовій моделі пентилентетразолових судом [27, 28]. Тварин рандомізували на групи (n = 6–9): контрольна; експериментальні, тварини яких отримували монотерапію сухими екстрактами або вальпроатом натрію, а також групи тварин, яким вводили комбінацію «сухий екстракт + вальпроат натрію». Миші контрольної групи отримували інтрагастрально воду очищену. Для точнішої верифікації ефектів досліджуваних комбінацій вальпроат натрію (сироп «Депакін», Sanofi Aventis, Франція) застосовували в субтерапевтичній дозі 150 мг/кг, що складає 50 % від умовно ефективної дози 300 мг/кг [26]; сухі екстракти вводили в умовно ефективній дозі 100 мг/кг [24, 25] внутрішньошлунково протягом 3 діб, востаннє – за 30 хв до введення конвульсанту. Судомний агент пентилентетразол (коразол, Sigma, США) вводили у вигляді водного розчину підшкірно в дозі 80 мг/кг.

Кожну мишу після введення конвульсанту вміщували в окремий пластиковий циліндричний бокс діаметром 20 см та висотою 35 см. Безперервно спостерігали за станом тварин протягом 60 хв. Оцінку протисудомної дії проводили за такими показниками: латентний період клонічних або тонічних судом, кількість клоніко-тонічних пароксизмів на 1 мишу, кількість тварин з клонічними та тонічними нападами, тяжкість пароксизмів у балах, тривалість судомного періоду, час життя тварин до загибелі та летальність. Якщо судомою не настали протягом 1 год, вважали, що латентний період дорівнює 60 хв. Тяжкість судом визначали в балах: 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 [29].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакета програм STATISTICA 8.0 з розрахунком середнього значення,

стандартної похибки середнього, довірчого інтервалу (р). Достовірність відмінностей між групами порівняння оцінювали за параметричним критерієм Стьюдента (t) – у випадках нормально-го розподілу, непараметричним критерієм Манна-Уїтні (U) – за його відсутності. У разі обліку результатів в альтернативній формі (летальність, відсоток мишей з клонічними та тонічними судомами) використовували кутове перетворення Фішера (φ) [30].

Результати та їх обговорення. Отримані дані свідчать про невиразний протисудомний ефект вальпроату натрію в субефективній дозі (табл. 1–2): на його фоні спостерігали лише вірогідне подовження латентного періоду перших нападів, а також тенденційне зниження летальності (на 28 %) відносно контролю.

СЕРШ виявив виразніший ефект (табл. 1), що визначено за достовірним подовженням латентного періоду нападів та зменшенням кількості клоніко-тонічних судом на 1 мишу, а також невірогідним зниженням летальності на 28 % відносно конт-

ролю. Найвиразніші протисудомні властивості були притаманні комбінації «СЕРШ + вальпроат», яка спричиняла достовірне подовження латентного періоду перших нападів та часу життя тварин до загибелі, а також зменшення кількості судом на 1 мишу, відсотка тварин із тонічними пароксизмами та тяжкості конвульсій. Крім того, під впливом комбінації «СЕРШ + вальпроат» спостерігали статистично значуще зниження летальності в групі (29 % відносно 78 % у контролі) (табл. 1).

СЕБК та комбінація «СЕБК + вальпроат» лише статистично значуще подовжували латентний період нападів без суттєвого впливу на інші показники (табл. 2).

Отже, комбінація «СЕРШ + вальпроат» виявилась значно ефективнішою, ніж монотерапія препаратами, що свідчить про виразний потенціюючий вплив фітоекстракту на протисудомний ефект класичного ПЕЗ, тоді як СЕБК майже не посилював доволі слабкі антиконвульсивні властивості вальпроату натрію в субефективній дозі.

Таблиця 1

Перебіг судом, індукованих пентилентетразолом, у мишей за впливу сухого екстракту рутки Шлейхера, вальпроату натрію та їхньої комбінації (M ± m)

Показник	Контроль (n = 9)	Сухий екстракт рутки Шлейхера, 100 мг/кг + вальпроат натрію, 150 мг/кг (n = 7)	Сухий екстракт рутки Шлейхера, 100 мг/кг (n = 6)	Вальпроат натрію, 150 мг/кг (n = 6)
Латентний період, хв	3,20 ± 0,37	8,67 ± 1,74**	7,32 ± 1,81*	5,25 ± 0,73*
Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	3,67 ± 0,58	2,29 ± 0,18*	2,0 ± 0,26*	3,17 ± 0,60
Відсоток мишей з судомами:				
клонічними	100	100	100	100
тонічними	100	71*	100	83
Тяжкість судом, бал	5,56 ± 0,29	4,29 ± 0,47*	5,0 ± 0,45	4,83 ± 0,54
Тривалість судомного періоду, хв	8,68 ± 1,88	10,91 ± 2,05	5,58 ± 1,36	10,98 ± 2,74
Час життя тварин до загибелі, хв	10,76 ± 2,57	24,04 ± 0,62*	14,61 ± 3,05	14,92 ± 5,11
Летальність, %	78	29*	50	50

Примітка. Тут і в табл. 2: статистично значущі відмінності відносно контролю: *p < 0,05,

** p < 0,01, n – кількість тварин у групі.

Показники перебігу судом, індукованих пентилентетразолом, у мишей зв впливу сухого екстракту базилику камфорного, вальпроату натрію та їхньої комбінації ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n = 9)	Сухий екстракт базилику камфорного, 100 мг/кг + вальпроат натрію, 150 мг/кг (n=7)	Сухий екстракт базилику камфорного, 100 мг/кг (n = 6)	Вальпроат натрію, 150 мг/кг (n = 6)
Латентний період, хв	3,20 ± 0,37	7,12 ± 1,66*	5,72 ± 1,22*	5,25 ± 0,73*
Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	3,67 ± 0,58	2,86 ± 0,74	3,00 ± 0,37	3,17 ± 0,60
Відсоток мишей із судомами:				
клонічними	100	100	100	100
тонічними	100	86	100	83
Тяжкість судом, бал	5,56 ± 0,29	4,71 ± 0,47	5,33 ± 0,42	4,83 ± 0,54
Тривалість судомного періоду, хв	8,68 ± 1,88	7,83 ± 2,28	11,74 ± 3,12	10,98 ± 2,74
Час життя тварин до загибелі, хв	10,76 ± 2,57	12,13 ± 3,91	13,64 ± 1,93	14,92 ± 5,11
Летальність, %	78	43	67	50

Висновки

1. Досліджено здатність СЕРШ та СЕБЖ модулювати ефект класичного протиепілептичного засобу вальпроату натрію в експерименті.
2. Виявлено, що СЕРШ здатний потенціювати антиконвульсивні властивості вальпроату натрію, тоді як СЕБЖ майже не впливає на його дію.

3. Результати свідчать про потужний протисудомний потенціал СЕРШ та експериментально обґрунтовують доцільність його використання в комбінованій фармакотерапії епілепсії та судомних станів.

1. Drug interactions involving antiepileptic drugs: Assessment of the consistency among three drug compendia and FDA-approved labels / D. Ekstein, M. Tirosh, Y. Eyal, S. Eyal // *Epilepsy & Behavior*. – 2015. – V. 44. – P. 218–224.
2. Tyagi A. Herbal Remedies, Dietary Supplements, and Seizures / A. Tyagi, N. Delanty // *Epilepsia*. – 2003. – V. 44, № 2. – P. 228–235.
3. Herbal medicine and epilepsy: proconvulsive effects and interactions with antiepileptic drugs / N. Samuels, Y. Finkelstein, S. R. Singer, M. Oberbaum // *Epilepsia*. – 2008. – V. 49, № 3. – P. 373–380.
4. Chavez M. L. Evidence-Based Drug – Herbal Interactions / M. L. Chavez, M. A. Jordan, P. I. Chavez // *Life Sciences*. – 2001. – V. 78, № 18. – P. 2146–2157.
5. Harish B. B. A review on traditional system of medicine for treats epilepsy / B. B. Harish, L. S. Mohana, K. A. Saravana // *International Journal of Biological & Pharmacological Research*. – 2010. – V. 1, № 1. – P. 1–6.
6. Herbal medicine and epilepsy: proconvulsive effects and interactions with antiepileptic drugs / N. Samuels, Y. Finkelstein, S. R. Singer, M. Oberbaum // *Epilepsia*. – 2008. – V. 49, № 3. – P. 373–380.
7. Mani R. Antiepileptic drugs and other medications: what interactions may arise? / R. Mani, J. R. Pollard // *Current treatment options in neurology*. – 2009. – V. 11, № 4. – P. 253–261.
8. Pearl P. L. Herbs in Epilepsy: Evidence for Efficacy, Toxicity, and Interactions / P. L. Pearl, I. M. Drillings, J. A. Conry // *Seminars in Pediatric Neurology*. – 2011. – V. 18, № 3. – P. 203–208.
9. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник; відп. ред. А. М. Гродзінський. – Київ : Вид-во «Українська енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. – 544 с.

10. Лікарські рослини, що мають седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності, їх біологічно активні речовини та механізми їхньої дії / С. А. Данилов, О. В. Товчига, С. І. Степанова, С. Ю. Штриголь // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 68–87.
11. *Stringer J. L. Ginseng and Other Herbal Treatments for Epilepsy / J. L. Stringer // Encyclopedia of Basic Epilepsy Research / J. L. Stringer. – Davis : University of California, 2009. – P. 1445–1450.*
12. *Singh P. Ficus religiosa L. figs – a potential herbal adjuvant to phenytoin for improved management of epilepsy and associated behavioral comorbidities / P. Singh, D. Singh, R. K. Goel // Epilepsy Behav. – 2014. – V. 41. – P. 171–178.*
13. Interaction profile of *Zizyphus jujuba* with phenytoin, phenobarbitone, and carbamazepine in maximal electroshock-induced seizures in rats / M. Pahuja, T. Kleekal, K. Reeta [et al.] // *Epilepsy & Behavior. – 2012. – V. 25, № 3. – P. 368–373.*
14. *Rao V. S. Anticonvulsant and neurotoxicity profile of Nardostachys jatamansi in rats / V. S. Rao, A. Rao, K. S. Karanth // J. of Ethnopharmacology. – 2005. – V. 102, № 3. – P. 351–356.*
15. The anticonvulsant and sedative effects of *Gladiolus dalenii* extracts in mice / G. T. Ngoupaye, E. N. Bum, E. Ngah [et al.] // *Epilepsy Behav. – 2013. – V. 28, № 3. – P. 450–456.*
16. *Chi Y.-C. A new herb–drug interaction of Polygonum cuspidatum, a resveratrol-rich nutraceutical, with carbamazepine in rats / Y.-C. Chi, S.-P. Lin, Y. C. Hou // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2012. – V. 263, № 3. – P. 315–322.*
17. Клиническая фармакология : национальное руководство под ред. Ю. Б. Белоусова, В. Г. Кукуеса, В. К. Лепахина, В. И. Петрова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 976 с.
18. The effects of *Cassia auriculata* and *Cardiospermum halicacabum* teas on the steady state blood level and toxicity of carbamazepine / I. Thabrew, J. Munasinghe, S. Chackrewarthy, S. Senarath // *J. of Ethnopharmacology. – 2004. – V. 90, № 1. – P. 145–150.*
19. *Chiou L. C. Chinese herb constituent β -eudesmol alleviated the electroshock seizures in mice and electrographic seizure in rat hippocampal slices / L. C. Chiou, J. Y. Ling, C. C. Chang // Neuroscience Letters. – 1997. – V. 231, № 3. – P. 171–174.*
20. Ursolic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic neurotransmission in mice / S. J. Jeon, H. J. Park, Q. Gao [et al.] // *European Journal of Pharmacology. – 2015. – V. 762. – P. 443–448.*
21. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of valproate, phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine with curcumin in experimental models of epilepsy in rats / K. H. Reeta, J. Mehla, M. Pahuja, Y. K. Gupta // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior. – 2011. – V. 99, № 3. – P. 399–407.*
22. Effects of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on the protective activity of antiepileptic drug in mice / E. Jagiello-Wojtowicz, Z. Kleinrok, A. Chodkowska, M. Feldo // *Herba Polonica Journal. – 1998. – V. 44, № 4. – P. 383–385.*
23. *Campbell E. L. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABAA receptors / E. L. Campbell, M. Chebib, G. A. R. Johnston // Biochemical Pharmacology. – 2004. – V. 68, № 8. – P. 1631–1638.*
24. Скринінгове дослідження протисудомної активності сухих екстрактів із 8 видів рослин родин *Solanaceae, Papaveraceae, Lamiaceae* та *Polemoniaceae* / В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Ю. С. Прокопенко, В. А. Георгіянець // *Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 47–50.*
25. Influence of dry herbal extracts on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: screening results and relationship «chemical composition – pharmacological effect» / V. Tsyunin, S. Shtrygol', Y. Prokopenko [et al.] // *ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2016. – № 1 (1). – P. 18–28.*
26. Експериментальне визначення спектра 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.*
27. *Головенко М. Я. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів : метод. рек. / М. Я. Головенко, Л. О. Громов. – Київ : ВД «Авіцена», 2003. – 26 с.*
28. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1; под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева [и др.]. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
29. *Штриголь С. Ю. Модуляція фармакологічних ефектів при різних солевих режимах / С. Ю. Штриголь. – Харьков : Ависта-ВЛТ, 2007. – 360 с.*
30. *Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – Москва : Практика, 1998. – 459 с.*

С. Ю. Штриголь, В. В. Цивунін, Д. В. Штриголь, І. О. Лебединець, О. О. Койро
Експериментальне обґрунтування доцільності використання фітопрепаратів
у комбінованій фармакотерапії судомних станів

Глибокий аналіз джерел світової наукової літератури припускає застосування фітопрепаратів у допоміжній терапії епілепсії. Лікарські рослини здатні потенціювати протисудомний ефект протіепілептичних засобів, дозволяють зменшити дозу препаратів та, таким чином, знизити частоту розвитку побічних реакцій. У попередніх дослідженнях на моделях судом із різним патогенезом виразні

антиконвульсивні властивості верифіковано в сухих екстрактах рутки Шлейхера (СЕРШ) та базилику камфорного (СЕБК).

Мета дослідження – визначити фармакодинамічну взаємодію СЕРШ та СЕБК із найуживанішим антиконвульсантом – вальпроатом натрію.

Досліди виконано на 41 білих рандомбредних мишах-самцях. Використано базову модель пентилентетразолових судом. Тварин рандомізували на групи ($n = 6-9$): контрольна; експериментальні, тварини яких отримували монотерапію сухими екстрактами або вальпроатом натрію, а також групи тварин, яким вводили комбінацію «сухий екстракт + вальпроат натрію». Вальпроат натрію застосовували у субтерапевтичній дозі 150 мг/кг, що складає 50 % від умовно ефективної дози 300 мг/кг; сухі екстракти вводили в умовно ефективній дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково протягом 3 діб, востаннє – за 30 хв до введення конвульсанту. Пентилентетразол вводили у вигляді водного розчину підшкірно в дозі 80 мг/кг.

Отримані дані свідчать про невиразний протисудомний ефект вальпроату натрію в субефективній дозі. СЕРШ виявив потужніший ефект, однак найвиразніші протисудомні властивості були притаманні комбінації «СЕРШ + вальпроат». СЕБК та комбінація «СЕБК + вальпроат» майже не чинили впливу на експериментальний судомний синдром.

Отже, комбінація «СЕРШ + вальпроат» виявилась значно ефективнішою, ніж монотерапія препаратами, що свідчить про виразний потенціюючий вплив фітоекстракту на протисудомний ефект класичного антиконвульсанту, тоді як СЕБК майже не посилював доволі слабкі антиконвульсивні властивості вальпроату натрію в субефективній дозі.

Ключові слова: протисудомні засоби, лікарські рослини, екстракти, пентилентетразолові судоми, миші

С. Ю. Штрыголь, В. В. Цывунин, Д. В. Штрыголь, И. А. Лебединец, О. О. Койро **Экспериментальное обоснование целесообразности использования** **фитопрепаратов в комбинированной фармакотерапии судорожных состояний**

Глубокий анализ источников мировой научной литературы допускает применение фитопрепаратов во вспомогательной терапии эпилепсии. Лекарственные растения способны усиливать противосудорожное действие противозепилептических средств, позволяют снизить дозу препаратов и, таким образом, уменьшить частоту развития побочных реакций. В предыдущих исследованиях на моделях судорог с различным патогенезом выразительные противосудорожные свойства верифицированы у сухих экстрактов дымянки Шлейхера (СЭДШ) и базилика камфорного (СЭБК).

Цель исследования – изучить фармакодинамическое взаимодействие СЭДШ и СЭБК с широко употребляемым антиконвульсантом – вальпроатом натрия.

Опыты проведены на 41 белых беспородных мышах-самцах. Использована базовая модель пентилентетразоловых судорог. Животных рандомизировали на группы ($n = 6-9$): контрольная; экспериментальные, животные которых получали монотерапию сухими экстрактами или вальпроатом натрия, а также группы животных, которым вводили комбинацию «сухой экстракт + вальпроат натрия». Вальпроат натрия применяли в субтерапевтической дозе 150 мг/кг, что составляет 50 % от условно эффективной дозы 300 мг/кг; сухие экстракты вводили в условно эффективной дозе 100 мг/кг внутривентриально в течение 3 сут, в последний раз – за 30 мин до конвульсанта. Пентилентетразол вводили в виде водного раствора подкожно в дозе 80 мг/кг.

Полученные данные свидетельствуют о невыразительном противосудорожном эффекте вальпроата натрия в субэффективной дозе. СЭДШ показал более мощный эффект, однако самые выразительные противосудорожные свойства были присущи комбинации «СЭДШ + вальпроат». СЭБК и комбинация «СЭБК + вальпроат» почти не оказывали влияния на экспериментальный судорожный синдром.

Таким образом, комбинация «СЭДШ + вальпроат» оказалась значительно эффективнее, чем монотерапия препаратами, что свидетельствует о выразительном потенцирующем влиянии фитоекстракта на противосудорожный эффект классического антиконвульсанта, в то время как СЭБК почти не усиливал довольно слабые противосудорожные свойства вальпроата натрия в субэффективной дозе.

Ключевые слова: противосудорожные средства, лекарственные растения, экстракты, пентилентетразоловые судороги, мыши

S. Yu. Shtrygol', V. V. Tsyvunin, D. V. Shtrygol', I. A. Lebedinets, O. O. Koyro **Experimental substantiation of expediency of herbal remedies use in combined** **pharmacotherapy of convulsive states**

A deep analysis of the sources of world scientific literature suggests the use of herbal remedies in the adjunctive therapy of epilepsy. Medicinal plants are able to potentiate the anticonvulsant effect of antiepileptic drugs, reduce the dose and thus decrease the incidence of adverse reactions. In previous studies using seizure models with different pathogenesis expressed anticonvulsant properties have been verified in dry extracts of *Fumaria schleicheri* (FSDE) and *Ocimum basilicum* (OBDE).

The aim of the study is to determine pharmacodynamic interactions between FSDE, OBDE and the most used anticonvulsant drug – sodium valproate.

Experiments were performed on 41 random-bred male albino mice. The pentylenetetrazole-induced seizures as a basic model were used. The animals were randomized into groups (n = 6–9): control; experimental animals were treated by dry extracts or sodium valproate only and groups of animals, were administered by a combination of «dry extract + sodium valproate». Sodium valproate were administered subcutaneously at a dose of 150 mg/kg, representing roughly 50 % of the effective dose of 300 mg/kg; dry extracts were administered at the relatively effective dose of 100 mg/kg for 3 days intragastrically, last time on 30 min before convulsant injection. Pentylenetetrazole was administered subcutaneously in an aqueous solution at a dose of 80 mg/kg.

These data suggest the vague anticonvulsant effect of sodium valproate in subeffective dose. FSDE found more powerful effect, but the most significant anticonvulsant properties were peculiar to the combination «FSDE + valproate». OBDE and the combination «OBDE + valproate» almost did not influence on the experimental convulsions.

Thus, the combination «FSDE + valproate» was significantly more effective than monotherapy of drugs, indicating a marked impact phytoextracts' potentiative influence on anticonvulsant effect of classic anti-epileptic drug. While OBDE hardly strengthened the rather weak anticonvulsant properties of sodium valproate in subeffective dose.

Key words: anticonvulsant drugs, medicinal plants, extracts, pentylenetetrazole-induced seizures, mice

Надійшла: 23 червня 2017 р.

Контактна особа: Штриголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 5, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: shtrygol@ukr.net

О. І. Белікова¹, В. С. Черно¹, В. О. Костенко²

Поєднаний вплив мелатоніну та метформіну гідрохлориду на біохімічні маркери синдрому інсулінорезистентності за умов експериментального гіпопінеалізму

¹Миколаївський національний університет імені В. О. Сухомлинського²Вищий державний навчальний заклад України

«Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Ключові слова: синдром інсулінорезистентності, гіпопінеалізм, мелатонін, метформіну гідрохлорид

Синдром інсулінорезистентності (ІР) або метаболічний синдром розглядається як доклінічна стадія розвитку цукрового діабету 2 типу та ішемічної хвороби серця. Згідно з сучасними уявленнями про розвиток цієї патології, порушення обміну ліпідів, ліпопротеїнів та вуглеводів, артеріальна гіпертензія, системна запальна відповідь та окисний стрес, що є компонентами цього синдрому, мають комплексний характер і загальний патогенез [1]. Останніми роками отримала підтвердження точка зору, що молекулярною основою всіх проявів синдрому ІР може бути перманентна активація ядерного чинника κВ (NF-κB) [2, 3]. Було доведено ефективність корекції головних компонентів синдрому ІР у разі застосування інгібіторів активації NF-κB [4].

Нещодавно виявлено, що важливим фактором розвитку ІР є десинхроноз, пов'язаний з дизрегуляцією супрахіазматичного ядра гіпоталамуса з подальшим зниженням пінеальної секреції мелатоніну (особливо за порушення світлового режиму) [5]. За цих умов під час світлової фази в клітинах епіфіза постійно збільшується кількість вільних димерів NF-κB, у той час як у темряві має місце зворотна реакція [6]. На цій підставі можна припустити зв'язок гіпомелатонінемії та надмірної активації NF-κB.

Повідомляється про високий ризик розвитку ІР та інших проявів цього син-

дрому в осіб, які за характером своєї діяльності часто змінюють місце перебування, наприклад, у працівників локомотивних бригад [7]. Окрім того, гіпопінеалізм, індукований тривалим цілодобовим освітленням, викликає розвиток ознак синдрому ІР в експерименті на тваринах. Наприклад, за цих умов у кролів виявляється інтолерантність до глюкози, артеріальна гіпертензія, гіперінсулінемія та дисліпідемія [8].

Мелатонін як ендогенний, так і екзогенний протидіє розвитку ІР, коригує обмін речовин, забезпечує баланс секреції інсуліну, дезактивує активні форми кисню й азоту, у тому числі утворені внаслідок метаболізму атерогенних фракцій ліпопротеїнів [5, 9]. Останнім часом з'являються повідомлення про ефективність мелатоніну в разі застосування цього гормону в хворих з синдромом ІР [5].

Примітно, що пригнічення NF-κB-сигналізації може сприяти збільшенню як пінеальної, так і екстрапінеальної продукції мелатоніну [10].

Показана синергічна дія мелатоніну та засобів, що пригнічують активацію NF-κB. Так, поєднане введення мелатоніну та бортезомібу, що гальмує дію NF-κB шляхом інгібування протеасоми 26S, підвищує апоптоз злоякісних клітин, зменшує їхню резистентність до дії антинеопластичного засобу та його токсичність [11].

Нещодавно доведено здатність відомого протидіабетичного лікарського засобу групи похідних бігуанідів – метформіну (1,1-диметилбігуанід гідрохлориду) пригнічувати активацію NF-κB шляхом гальмування процесів

фосфорилування ІкВ-кінази та деградації інгібіторного білка ІкВ α [12].

Проте ефективність поєднаного застосування мелатоніну та інгібітора NF- κ B за відтворення синдрому IP раніше не досліджувалася.

Мета дослідження – оцінка поєднаної дії екзогенного мелатоніну та метформіну гідрохлориду на вуглеводний і ліпідний обмін, а також на вільнорадикальні процеси в організмі щурів у разі відтворення вуглеводно-ліпідної моделі синдрому IP за умов гіпопінеалізму, індукованого цілодобовим освітленням.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на 35 білих щурах лінії Вістар масою 215–255 г у 5 серіях дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали в інтактних тварин (контрольна), у другій – після моделювання синдрому IP за умов експериментального гіпопінеалізму, у третій і четвертій – протягом останніх 30 днів експерименту вводили відповідно екзогенний мелатонін та метформін гідрохлорид, у п'ятій – наведені сполуки застосовували разом. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Для моделювання синдрому IP щурам протягом 2 місяців призначали висококалорійну вуглеводно-ліпідну дієту (ВЛД), що складається з 20 % водного розчину фруктози для пиття та раціону харчування, який містить наступні складові: рафіновану пшеничну муку – 45 %, сухе знежирене коров'яче молоко – 20 %, крохмаль – 10 %, столовий маргарин (з вмістом жирів 72–82 %) – 20 %, переокиснену соняшникову олію – 4 %, натрію хлорид – 1 % [4]. Крім того, тварин, починаючи з 30 доби експерименту, піддавали цілодобовому освітленню інтенсивністю 1500 лк протягом наступних 30 днів.

Слід зазначити, що щури, як нірні тварини, характеризуються дещо іншим, ніж у людини, біоритмом секреції епіфізом мелатоніну, що обмежує їхнє використання в хронофармакологічних дослідженнях. Проте цілодобове освітлення моделює гіпопінеалізм без суттєвих добових коливань вмісту мелатоніну в крові, що робить відтворення цієї моделі в щурів адекватним

для вивчення метаболічних процесів за умов гіпомелатонінемії [13].

Мелатонін (виробництво «Sigma-Aldrich, Inc.», США) вводили у вигляді водного розчину інтрагастрально за допомогою спеціального зонда в дозі 0,3 мг/кг маси тіла на 1 добу щоденно [13] протягом останніх 30 днів експерименту. Субстанцію метформіну гідрохлориду (виробництво «Wanbury Limited», Індія) застосовували в дозі 200 мг/кг маси тварини щоденно [14], починаючи з 30 доби експерименту.

Концентрацію мелатоніну, інсуліну та фактора некрозу пухлини- α (TNF- α) у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням наборів Rat Melatonin ELISA Kit (Wuhan EIAab Sci CO., Китай), Rat Insulin ELISA Kit (MyBioSource, США), Rat TNF ELISA Kit (MyBioSource, США). Концентрацію глюкози, загального холестеролу (ХС), триацилгліцеролів (ТАГ) та ХС ліпопротеїнів високої щільності (ХС-HDL) визначали за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика». Уміст ХС ліпопротеїнів низької та дуже низької щільності (ХС-LDL і ХС-VLDL) розраховували за формулою Фридвальда: $ХС-LDL = \text{Загальний ХС} - (ХС-HDL + \text{ТАГ}/2,2)$; $ХС-VLDL = \text{ТАГ}/2,2$. Індекс інсулінорезистентності HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) розраховували за формулою: $HOMA-IR = \text{глюкоза натще (ммоль/л)} \cdot \text{інсулін натще (мкОд/мл)}/22,5$. Концентрацію церулоплазміну в сироватці крові визначали за методом, що базується на окисненні п-фенілендіаміну [15].

Рівень переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у крові оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу до і після 1,5-год інкубації. Активність антиоксидантної (АО) системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних сполук протягом 1,5-год інкубації в залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) і каталази [15].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки розподілу

на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їхнього порівняння використовували t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Для множинного порівняння застосовували поправку Бонфероні, а в разі розподілу, який відрізняється від нормального, – критерій Краскела-Уоліса. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007» та «StatisticSoft 6,0».

Результати та їх обговорення. За даними дослідження, концентрація мелатоніну в сироватці крові інтактних щурів становить $(31,8 \pm 2,5)$ пг/мл. Цілодобове освітлення щурів інтенсивністю 1500 лк протягом перебування їх на вуглеводно-ліпідному раціоні змен-

шує вміст мелатоніну в сироватці крові до $(7,1 \pm 0,7)$ пг/мл, що на 77,7 % ($p < 0,001$) поступається даним інтактної серії та вказує на розвиток експериментального гіпопінеалізму.

Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду на тлі гіпомелатонінемії та ВЛД суттєво зменшує концентрацію глюкози в сироватці крові (табл. 1), яка на 53,0 % ($p < 0,001$) поступається даним другої та на 38,6 % ($p < 0,001$) – третьої серій.

Концентрація інсуліну в сироватці крові суттєво зменшується та на 64,6 % ($p < 0,001$) поступається даним другої серії, на 57,0 % ($p < 0,001$) – третьої, на 33,8 % ($p < 0,01$) – четвертої.

Індекс НОМА-ІR знижується до $(0,24 \pm 0,06)$, що на 83,6 % ($p < 0,001$) поступається даним другої серії та на 74,5 % ($p < 0,01$) – третьої.

Позитивний вплив мелатоніну підтверджено при відтворенні в експериментах на гризунах за різних моделей

Таблиця 1

Показники вуглеводного та ліпідного обміну за умов відтворення синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму, а також поєднаної дії мелатоніну та метформіну гідрохлориду (M + m, n = 35)

Показник	Інтактні тварини	Модель синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму			
		Контроль	+ мелатонін	+ метформіну гідрохлорид	+ мелатонін + метформіну гідрохлорид
Глюкоза, ммоль/л	$4,71 \pm 0,23$	$6,89 \pm 0,25^*$	$5,28 \pm 0,26^{**}$	$3,29 \pm 0,23^{**/**}$	$3,24 \pm 0,23^{**/**/**}$
Інсулін, мкОд/мл	$1,51 \pm 0,26$	$5,42 \pm 0,25^*$	$4,47 \pm 0,41^*$	$2,90 \pm 0,20^{**/**}$	$1,92 \pm 0,20^{**/**/**/**}$
НОМА-ІR	$0,27 \pm 0,06$	$1,46 \pm 0,27^*$	$0,94 \pm 0,19^*$	$0,37 \pm 0,08^{**}$	$0,24 \pm 0,06^{**/**}$
Загальний ХС, ммоль/л	$1,95 \pm 0,25$	$2,16 \pm 0,24$	$2,06 \pm 0,19$	$2,02 \pm 0,24$	$2,25 \pm 0,25$
ХС-HDL, ммоль/л	$0,61 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04^*$	$0,35 \pm 0,05^*$	$0,43 \pm 0,03^{**/**}$	$0,58 \pm 0,03^{**/**/**/**}$
ХС-LDL, ммоль/л	$1,04 \pm 0,23$	$0,98 \pm 0,20$	$1,07 \pm 0,22$	$0,99 \pm 0,28$	$1,30 \pm 0,25$
ХС-VLDL, ммоль/л	$0,30 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,04^*$	$0,64 \pm 0,06^{**/**}$	$0,60 \pm 0,05^{**/**}$	$0,37 \pm 0,03^{**/**/**/**}$
ТАГ, ммоль/л	$0,67 \pm 0,06$	$2,08 \pm 0,09^*$	$1,40 \pm 0,14^{**/**}$	$1,32 \pm 0,12^{**/**}$	$0,82 \pm 0,06^{**/**/**/**}$

Примітка. Тут і в табл. 2–3: * $p < 0,05$ порівняно з даними першої серії (інтактні тварини); ** $p < 0,05$ порівняно з даними другої серії; *** $p < 0,05$ порівняно з даними третьої серії; **** $p < 0,05$ порівняно з даними четвертої серії.

синдрому IP (щури лінії Zucker, надлишкове введення фруктози та стрептозотоцину), коли спостерігалось зменшення рівня глікемії натще, глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), ліпідів, лептину, інсуліну та індексу HOMA-IR [16, 17]. Автори пов'язують ці ефекти зі стимулюючою дією мелатоніну на секрецію глікогену за рахунок фосфорилування синтази кінази 3β (GSK- 3β) у клітинах печінки та зв'язування з MT1-рецепторами α -клітин підшлункової залози.

Метаболічна дія метформіну гідрохлориду тісно пов'язана з його здатністю пригнічувати активацію NF- κ B [4]. У цьому разі зменшується NF- κ B-залежний синтез прозапальних цитокінів і пов'язане з ними фосфорилування за серином субстрату інсулінового рецептора-1 (IRS-1). Це усуває важливий механізм формування IP – порушення передачі інсулінового сигналу [2].

За нашими даними, поєднане застосування мелатоніну потенціює здатність метформіну гідрохлориду зменшувати гіперінсулінемію.

Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за умов експерименту суттєво не впливає на концентрацію загального ХС та ХС-LDL.

За цих умов нормалізується вміст ХС-HDL, який у 2,41 разу ($p < 0,001$) перевищує результат другої серії, на 65,7 % ($p < 0,01$) – третьої та на 34,9 % ($p < 0,01$) – четвертої.

Концентрація ХС-VLDL і ТАГ зменшується та поступається, відповідно, на 60,6 % ($p < 0,001$) і 60,6 % ($p < 0,001$)

даним другої серії, на 42,2 % ($p < 0,01$) і 41,4 % ($p < 0,01$) – третьої та на 38,3 % ($p < 0,01$) і 37,9 % ($p < 0,01$) – четвертої серії.

Раніше було виявлено, що мелатонін здатний пригнічувати стрес-індукований ліполіз, знижувати за цих умов вміст загального ХС, ТАГ і неестерифікованих жирних кислот, підвищувати ХС-HDL [5]. В експерименті на діабетичних щурах лінії OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) показано, що введення мелатоніну суттєво зменшує гіпертріацилгліцеролемію та відновлює печінкову $\Delta 5$ -десатуразу [18].

Відомою є й здатність метформіну гідрохлориду за умов експериментального метаболічного синдрому обмежувати прояви дисліпопротеїнемії та гіпертріацилгліцеролемії, характерних й для інших інгібіторів NF- κ B-сигналізації [4].

Проте нами показано, що мелатонін потенціює коригуючий вплив метформіну гідрохлориду за умов експерименту на рівень дисліпопротеїнемії, зокрема, гіпо- α -ліпопротеїнемії та гіпертріацилгліцеролемії.

Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду на тлі гіпомелатонінемії та ВЛД зменшує концентрацію прозапального цитокіну TNF- α (табл. 2), яка на 67,0 % ($p < 0,001$) поступається результату другої та на 43,3 % ($p < 0,02$) – третьої серії.

Уміст білка гострої фази запалення – церулоплазміну в сироватці крові достовірно не відрізняється від даних серій з застосуванням мелатоніну та метформіну.

Таблиця 2

Показники системної запальної відповіді за умов відтворення синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму, а також поєднаної дії мелатоніну та метформіну гідрохлориду (M + m, n = 35)

Показник	Інтактні тварини	Модель синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму			
		Контроль	+ мелатонін	+ метформіну гідрохлорид	+ мелатонін + метформіну гідрохлорид
TNF- α , пг/мл	33,3 \pm 2,3	107,5 \pm 6,5*	62,6 \pm 9,3**/***	46,0 \pm 4,6**/***	35,5 \pm 2,1**/****
Церулоплазмін, мг/л	270,0 \pm 21,1	403,6 \pm 17,3*	290,6 \pm 33,1**	285,1 \pm 30,0**	271,4 \pm 31,9**

Дослідження *in vitro* вказують на необхідність створення більш високої концентрації мелатоніну для пригнічення окиснення ХС-LDL, ніж фізіологічний уміст цього гормону [19]. Проте, на нашу думку, ефективність дії цього гормона можна підвищити введенням інгібіторів NF-κB, оскільки це дозволяє зменшити рівень окисної модифікації ліпопротеїдів [20].

Так, за нашими даними, поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за умов експерименту зменшує концентрацію ТБК-активних сполук (табл. 3), яка на 39,9 % ($p < 0,001$) поступається результату другої серії, на 23,6 % ($p < 0,001$) – третьої та на 17,0 % ($p < 0,01$) – четвертої.

Проте приріст концентрації ТБК-активних сполук протягом 1,5-год інкубації достовірно не відрізняється від даних серій з застосуванням мелатоніну та метформіну окремо.

За цих умов активність SOD суттєво не змінюється порівняно з даними серій з застосуванням мелатоніну та метформіну окремо. Проте активність каталази збільшується та в 2,28 рази ($p < 0,001$) перевищує результат другої серії, на 75,0 % ($p < 0,001$) – третьої та на 41,7 % ($p < 0,01$) – четвертої серії.

Отримані результати вказують, що введення мелатоніну на тлі пригнічен-

ня NF-κB зменшує ознаки окисного стресу, пов'язаного з експресією низки NF-κB-залежних генів (індуцибельної NOS – iNOS, інтерлейкінів 1β, -6, -12, -18, TNF-α, -β) [21].

У той самий час пригнічення NF-κB може мати негативні наслідки, зокрема, зменшення синтезу та активності підконтрольних антиоксидантів (наприклад, супероксиддисмутази) [22], що може коригуватися введенням мелатоніну [23].

Таким чином, поєднане введення мелатоніну та метформіну гідрохлориду за умов відтворення синдрому IP та гіпопінеалізму не тільки коригує гіпомелатонінемію, але й потенціює низку метаболічних ефектів метформіну, спрямованих на корекцію гіперінсулінемії, порушень ліпідного обміну (дисліпопротеїнемії, гіпо-α-ліпопротеїнемії, гіпертріацилгліцеролемії), перекисного окиснення ліпідів. Пригнічення активації NF-κB дозволяє уникнути зменшення власне пінеальної секреції мелатоніну [6] та необхідності підвищення дози екзогенного гормону, оскільки тривале введення мелатоніну може супроводжуватися збільшенням в організмі щурів первинних і вторинних продуктів ПОЛ [13]. У той самий час мелатонін як антиоксидантна сполука може компенсувати порушення утилізації

Таблиця 3

Показники прооксидантно-антиоксидантного стану в крові щурів за умов відтворення синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму, а також поєднаної дії мелатоніну та метформіну гідрохлориду (M + m, n = 35)

Показник	Інтактні тварини	Модель синдрому інсулінорезистентності та гіпопінеалізму			
		Контроль	+ мелатонін	+ метформіну гідрохлорид	+ мелатонін + метформіну гідрохлорид
ТБК- активні сполуки, мкмоль/л	12,23 ± 0,82	22,63 ± 0,61*	17,79 ± 0,64*/**	16,38 ± 0,76*/**	13,60 ± 0,41**/****/*****
Приріст ТБК-активних сполук протягом інкубації, мкмоль/л	13,43 ± 2,17	25,34 ± 2,25*	18,2 ± 1,63**	17,75 ± 2,15**	16,11 ± 2,06**
SOD, од. акт.	2,13 ± 0,10	1,19 ± 0,09*	1,72 ± 0,18**	1,63 ± 0,25	1,77 ± 0,12*/**
Каталаза, од. акт.	1,87 ± 0,16	1,04 ± 0,09 *	1,36 ± 0,09*/**	1,68 ± 0,14**	2,38 ± 0,12**/****/*****

супероксидного аніон-радикала в разі зменшення синтезу супероксиддисмутази, гени якої контролюються NF-κB [22], за введення інгібітора активації цього транскрипційного чинника.

Висновки

1. Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за відтворення вуглеводно-ліпідної моделі синдрому ІР та гіпопінеалізму, індукованого цілодобовим освітленням, у більшому ступені зменшує прояви гіперінсулінемії, дисліпопротеїнемії, гіпо-α-ліпопротеїнемії та гіпертріацилгліцеролемії та концентрацію

головного маркера системної запальної відповіді – фактора некрозу пухлини-α, ніж застосування цих сполук окремо.

2. Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за відтворення вуглеводно-ліпідної моделі синдрому ІР та гіпопінеалізму, індукованого цілодобовим освітленням, у більшому ступені зменшує концентрацію вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів – ТБК-активних сполук, а також збільшує активність каталази, ніж це відбувається в разі застосування цих сполук окремо.

1. Загайко А. Л. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко. – Харків : Вид-во «Золоті сторінки», 2007. – 216 с.
2. Кайдашев І. П. Активация NF-κB при метаболічному синдромі / І. П. Кайдашев // Фізіологічний журнал. – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 93–101.
3. NF-κB-dependent airway inflammation triggers systemic insulin resistance / T. J. Cyphert, R. T. Morris, L. M. House [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2015. – V. 309, № 9. – P. R1144–R1152.
4. Талаш В. В. Вплив інгібіторів активації ядерного фактора κB на метаболізм і гемокоагуляцію за умов відтворення метаболічного синдрому / В. В. Талаш, В. О. Костенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 2. – С. 83–89.
5. Мелатонин и инсулинорезистентность / С. И. Рапопорт, А. Ю. Молчанов, В. А. Голиченков [и др.] // Клиническая медицина. – 2013. – № 11. – С. 8–14.
6. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa b (NFκB) in rat pineal gland / E. Cecon, P. A. Fernandes, L. [et al.] // Chronobiol. Int. – 2010. – V. 27, № 1. – P. 52–67.
7. Инсулинорезистентность и эндотелиальная дисфункция при метаболіческом синдроме / А. А. Куршаков, Р. Г. Сайфутдинов, Л. И. Анчикова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2011. – Т. 92, № 2. – С. 173–176.
8. Кузьминова И. А. Динамика изменений липидного спектра крови в условиях экспериментального гипопінеализма / И. А. Кузьминова, Л. А. Бондаренко // Проблемы эндокринной патологии. – 2006. – № 4. – С. 49–55.
9. Cardinali D. P. Melatonin, mitochondria, and the metabolic syndrome / D. P. Cardinali, D. E. Vigo // Cell. Mol. Life Sci. – 2017. – Aug 17. – doi: 10.1007/s00018-017-2611-0.
10. Markus R. P. Immune-pineal axis: nuclear factor κB (NF-κB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells / R. P. Markus, E. Cecon, M. A. Pires-Lapa // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14, № 6. – P. 10979–10997.
11. Vriend J. Melatonin as a proteasome inhibitor. Is there any clinical evidence? / V. Vriend, R. J. Reiter // Life Sci. – 2014. – V. 115, № 1–2. – P. 8–14.
12. Metformin inhibits TNF-α-induced I kappa B kinase phosphorylation, I kappa B alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3-dependent AMPK phosphorylation / Y. L. Huang, S. H. Chiang, C. H. Hsueh [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2009. – V. 134, № 2. – P. 169–175.
13. Вплив мелатоніну та цілодобового освітлення на прооксидантно-антиоксидантний баланс у щурів / О. М. Ларичева, С. В. Семенчук, О. О. Цвях [та ін.] // Науковий вісник Миколаївського держ. ун-ту ім. В. О. Сухомлинського : зб. наук. праць. – 2014. – Вип. 6.2 (107). – С. 40–45. – [Сер. «Біологічні науки»].
14. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II / E. Kravchuk, E. Grineva, A. Bairamov [et al.] // Exp. Diabetes Res. – 2011. – doi: 10.1155/2011/907496.
15. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва [та ін.] ; за ред. І. П. Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
16. Мелатонин при сахарном диабете: от патофизиологии к перспективам лечения / В. И. Коненков, В. В. Климентов, С. В. Мичурин [и др.] // Сахарный диабет. – 2013. – № 2. – С. 11–16

17. Amin A. H. Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis / A. H. Amin, M. A. El-Missiry, A. I. Othman // Eur. J. Pharmacol. – 2015. – V. 747. – P. 166–173.
18. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity / S. Nishida, T. Segawa, I. Murai, S. Nakagawa // J. Pineal. Res. – 2002. – V. 32, № 1. – P. 26–33.
19. Daily melatonin supplementation in mice increases atherosclerosis in proximal aorta / A. Tailleux, G. Torpier, D. Bonnefont-Rousselot [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – V. 293, № 3. – P. 1114–1123.
20. Morgan M. J. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling / M. J. Morgan, Z.-G. Liu // Cell Res. – 2011. – V. 21, № 1. – P. 103–115.
21. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation / L. Tornatore, A. K. Thotakura, J. Bennett [et al.] // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 557–566.
22. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF- κ B activation / T. C. Brady, L. Y. Chang, B. J. Day [et al.] // Am. J. Physiol. – 1997. – V. 273, № 5 (Pt 1). – P. L1002–L1006.
23. Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats / M. E. Buyukokuroglu, M. Cemek, Y. Yurumez [et al.] // Cell Biol. Toxicol. – 2008. – V. 24, № 2. – P. 151–158.

О. І. Белікова, В. С. Черно, В. О. Костенко

Поєднаний вплив мелатоніну та метформіну гідрохлориду на біохімічні маркери синдрому інсулінорезистентності за умов експериментального гіпопінеалізму

Мета дослідження – оцінка поєднаної дії екзогенного мелатоніну та метформіну гідрохлориду на вуглеводний і ліпідний обмін, а також вільнорадикальні процеси в організмі щурів у разі відтворення вуглеводно-ліпідної моделі синдрому інсулінорезистентності (IP) за умов гіпопінеалізму, індукованого цілодобовим освітленням.

Дослідження проведені на 35 білих щурах лінії Вістар масою 215–255 г у 5 серіях дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали в інтактних тварин (контрольна), у другій – після моделювання синдрому IP за умов експериментального гіпопінеалізму (висококалорійна вуглеводно-ліпідна дієта протягом 60 діб та цілодобове освітлення інтенсивністю 1500 лк протягом останніх 30 днів досліду), у третій і четвертій – протягом останніх 30 діб експерименту вводили, відповідно, екзогенний мелатонін (у дозі 0,3 мг/кг маси тіла на 1 добу) та метформіну гідрохлорид (у дозі 200 мг/кг маси тварини), у п'ятій – наведені сполуки застосовували разом.

Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за умов експерименту суттєво зменшує концентрацію глюкози в сироватці крові, яка на 53,0 % ($p < 0,001$) поступається даним другої та на 38,6 % ($p < 0,001$) – результату третьої серії. Концентрація інсуліну в сироватці крові суттєво зменшується та на 64,6 % ($p < 0,001$) поступається даним другої серії, на 57,0 % ($p < 0,001$) – третьої, на 33,8 % ($p < 0,01$) – четвертої серії. Індекс НОМА-IR знижується до $(0,24 \pm 0,06)$, що на 83,6 % ($p < 0,001$) поступається даним другої серії та на 74,5 % ($p < 0,01$) – третьої.

За цих умов нормалізується вміст холестеролу ліпопротеїнів високої щільності, який у 2,41 разу ($p < 0,001$) перевищує результат другої серії, на 65,7 % ($p < 0,01$) – третьої та на 34,9 % ($p < 0,01$) – четвертої серії.

Концентрація холестеролу ліпопротеїнів дуже низької щільності та триацилгліцеролів зменшується та поступається відповідно на 60,6 % ($p < 0,001$) і 60,6 % ($p < 0,001$) даним другої серії, на 42,2 % ($p < 0,01$) і 41,4 % ($p < 0,01$) – третьої та на 38,3 % ($p < 0,01$) і 37,9 % ($p < 0,01$) – четвертої серії.

Поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за умов експерименту зменшує концентрацію фактора некрозу пухлини - α , яка на 67,0 % ($p < 0,001$) поступається результату другої серії та на 43,3 % ($p < 0,02$) – третьої серії.

Водночас зменшується концентрація ТБК-активних сполук, яка на 39,9 % ($p < 0,001$) поступається результату другої серії, на 23,6 % ($p < 0,001$) – третьої, та на 17,0 % ($p < 0,01$) – четвертої серії. Активність супероксиддисмутази суттєво не змінюється порівняно з даними серій з окремим застосуванням мелатоніну та метформіну. Проте активність каталази збільшується та в 2,28 разу ($p < 0,001$) перевищує результат другої серії, на 75,0 % ($p < 0,001$) – третьої та на 41,7 % ($p < 0,01$) – четвертої серії.

Таким чином, поєднане застосування мелатоніну та метформіну гідрохлориду за відтворення синдрому IP та гіпопінеалізму у більшому ступені зменшує прояви гіперінсулінемії, дисліпопротеїнемії, гіпо- α -ліпопротеїнемії, гіпертриацилгліцеролемії, системної запальної відповіді та окисного стресу, ніж введення цих сполук окремо.

Ключові слова: синдром інсулінорезистентності, гіпопінеалізм, мелатонін, метформіну гідрохлорид

Е. И. Беликова, В. С. Черно, В. А. Костенко

Сочетанное влияние мелатонина и метформина гидрохлорида на биохимические маркеры синдрома инсулинорезистентности при экспериментальном гипопинеализме

Цель исследования – оценка сочетанного действия экзогенного мелатонина и метформина гидрохлорида на углеводный и липидный обмен, а также свободнорадикальные процессы в организме при воспроизведении углеводно-липидной модели синдрома инсулинорезистентности (ИР) в условиях гипопинеализма, индуцированного круглосуточным освещением.

Исследования были проведены на 35 белых крысах линии Вистар массой 215–255 г в 5 сериях опытов: в первой необходимые показатели изучали у интактных животных (контрольная серия), во второй – после моделирования синдрома ИР в условиях экспериментального гипопинеализма (высококалорийная углеводно-липидная диета в течение 60 суток и круглосуточное освещение интенсивностью 1500 лк в течение последних 30 дней опыта), в третьей и четвертой – в течение последних 30 дней эксперимента вводили, соответственно, экзогенный мелатонин (в дозе 0,3 мг/кг массы тела в сутки) и метформина гидрохлорид (в дозе 200 мг/кг массы животного), в пятой – указанные соединения применяли вместе.

Сочетанное применение мелатонина и метформина гидрохлорида в условиях эксперимента существенно уменьшает концентрацию глюкозы в сыворотке крови, которая на 53,0 % ($p < 0,001$) уступает данным второй серии и на 38,6 % ($p < 0,001$) – результату третьей серии. При этом концентрация инсулина в сыворотке крови существенно уменьшается и на 64,6 % ($p < 0,001$) уступает данным второй серии, на 57,0 % ($p < 0,001$) – третьей, на 33,8 % ($p < 0,01$) – четвертой. Индекс НОМА-ИР снижается до $(0,24 \pm 0,06)$, что на 83,6 % ($p < 0,001$) уступает данным второй серии и на 74,5 % ($p < 0,01$) – третьей серии.

В этих условиях нормализуется содержание холестерина липопротеинов высокой плотности, который в 2,41 раза ($p < 0,001$) превышает результат второй серии, на 65,7 % ($p < 0,01$) – третьей и на 34,9 % ($p < 0,01$) – четвертой серии.

Концентрация холестерина липопротеинов очень низкой плотности и триацилглицеролов уменьшается и уступает на 60,6 % ($p < 0,001$) и 60,6 % ($p < 0,001$) данным второй серии, на 42,2 % ($p < 0,01$) и 41,4 % ($p < 0,01$) – третьей, на 38,3 % ($p < 0,01$) и 37,9% ($p < 0,01$) – четвертой серии соответственно.

Сочетанное применение мелатонина и метформина гидрохлорида в условиях эксперимента уменьшает концентрацию фактора некроза опухоли- α , которая на 67,0 % ($p < 0,001$) уступает результату второй серии и на 43,3 % ($p < 0,02$) – третьей серии.

При этом уменьшается концентрация ТБК-активных соединений, которая на 39,9 % ($p < 0,001$) уступает результату второй серии, на 23,6 % ($p < 0,001$) – третьей и на 17,0 % ($p < 0,01$) – четвертой серии. Активность супероксиддисмутазы существенно не меняется по сравнению с данными серий с изолированным применением мелатонина и метформина. Однако активность каталазы увеличивается и в 2,28 раза ($p < 0,001$) превышает результат второй серии, на 75,0 % ($p < 0,001$) – третьей и на 41,7 % ($p < 0,01$) – четвертой серии.

Таким образом, сочетанное применение мелатонина и метформина гидрохлорида при воспроизведении синдрома инсулинорезистентности в условиях гипопинеализма в большей степени уменьшает проявления гиперинсулинемии, дислипидопротеинемии, гипо- α -липопротеинемии, гипертриацилглицеролемии, системного воспалительного ответа и окислительного стресса, чем изолированное применение этих соединений.

Ключевые слова: синдром инсулинорезистентности, гипопинеализм, мелатонин, метформина гидрохлорид

O. I. Belikova, V. S. Chernov, V. O. Kostenko

Effects produced by co-administration of melatonin and metformin hydrochloride on biochemical markers of insulin resistance syndrome in modeled hypopinealism

The objective of the study was to evaluate the combined effect of exogenous melatonin and metformin hydrochloride on carbohydrate and lipid metabolism as well as on free radical processes in the body of rats during the carbohydrate-lipid modeling of insulin resistance (IR) syndrome under hypopinealism induced by round-the-clock lighting.

The study was performed on 35 Wistar white male rats weighing 215–255 g in 5 series of experiments. The first series was designed to identify the necessary parameters of intact animals (control series); the second series was designed to obtain the parameters in the rats after the development of modeled IR syndrome under experimental hypopinealism (high calorie for 60 days and round-the-clock lighting with intensity of 1500 lx for the last 30 days); in the third and fourth series, during the last 30 days of the experiment, test animals with modeled IR syndrome were administered exogenous melatonin in a dose of 0,3 mg/kg body weight and metformin hydrochloride in a dose of 200 mg/kg respectively; and in the fifth series, these compounds were co-administered.

The co-administration of melatonin and metformin hydrochloride in the experimental conditions significantly reduces the blood glucose concentration, which is by 53,0 % ($p < 0,001$) inferior to that of the

second series and by 38,6 % ($p < 0,001$) compared with the result of the third series. At the same time, the concentration of serum insulin considerably decreases, and is observed by 64,6 % ($p < 0,001$) inferior to the second series, by 57,0 % ($p < 0,001$) lower than in the third series, and by 33,8 % ($p < 0,01$) inferior to the fourth group. The HOMA-IR index goes down to $(0,24 \pm 0,06)$ that is by 83,6 % ($p < 0,001$) inferior to the second series and by 74,5 % ($p < 0,01$) lower than in the third series.

Under these conditions, the content of high density lipoprotein cholesterol is normal that is 2,41 times higher ($p < 0,001$) than this parameter of the second series, and by 65,7 % ($p < 0,01$) higher compared with the third group and by 34,9 % ($p < 0,01$) higher that in the fourth series.

The concentration of very low density lipoprotein cholesterol and triacylglycerols decreases and is inferior by 60,6 % ($p < 0,001$) and by 60,6 % ($p < 0,001$) to the parameters of the the second series respectively, and by 42,2 % ($p < 0,01$) and 41,4 % ($p < 0,01$) lower than that in the third and by 38,3 % ($p < 0,01$) and 37,9 % ($p < 0,01$) lower than in the fourth series.

The co-administration of melatonin and metformin hydrochloride in experimental conditions reduces the concentration of tumor necrosis factor- α , which is by 67,0 % ($p < 0,001$) inferior to the findings of the second series and by 43,3 % ($p < 0,02$) lower than the findings in the third series.

In this case, the concentration of TBK-active compounds decreases that which is by 39,9 % ($p < 0,001$) inferior to the findings of the second series; by 23,6 % ($p < 0,001$) lower than in the third group, and by 17,0 % ($p < 0,01$) inferior to that in the fourth series. The superoxide dismutase activity is not considerably changed compared with the the findings obtained in the series with isolated administration of melatonin and metformin. However, the catalase activity increases and 2,28 times ($p < 0,001$) exceeds the findings of the second series, and by 75,0 % ($p < 0,001$) higher the third group and by 41,7 % ($p < 0,01$) higher in the fourth series.

Thus, the co-administration of melatonin and metformin hydrochloride under the modeling of the insulin resistance syndrome under hypopinealism reduces the manifestations of hyperinsulinemia, dyslipoproteinemia, hypo- α -lipoproteinemia, hypertriacylglycerolemia, systemic inflammatory response and oxidative stress in a large measure than isolated administration of these compounds.

Key words: insulin resistance syndrome, hypopinealism, melatonin, metformin hydrochloride

Надійшла: 28 серпня 2017 р.

Контактна особа: Черно Валерій Степанович, доктор медичних наук, кафедра лабораторної діагностики, Миколаївський національний університет імені В. О. Сухомлинського, буд. 2А, вул. Мореходна, м. Миколаїв, 54000. Тел.: + 38 0 512 76 98 22.
Електронна пошта: cherno1965@gmail.com

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О.Ю. Баглай,
А.К. Вороніна, А. М. Демченко

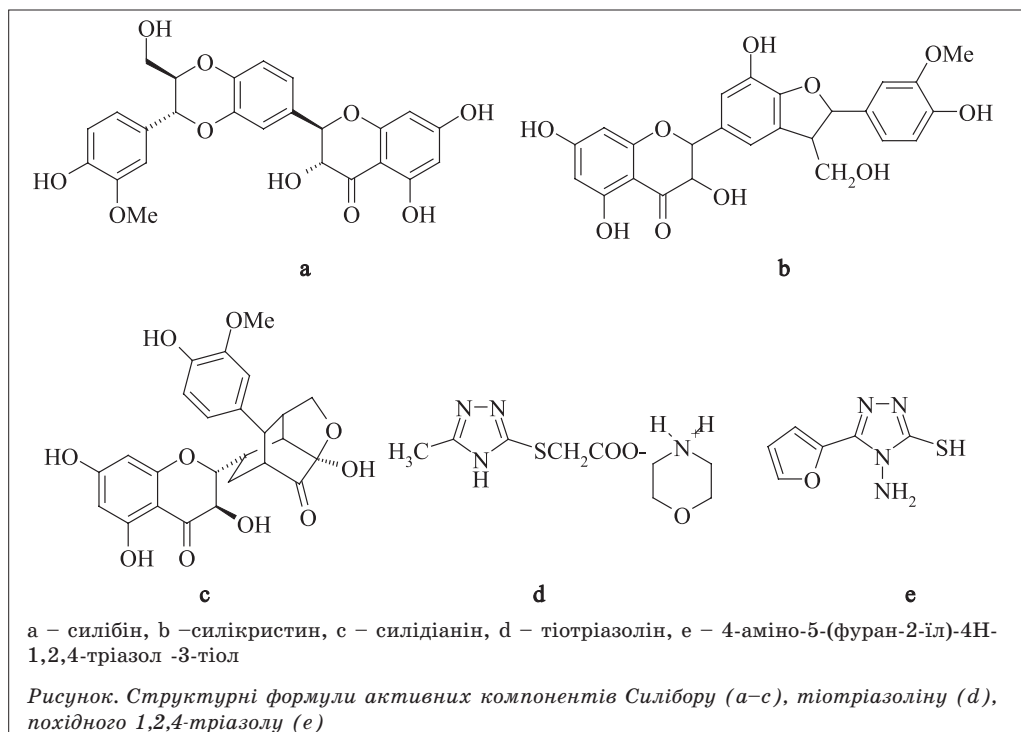
Гепатопротекторна активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd] азулену

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

Ключові слова: гепатопротекторна активність, модель парацетамолового гепатиту, похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену

Сьогодні число хворих на гостру печінкову недостатність медикаментозного походження зростає, насамперед, за рахунок поширеного самолікування та безконтрольного застосування парацетамолу [1]. За гострих та хронічних гепатитів різного генезу високим позитивним ефектом характеризується Антраль – препарат на основі координаційної сполуки алюмінію з амінокарбоною кислотою [2]. Відомо, що гепатопротекторна активність притаманна тіотріазоліну та препарату рослинного походження Силі-

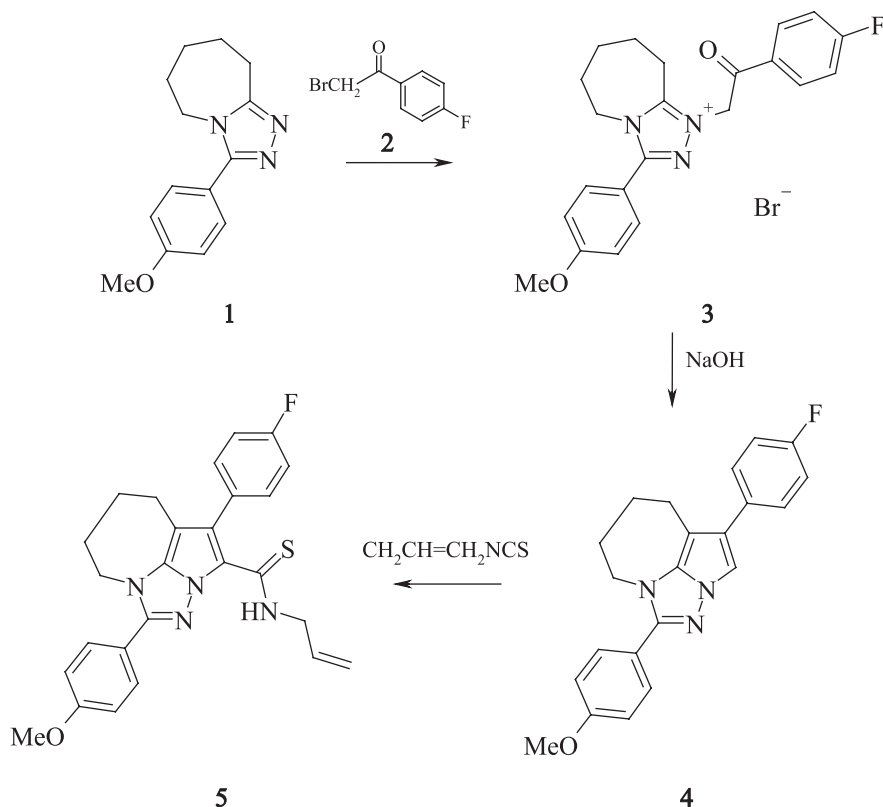
бору, активні компоненти якого представлені силімарином, а саме ізомерами силібіним (а), силікрістином (b) та силідіаніном (с) (рисунок). Гепатопротекторна активність похідного тріазолу – (4-аміно-5-(фуран-2-іл)4Н-1,2,4-тріазол-3-тіолу) вивчена на моделі парацетамолового гепатиту [3]. Нашу увагу привернули похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену, а саме 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулен (4) та N-алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазациклопента [сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) (схема).



Мета дослідження – вивчити гепатопротекторну активність похідних 5, 6, 7, 8-тетрагідро-2, 2а, 8а-тріазаціклопента[сd]азулену на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Матеріали та методи. Досліджувани сполуки 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-

тріазаціклопента[сd]азулен (4) та N-алілтїоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) були синтезовані у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за схемою:



Для первинної оцінки гепатопротекторної активності синтезованих сполук було вибрано модель медикаментозного гепатиту, викликаного парацетамолом [4]. Оскільки парацетамол-індуковане uszkodження печінки добре вивчене та швидко відтворюється за лабораторних умов, дана модель стала стандартною в фармакології й токсикології. Зокрема, передозування парацетамолу в гризунів часто використовують для дослідження гепатопротекторного потенціалу лікарських рослин. Миші більш чутливі до гепатотоксичної дії парацетамолу порівняно зі щурами [5]. З метою вивчення гепатопротекторної активності досліджуваних сполук моделювали парацетамол-індукований гепатит у мишей [6].

До початку даного дослідження Комітет з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» розглянув і схвалив процедури, пов'язані з утриманням тварин та їхнім використанням в експерименті. Досліди проводили на ставовозрілих білих мишах-самицях з масою тіла 18–22 г, розведення ПП «Біомодельсервіс». Тваринам згодовували *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин. Воду з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавали *ad libitum*. Як підстилку використовували тирсу вільхи (*Alnus glutinosa*), яку попередньо стерилізували в автоклаві. У кімнатах для утримання тварин підтримували

наступні умови: температуру – 20–24 °С, вологість – 30–70 %, цикл освітлення – 12 год світло/12 год темрява.

Для відтворення моделі медикаментозного гепатиту одноразово внутрішньо-шлунково вводили парацетамол у дозі 300 мг/кг маси тіла у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю з розрахунку 0,5 мл розчину на 20 г маси тіла тварини. Досліджувані речовини – похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену (4 та 5 відповідно) вводили за 1 год до введення парацетамолу в дозі 25 мг/кг маси тіла.

Для експерименту було відібрано 28 тварин, яких було розподілено на чотири групи по 7 тварин у кожній: перша група – інтактні тварини; друга група (контроль – модель медикаментозного гепатиту); тваринам третьої та четвертої груп за 1 год до введення парацетамолу вводили досліджувані речовини – похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену (4 та 5 відповідно). Через 18 год після введення парацетамолу в тварин під легким ефірним наркозом брали зразки крові для біохімічних досліджень, потім здійснювали евтаназію шляхом цервікальної дислокації.

Біохімічні показники сироватки крові були досліджені у день отримання за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Prestige 24і, Японія. У сироватці досліджували активність аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та гама-глутамат-амінотрансферази (ГГТ) з використанням тест-систем фірми Cormay, Польща.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням MS Excel. Дані наведені як середнє значення ± похибка середнього значення ($M \pm m$). Аналіз вірогідності результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між показниками досліду та контролю вважали статистично вірогідною за значення $p < 0,05$.

3-(4¹-Метоксифеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін 1 одержано конденсацією 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіну з гідратом 4-метоксибензойної кислоти та

подальшою циклізацією проміжного продукту за методом [7].

Спектри ПМР були зареєстровані на спектрометрі Bruker DAX500, робоча частота 500,13 МГц, внутрішній стандарт ТМС. Контроль за чистотою синтезованих сполук здійснювали за допомогою ТПХ на пластинках Silufol UV-254 у системі хлороформ–метанол 9:1.

1-(4¹-Метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулен (4). Суміш 2,43 г (0,01 моль) 3-(4¹-метоксифеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепіну (1) та 2,17 г (0,01 моль) 4-флуорофенацилброміду 2 кип'ятили в 80 мл етилацетату 1 год. Після охолодження розчинник декантували, залишок – четвертинну сіль 3 – промивали етером, доливали 40 мл 5 % розчину NaOH і кип'ятили реакційну суміш 3 год. Після охолодження осад відфільтрували, промивали водою, сушили. Очищали кристалізацією з бензену. Вихід 1,48 г (41 %). $T_{пл.} = 233-235$ °С. Знайдено, %: N 11,6, $C_{22}H_{20}FN_3O$. Розраховано, %: N 11,4. ЯМР ¹H (δ, м.ч., DMSO-d₆): 2,01 (м, 4Н, 6,7-CH₂CH₂), 2,81 (м, 2Н, 5-CH₂), 3,85 (с, 3Н, OCH₃), 4,06 (м, 2Н, 8-CH₂), 7,07 та 7,71 (д-д, 4Н, C₆H₄), 7,14 (с, 1Н, 3-Н), 7,09–7,48 (м, 4Н, C₆H₄).

N-Алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5). До розчину 1,81 г (0,005 моль) сполуки (4) у 25 мл сухого бензену при перемішуванні додавали 0,496 г (0,005 моль) алілізотіоціанату та кип'ятили протягом 1 год. Розчин охолоджували, осад фільтрували, сушили, очищали кристалізацією з бензену. Вихід 1,80 г (78 %). $T_{пл.} = 216-217$ °С. Знайдено, %: N 12,5, $C_{26}H_{25}FN_4OS$. Розраховано, %: N 12,2. ЯМР ¹H (δ, м.ч., DMSO-d₆): 1,97–2,12 (м, 4Н, 6,7-CH₂CH₂), 2,82 (м, 2Н, 5-CH₂), 3,80 (с, 3Н, OCH₃), 4,20 (м, 2Н, 8-CH₂), 4,41 (м, 2Н, CH₂-CH=CH₂), 5,16–5,37 (м, 2Н, CH₂-CH=CH₂), 6,02 (м, 1Н, CH₂-CH=CH₂), 7,01–7,27 (м, 4Н, C₆H₄), 7,09 та 7,72 (д-д, 4Н, C₆H₄), 9,35 (т, 1Н, NH).

Результати та їх обговорення. Аналіз показників загального фізичного стану

Біохімічні показники сироватки крові мишей самиць за моделлю парацетамол-індукованого гепатиту за введення досліджуваних сполук ($M \pm m, n \geq 5$)

Експериментальна група	АлАТ, МО/л	АсАТ, МО/л	ЛФ, МО/л	ГГТ, МО/л
Інтактні	60,3 ± 4,7	320,8 ± 34,7	264,6 ± 22,5	4,65 ± 1,53
Контроль	378,2 ± 84,8*	609,3 ± 84,5	434,4 ± 56,8*	6,70 ± 0,78
Сполука 4	180,7 ± 104,3	458,0 ± 49,2	275,2 ± 23,9**	7,02 ± 1,01
Сполука 5	145,3 ± 78,1	454,5 ± 70,5	305,2 ± 43,4	5,28 ± 0,30

Примітка. *Вірогідні зміни порівняно з інтактними тваринами; **вірогідні зміни порівняно з контролем.

тварин показав, що після введення парацетамолу в тварин контрольної групи зафіксовано виражене зниження спонтанної рухової активності, яке зберігалось протягом 14 год і повністю так і не відновилось. У тварин третьої і четвертої груп, яким перед введенням парацетамолу застосовували сполуки 4 та 5, теж спостерігали зниження спонтанної рухової активності, але в значно меншій мірі, і вона повністю відновилась через 4 год.

У таблиці наведено дані дослідження біохімічних показників сироватки крові мишей. У тварин контрольної групи зросла активність амінотрансфераз АлАТ і АсАТ у 6,3 та 1,9 разу відповідно порівняно з показниками в інтактних тварин. Також у сироватці крові мишей даної групи збільшилась активність ЛФ на 55 % і активність ГГТ на 44 %. Це свідчить про активацію маркерних ферментів цитолізу за введення парацетамолу й некрозодистрофічні порушення у гепатоцитах.

На експериментальній моделі медикаментозного гепатиту вивчали гепатопротекторні властивості сполук 4 та 5 у лікувально-профілактичному режимі. У разі введення сполуки 4 активність ЛФ була вірогідно меншою порівняно з контрольною групою (таблиця), тобто застосування даної сполуки повністю запобігало зростанню активності ЛФ, і даний показник залишився на рівні інтактної групи. Також під впливом сполуки 4 відмічали тенденцію до зниження активності АлАТ і АсАТ на 52 та 25 % відповідно порівняно з показ-

никами контрольної групи. Введення сполуки 4 жодним чином не вплинуло на активність ГГТ у сироватці крові тварин.

У разі введення сполуки 5 вірогідних змін активності досліджуваних ферментів не зареєстровано, проте також спостерігали тенденцію до зниження даних показників відносно тварин контрольної групи. Так, активність АлАТ знизилася на 62 %, АсАТ і ГГТ – на 25 %, а ЛФ – на 30 % (таблиця).

Висновки

1. Досліджувані сполуки 1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріаза-циклопента[сd]азулен (4) та N-алілтіоамід-1-(4¹-метоксифеніл)-4-(4²-флуорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти (5) на експериментальній моделі медикаментозного гепатиту в лікувально-профілактичному режимі проявили гепатопротекторну активність на рівні тенденції щодо зниження активності АлАТ і АсАТ.
2. Застосування сполуки 4 повністю запобігало зростанню активності ЛФ у сироватці крові тварин порівняно з відповідними показниками в групі контрольної патології (вірогідне зменшення порівняно з контрольною групою).
3. Отримані дані створюють передумови для подальшого вивчення гепатопротекторної активності похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазаціклопента[сd]азулену.

1. Голубчиков М. В. Статистичний огляд захворюваності населення України на хвороби печінки та жовчовивідних шляхів / М. В. Голубчиков // Сучасна гастроентерологія і гепатологія. – 2000. – № 2. – С. 53–55.

2. Фролов В. М. Досвід і перспективи застосування нового препарату Антраль у клінічній практиці / В. М. Фролов, Г. С. Григор'єва, І. В. Лоскутова // Фармакологічний вісник. – 2000. – № 2. – С. 2–5.

3. Исследование фармакологической активности 4-амино-5-(фуран-2-ил)4Н-1,2,4-триазол-3-тиола при парацетамоловом гепатите / И. М. Белай, Е. О. Михайлюк, В. В. Парченко [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 114–117.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
5. Acetaminophen-induced Liver Injury in Rats and Mice: Comparison of Protein Adducts, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Mechanism of Toxicity / M. R. McGill, C. D. Williams, Y. Xie [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 2012. – V. 264, № 3. – P. 387–394.
6. Kelava T. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury / T. Kelava, I. Cavar, F. Culo // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – V. 88. – P. 960–967.
7. Petersen S. Reaktionen cyclischer lactimäther mit acylierten hydrazinderivaten / S. Petersen, E. Tietze // Chem. Ber. – 1957. – V. 90, Is. 6. – P. 909–921.

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О. Ю. Баглай, А. К. Вороніна, А. М. Демченко
Гепатопротекторна активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену

Мета дослідження – вивчити гепатопротекторну активність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Оцінено гепатопротекторні властивості похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену на експериментальній моделі медикаментозного гепатиту в лікувально-профілактичному режимі. Показано, що досліджувані сполуки знижували активність АлАТ до 52–62 % та АсАТ на 25 %, а сполука 5 знизила активність ЛФ на 30 % порівняно з відповідними показниками в групі контрольної патології. У разі застосування сполуки 4 активність ЛФ залишилась на рівні інтактних тварин. Отримані результати вказують на перспективність похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену як сполук з потенційною гепатопротекторною дією.

Ключові слова: гепатопротекторна активність, модель медикаментозного гепатиту, похідні 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену

С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, А. Ю. Баглай, А. К. Вороніна, А. М. Демченко
Гепатопротекторная активность производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена

Цель исследования – изучить гепатопротекторную активность производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена на этапе первичного фармакологического скрининга.

Оценены гепатопротекторные свойства производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена на экспериментальной модели медикаментозного гепатита в лечебно-профилактическом режиме. Показано, что исследуемые соединения снижали активность АлАТ на 52–62 % и АсАТ на 25 %, а соединение 5 снижало активность ЩФ на 30 % по сравнению с соответствующими показателями в группе контрольной патологии. При применении соединения 4 активность ЩФ оставалась на уровне интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена как соединений с потенциальной гепатопротекторной активностью.

Ключевые слова: гепатопротекторная активность, модель медикаментозного гепатита, производные 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена

S. A. Demchenko, L. S. Bobkova, A. Y. Bahlai, A. K. Voronina, A. M. Demchenko
Hepatoprotective activity of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2а,8а-triazacyclopenta[сd]azulene

The aim of research was to investigate the hepatoprotective activity of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2а,8а-triazacyclopenta[сd]azulene at the stage of primary pharmacological screening. The hepatoprotective properties of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2а,8а-triazacyclopenta[сd]azulene on the experimental model of drug-induced hepatitis in the treatment-and-prophylactic regimen were estimated. It was shown that the tested compounds decreased the activity of ALT (52–62 %) and AST on 25 %, tested compounds 5 decreased ALP on 30 % in comparison with the corresponding parameters in the control pathology group. When use the tested compound 4, the activity of alkaline phosphatase was at the level of intact animals. The results obtained indicate the prospect of the derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2а, 8а-triazacyclopenta[сd]azulene as compounds with potential hepatoprotective activity.

Key words: hepatoprotective activity, model of drug-induced hepatitis, 5,6,7,8-tetrahydro-2,2а,8а-triazacyclopenta[сd]azulene derivatives

Надійшла: 1 серпня 2017 р.

Контактна особа: Баглай Олександр Юрійович, провідний інженер, відділ медичної хімії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18. Електронна пошта: demch7758@ukr.net

A. Khromov¹, N. Dobrelya¹, I. Strielkov¹, K. Klymenko¹,
T. Novokhatska¹, V. Dosenko², A. Soloviev¹

Inhibition of PKC-delta expression using siRNAs restores coronary dilation in rats with streptozotocin-induced diabetes

¹*Institute of pharmacology and toxicology of the National academy of medical sciences of Ukraine, Kiev*

²*Bogomoletz institute of physiology of National academy of science of Ukraine, Kiev*

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, protein kinase C, siRNAs, coronary flow, myocardial contractility

In 2014, the prevalence of diabetes was 8,5 % among adults (aged 18 and more). The number of people with diabetes has quadrupled, from 108 million in 1980 to 422 million in 2014 [1, 2]. Diabetes will become the seventh leading cause of death by 2030 according to the prediction of WHO [3]. The complications developing as a result of the systemic metabolic disorders are the main reason of suffering in patients with diabetes mellitus. Hyperglycemia, dyslipidemia, genetic, epigenetic modulators, tissue response on the toxic metabolites lead to occlusion of the large (coronary insufficiency, atherosclerosis) and peripheral vessels (retinopathy, nephropathy, and neuropathy) [4]. The prolonged exposure of myocardium to hyperglycemia results in diabetic cardiomyopathy. The latter is characterized by the left ventricular hypertrophy, fibrosis, apoptosis and necrosis of cardiomyocytes. All these factors cause the serious impairment of the cardiac contractile function resulting in the heart failure [5, 6]. It has been suggested that coronary insufficiency in patients with both I and II type of diabetes mellitus (DM) is mainly associated with impaired endothelium-dependent relaxation of the coronary arteries probably caused by the subendothelial and endothelial fibrosis. This complication is associated with significantly reduced coronary blood flow and increased risk of myocardial infarction [7–9]. Protein kinase C (PKC) is known

to play an important role in the manifestation of detrimental effects of hyperglycemia in cardiovascular system. It has been shown that the PKC activation may be a key factor in the coronary circulatory dysfunction, fibrosis and cardiomyopathy development, increase of vascular permeability, etc [10]. The expression of delta-isoform of PKC (PKC- δ) in the heart appears to be significantly increased in diabetes mellitus. However, its role in development of the above mentioned pathological processes remains to be elucidated [11, 12].

The aim of the study was to investigate the possible involvement of PKC- δ in the development of coronary circulatory and cardiac contractile malfunction in rats with experimental diabetes mellitus.

Materials and methods. *Ethical approval.* All experimental procedures conformed to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and were approved by the Ethics Committee of the Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine.

Diabetes mellitus animal model. The experiments were conducted on 42 white male rats (276 ± 15 g), which had free access to food and water and were kept in animal house at a temperature of (23 ± 2) °C with a 12-h light/dark cycle. All animals were randomly distributed into 3 groups of 14 animals each. In animals of two groups, the development of diabetes mellitus has been induced, while the third group served as the control (healthy). The animals of one of the

experimental groups were injected with siRNAs that inhibits expression of δ -isoforms PKC (PRKCD-siRNAs). Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in a dose of 65 mg/kg. STZ was dissolved in the buffer solution containing 0,9 % NaCl and 10 mmol/L citrate, pH 4,6. Rats of the control group were injected intraperitoneally with a citrate buffer used for dilution of STZ. The animals were taken into the experiment 2 months after the STZ injection. In the RNA-interference studies we used hearts from diabetic rats on the third month of diabetes, diabetic rats on the seventh day after siRNAs targeted to PKC- δ isoform administration, and age-matched control healthy rats.

Measurement of blood glucose levels in the rats. The plasma concentration of glucose was measured in all animals 1 month after STZ injection and on the day of the experiment. The plasma glucose levels were measured immediately before the administration of small interfering RNA and on the day of the experiment. The glucose levels were measured using glucometer Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Switzerland).

Total mRNA isolation and real-time (RT) polymerase chain reaction (PCR). Total RNA was isolated from rat heart tissue using a Trizol RNA-prep kit (Isogen, Russian Federation) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined with NanoDrop spectrophotometer ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was performed with RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), using 200–300 ng of total RNA and a random hexamer primer. Single-chain DNA was used for real-time PCR (RT-PCR).

We performed amplification in 10 μ l of SYBR Green PCR Master Mix containing 30 pmol of each primer. For amplification mRNA delta PKC and β -actin (housekeeping gene) fragments, we used the following primers: PKC delta sense 5' -CTG GAA TAG TGA GCT CCC AGA C -3' and antisense 5' -ATC ACC AGT CAC CCA CTC TTC T -3'; β -actin sense 5'

-TGT TAC GTC GCC TTG GAT TTT GAG -3' and antisense 5' -AAG AGA GAG ACA TAT CAG AAG C -3'. The primers were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany). The sample volume was driven to 20 μ l with deionized water. An amplification was performed on thermocycler 7500 Fast Real-Time PCR System. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation and AmpliTaq Gold® DNA polymerase activation step at 95 °C for 10 min, followed by the treatments at 95 °C for 20 s, and at 65 °C for 45 s and for 50 cycles, followed by the dissociation step. For control of specificity, we performed dissociation stage-sequential increase of temperature from 65 °C to 95 °C with registration of the drop in the double-stranded DNA-SYBR Green complexes fluorescence strength. We performed calculations using the 7500 Fast System SDS software provided. The CT (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescence signal to exceed the detection threshold. The expression of the target gene relative to the housekeeping gene was calculated as the difference between the threshold values of the two genes.

Inhibition of PRKCD expression using siRNA in vivo. Small interfering RNAs (siRNA) used for suppression of δ -isoform PKC gene (PRKCD) were synthesized on demand by Metabion company (Germany). siRNAs for PRKCD gene had the following sequence: PRKCD-S-5'-GGA AAG GUA CUU UGC AAU CUU -3'; PRKCD-A-5'-AGA UCU UUU GUU UCU GAG UUU -3'. Before the experiments, double-stranded RNA was obtained by annealing of single strands. For this purpose, the solutions of respective sense and antisense oligonucleotides were mixed with buffer for annealing of the following composition (in mmol/L): 30 HEPES-KOH pH 7,4, 100 KCl, 2 MgCl₂, 50 NH₄C₂H₃O₂ (Metabion, Germany). Oligonucleotides were dissolved in two steps: at first, the equal volumes of each solution of oligonucleotides were transferred into the separate test tubes, and then the same amounts of annealing buffer were added to these tubes.

After such a mixing of the sense and antisense oligonucleotide solutions in a

test tube, the 4-fold smaller volume of annealing buffer was added to the mixture. The resulting mixture was incubated for 1 min at 90 °C and then cooled for 45 min at the room temperature. Annealing was performed using thermal cycler GeneAmp System 2700 (Applied Biosystems, USA). The double-stranded siRNAs was injected intravenously in the tail vein of rats in a dose of 400 µg/kg twice with a 24-hour interval between injections. The experiments were conducted one week after siRNAs injections.

Non-invasive measurement of blood pressure. The rat tail was placed inside the tail cuff. Then, the cuff was inflated and released a few times to accustom the animal to this procedure. Systolic blood pressure values (three consecutive readings) were obtained using a tail sphygmomanometer (S-2 Hugo-Sachs Elektronik, Germany) connected to analog-to-digital converter PowerLab 4/30 (ADInstruments, Australia).

Langendorff preparation of isolated heart perfused at constant flow. The animals were anesthetized with chloralose-urethane mixture (0,2 g chloralose and 2,0 g urethane in 100 ml of distilled water) in dose 2,0 ml / 100 g b.m. after intraperitoneal injection of 500 IU heparin. Thereafter, the animal thorax was opened from bilateral axillary lines up to the first rib under artificial ventilation. Then, the ascending aorta was cannulated and the heart was carefully isolated from the body (all vessels were cut out) and transferred immediately to a constant flow Langendorff rat isolated heart set up. The isolated spontaneously beating hearts were continuously perfused with Krebs-Henseleit solution (at 37 °C, pH = 7,4, gassed with 95 % O₂ + 5 % CO₂ and perfusion flow (14,07 ± 0,52) ml/min) with the following composition (in mmol/L): NaCl, 118; KCl, 7,4; NaHCO₃, 25,0; KH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 2,5; MgSO₄·7H₂O, 1,2; glucose, 11,0. A distilled water-filled latex balloon connected to a pressure transducer was introduced in the left ventricle. Left ventricular end-diastolic pressure was initially set to 5 mm Hg by balloon inflation. The pressure transducers and ECG electrodes were connected to converter PowerLab

4/30 (ADInstruments, Australia). A 15 min period was allowed for the heart to reach a steady state prior to any treatment [13].

Due to the fact that the response of coronary arteries to acetylcholine is not sufficiently pronounced in rat, we assessed the ability of the coronary arteries to relax basing on their reaction to isoproterenol administration. Responses to isoproterenol have been shown to be mediated by coronary endothelium as well as those induced by acetylcholine [14]. Myocardial function was assessed using applications of various concentrations of beta-adrenoreceptor agonist isoproterenol (10⁻⁶–10⁻⁸ mol/l).

Chemicals. Trizol RNA-prep kit (Isogen, Russian Federation); RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA); siRNAs for PRKCD gene and substances of buffer for annealing (Metabion, Germany). All other substances and constituents of the Krebs solution were obtained from Sigma-Aldrich, USA.

Statistical analysis. Recordings and data analysis were made using «Chart 5» software (ADInstruments, Australia). Data were statistically analyzed with «Statistica 8» (StatSoft Inc., USA). Data distribution was tested for normality using the Shapiro-Wilk test. In case of normal distribution, the values were presented as means ± SEM (standard error of the mean). In all other cases, the values were presented as median, 25th and 75th quartile. Nonparametric comparisons of multiple dependent samples were performed using Friedman ANOVA test and Kendall coefficient of concordance. Multiple comparisons were performed using Kruskal-Wallis ANOVA test with appropriate Newman-Keuls post hoc test. Difference was considered significant if $p < 0,05$.

Results and discussion. The effects of STZ-treatment on blood glucose and body mass are summarized in Table 1. In 2-months diabetic animals, blood glucose level was significantly increased and body mass was significantly lower than in control animals. It should be noted that the injection of PRKCD-siRNAs did not significantly affect the blood glucose

General effects of STZ treatment ($M \pm SEM$)

	Baseline	2-months healthy (n = 14)	2-months diabetic (n = 28)
Body mass, g	276 \pm 15	323 \pm 18 p1 = 0,09971	205 \pm 17 p1 = 0,00296 p2 = 0,00010
Blood glucose, mmol/L	6,7 \pm 0,5	6,9 \pm 0,2 p1 = 0,82081	30,0 \pm 0,5 p1 = 0,0 p2 = 0,0
Mean blood pressure, mm Hg	112,7 \pm 1,6	113,3 \pm 1,2 p1 = 0,83518	126,5 \pm 3,9 p1 = 0,00043 p2 = 0,02369

Notes. p1 – vs. Baseline, p2 – vs. 2-months healthy.

concentration in the rats with experimental diabetes (28,7 \pm 0,9 mmol/L; n = 14; p > 0,05). The initial systolic blood pressure in the rats was (112,7 \pm 1,6) mm Hg. The development of STZ-induced hyperglycemia in the animals of experimental groups resulted in significant blood pressure increase by 12 % (up to 126,5 \pm 3,9 mm Hg; p < 0,00044). The injection of PRKCD-siRNAs had no significant effect on the blood pressure as well (123,7 \pm 3,9 mm Hg; p > 0,05).

The use of RT-PCR revealed the presence of the PKC-delta isoform in adult rat cardiac myocytes. It has been noted that PKC-delta expression levels in rat hearts were significantly lower compared to the aortic tissues [15]. Furthermore, there was no significant difference between PKC-delta expression in hearts of control and STZ-treated animals (0,20 \pm 0,05 vs. 0,19 \pm 0,05 relative units). PKC-delta gene silencing led to insignificant decrease in PKC-delta expression to

(0,17 \pm 0,04 n = 6, p > 0,05, Figure 1).

The left ventricular pressure (LVP) in the isolated hearts of diabetic rats (hDR) was lower by 25 % as compared to the hearts obtained from healthy rats (hHR). However, there was no significant difference in contractility index (CI) values. LVP in hDR was higher by 60 % in the group of animals that were injected with PRKCD-siRNAs compared to the hearts of diabetic animals non-treated with siRNAs (p < 0,01; Table 2). In contrast, CI was lowered by approximately 30 % after the PRKCD-siRNAs administration (p < 0,05; Figure 2A). The application of beta-adrenoreceptor agonist isoproterenol in concentrations of 10⁻⁸, 10⁻⁷, and 10⁻⁶ mol/L for 5 min evoked a transient increase in LVP and CI in the hearts of animals of all groups. It is worth noting that maximum LVP in hDR during this response was significantly lower in rats treated with all three concentrations of isoproterenol as compared to the control animals (p < 0,05). However, LVP values in hDR after PRKCD-siRNAs injection were not significantly different from the values in hHR (p > 0,05). In addition, CI in the hearts after PKC- δ gene expression inhibition was reduced by 40 % (p < 0,05; Table 2, Figure 2B).

There was no significant difference between initial values of coronary perfusion pressure (CPP) and coronary vascular resistance (CVR) in both hHR and hDR groups (Table 3, Figure 3A). The perfusion with increasing concentrations of isoproterenol resulted in the decrease in CPP and CVR in the hearts obtained

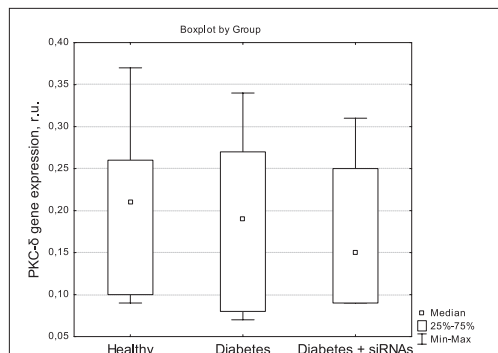


Figure 1. PKC- δ gene expression in hearts of healthy, diabetic and PRKCD-siRNA-treated diabetic rats (n = 6)

Effect of various concentrations of isoproterenol on left ventricular pressure in rat isolated heart (Median, Q(25;75); n = 8)

Condi-tions	Parameters	Groups		
		2-months healthy	2-months diabetes	2-months diabetes + siRNA
Baseline	LVP, mm Hg	63,63 (58,68; 68,48)	67,30 (54,13; 77,86) p2 = 1,0	112,19 (109,12; 116,17) p2 = 0,00107 p3 = 0,00388
	dP/dtmax, mm Hg · s ⁻¹	1828,18 (1690,47; 2016,77)	1896,09 (1705,26; 2004,51) p2 = 1,0	2237,38 (2011,19; 2437,64) p2 = 0,03999 p3 = 0,14315
	dP/dtmin, mm Hg · s ⁻¹	-1002,49 (-1083,83; -893,29)	-977,39 (-1019,62; -867,37) p2 = 1,0,	-1164,94 (-1267,43; -1058,70) p2 = 0,471898 p3 = 0,18286
Isoproterenol, 10 ⁻³ mol/L	LVP, mm Hg	124,61 (109,63; 128,07) p1 = 0,00044	88,64 (69,32; 108,19) p1 = 0,05910 p2 = 0,35939	165,67 (9162,04; 178,09) p1 = 0,01169 p2 = 0,44154 p3 = 0,00796
	dP/dtmax, mm Hg · s ⁻¹	5444,01 (4649,28; 6319,08) p1 = 0,00007	4012,00 (3189,48; 4780,85) p1 = 0,00259 p2 = 0,35939	5318,12 (3832,31; 5852,33) p1 = 0,00711 p2 = 1,0 p3 = 0,81922
	dP/dtmin, mm Hg · s ⁻¹	-2860,48 (-3276,70; -2444,68) p1 = 0,00013	-1965,62 (-2294,84; -1425,95) p1 = 0,00344 p2 = 0,13163	-2552,86 (-3030,72; -1829,65) p1 = 0,00123 p2 = 1,0 p3 = 0,86653
Isoproterenol, 10 ⁻⁷ mol/L	LVP, mm Hg	189,28 (176,65; 208,40) p1 = 0,00003	90,19 (67,82; 113,0) p1 = 0,05255 p2 = 0,00267	164,49 (159,58; 172,62) p1 = 0,00003 p2 = 0,35939 p3 = 0,23130
	dP/dtmax, mm Hg · s ⁻¹	11291,03 (10069,93; 12700,15) p1 = 0,00005	4511,54 (3355,54; 7149,36) p1 = 0,00264 p2 = 0,00054	8019,34 (7091,38; 8927,43) p1 = 0,00001 p2 = 0,14315 p3 = 0,23130
	dP/dtmin, mm Hg · s ⁻¹	-4573,36 (-4832,28; -4303,85) p1 = 0,00001	-2248,68 (-2724,00; -1767,78) p1 = 0,00896 p2 = 0,00708	-3780,85 (-4134,69; -3299,64) p1 = 0,00006 p2 = 0,31163 p3 = 0,47190
Isoproterenol, 10 ⁻⁶ mol/L	LVP, mm Hg	199,63 (170,19; 219,65) p1 = 0,00006	110,21 (80,76; 121,49) p1 = 0,01619 p2 = 0,01566	166,03 (132,62; 192,95) p1 = 0,02217 p2 = 0,77370 p3 = 0,28972
	dP/dtmax, mm Hg · s ⁻¹	12236,51 (10119,34; 14556,20) p1 = 0,00004	6393,61 (5057,39; 7138,34) p1 = 0,00319 p2 = 0,01566	7457,61 (6550,61; 8108,14) p1 = 0,00097 p2 = 0,11095 p3 = 1,00000
	dP/dtmin, mm Hg · s ⁻¹	-4845,90 (-5246,18; -4463,55) p1 = 0,00000	-2824,69 (-3337,42; -2042,16) p1 = 0,00151 p2 = 0,01002	-3710,52 (-4271,13; -3584,09) p1 = 0,00003 p2 = 0,24960 p3 = 0,68800

Notes. 1 – vs. baseline (Friedman ANOVA and Kendall coefficient of concordance); p2 – vs. healthy (Kruskal-Wallis ANOVA test); p3 – vs. diabetes (Kruskal-Wallis ANOVA test).

Effect of various concentrations of isoproterenol on mean coronary perfusion pressure (mm Hg) in rat isolated heart (Median, Q(25;75); n = 8)

Conditions		Groups		
		2-months healthy	2-months diabetes	2-months diabetes + siRNA
Baseline		78,77 (75,09; 81,94)	82,46 (78,48; 86,68) p2 = 0,95050	86,97 (84,99; 93,05) p2 = 0,03191 p3 = 0,31075
Isoproterenol, 10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁸	59,51 (53,13; 63,92) p1 = 0,01333	74,43 (65,25; 83,37) p1 = 0,28884 p2 = 0,07665	58,29 (42,05; 64,71) p1 = 0,22067 p2 = 1,00000 p3 = 0,15406
	10 ⁻⁷	60,85 (53,44; 64,05) p1 = 0,01332	67,05 (60,27; 76,91) p1 = 0,01333 p2 = 0,37070	54,08 (39,20; 63,97) p1 = 0,04122 p2 = 1,0 p3 = 0,09455
	10 ⁻⁶	57,62 (49,28; 60,41) p1 = 0,01333	62,16 (57,92; 68,77) p1 = 0,01333 p2 = 0,39969	56,51 (40,83; 58,25) p1 = 0,04123 p2 = 1,0 p3 = 0,28166

Notes. p1 – vs. baseline (Friedman ANOVA and Kendall coefficient of concordance); p2 – vs. healthy (Kruskal-Wallis ANOVA test); p3 – vs. diabetes (Kruskal-Wallis ANOVA test).

from all animal groups. Maximal CVR decrease in hDR was only 16 % of initial values vs. 29 % in hHR. It is important to note that these changes were statistically insignificant in hDR. In contrast, the most pronounced decrease of CVR in response to isoproterenol was observed in the hearts of diabetic animals injected with PRKCD-siRNAs (up to 41 %). In this group, the tone of coronary arteries was significantly lower during isoproterenol challenge than in the hearts of the non-treated diabetic animals (Table 3, Figure 3B).

The deleterious effects of hyperglycemia on the blood vessels may be associated with various pathways. The cellular mechanisms include the polyol metabolism activation [16], non-enzymatic glycosylation and advanced glycosylation end products pathways [17], enhanced reactive oxygen species production [18], activation of the diacylglycerol (DAG)-protein kinase C (PKC) pathway [19]. In general, hyperglycemia-induced intra- and extracellular changes lead to alterations of signal transduction pathways,

affecting gene expression and protein function to cause cellular dysfunction and damage. The DAG-PKC pathway is one of the most studied pathways in cellular signaling induced by diabetes [20]. The attention is mainly focused on evaluation of role of the conventional isoforms (PKC- α , - β 1, - β 2, and - γ) [4, 21]. Moreover, the clinical trials have already provided the data on the positive effect of PKC- β 1/2 inhibition on diabetes-related endothelial dysfunction, retinopathy, and nephropathy [22–26]. However, there are evidences of PKC- δ involvement in development of diabetic vasculopathy [27–29]. The diabetes-related heart diseases are manifested in the form of coronary heart disease, autonomic neuropathy, diabetic cardiomyopathy. It has been suggested that activation of PKC- δ plays an important role in the pathogenesis of the latter [30].

It is known that diabetes mellitus leads to significant changes in the regulation of coronary artery tone. This vascular disorder is expressed in blunted endothelium-dependent relaxation and

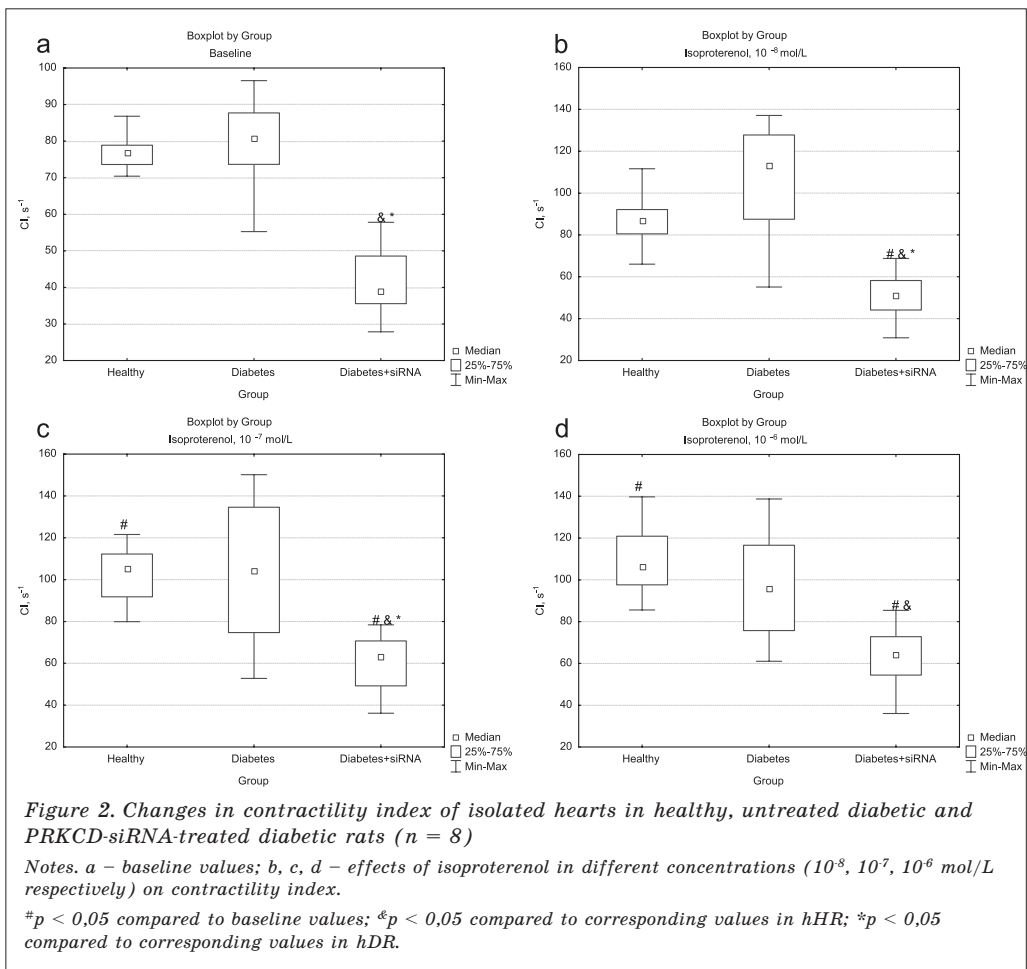


Figure 2. Changes in contractility index of isolated hearts in healthy, untreated diabetic and PRKCD-siRNA-treated diabetic rats ($n = 8$)

Notes. a – baseline values; b, c, d – effects of isoproterenol in different concentrations (10^8 , 10^7 , 10^6 mol/L respectively) on contractility index.

$p < 0,05$ compared to baseline values; & $p < 0,05$ compared to corresponding values in hHR; * $p < 0,05$ compared to corresponding values in hDR.

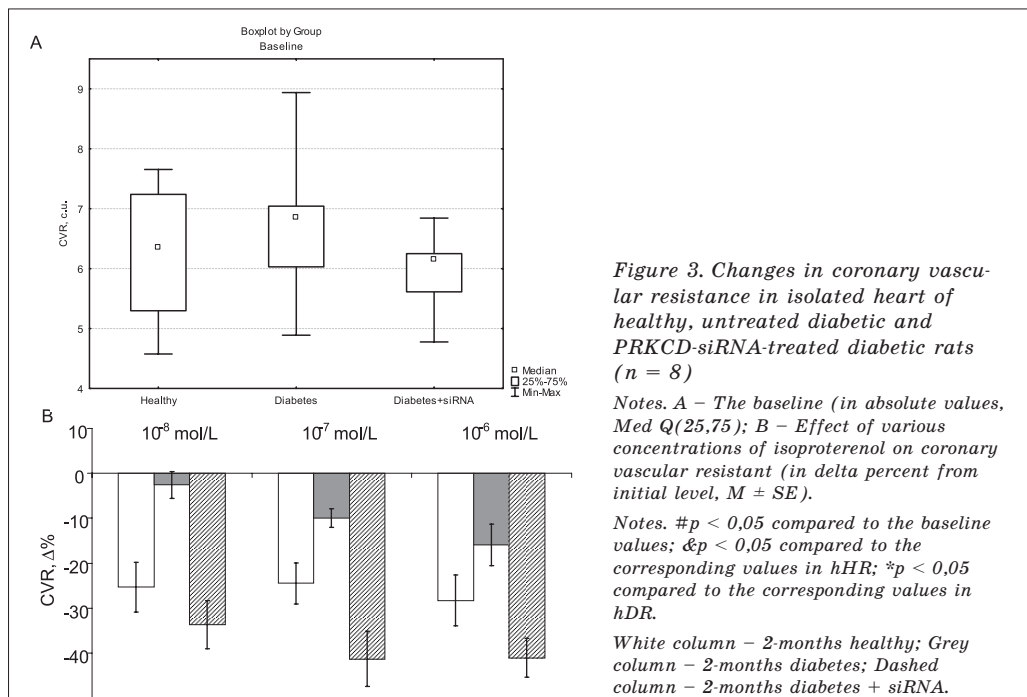


Figure 3. Changes in coronary vascular resistance in isolated heart of healthy, untreated diabetic and PRKCD-siRNA-treated diabetic rats ($n = 8$)

Notes. A – The baseline (in absolute values, Med Q(25,75)); B – Effect of various concentrations of isoproterenol on coronary vascular resistant (in delta percent from initial level, $M \pm SE$).

Notes. # $p < 0,05$ compared to the baseline values; & $p < 0,05$ compared to the corresponding values in hHR; * $p < 0,05$ compared to the corresponding values in hDR.

White column – 2-months healthy; Grey column – 2-months diabetes; Dashed column – 2-months diabetes + siRNA.

increased response of vascular tissues to vasoconstrictors. For instance, it has been shown that in patients with diabetes mellitus, unlike in healthy individuals, the coronary arteries respond to acetylcholine with vasoconstriction [31, 32].

The previously obtained data indicate that PKC- δ is involved in the regulation of vascular tone [15, 33]. The fact that Ca²⁺ sensitivity of aorta myocytes from diabetic rats is restored by suppression of PKC- δ gene expression supports this assumption [34]. These data taken together suggest that inhibition of PKC- δ may improve the cardiac metabolism in diabetes.

However, no significant changes in PKC- δ gene expression have been revealed in this study both in induced pathology and after injection of PRKDC-siRNA.

The data obtained demonstrate a significant decrease in the myocardium sensitivity to stimulation of beta-adrenoreceptors in hDR. This conclusion is based on the significant attenuation of the positive inotropic and vasodilatory effects of isoproterenol. The mentioned phenomena were also observed in other studies and probably indicate the development of diabetic cardiomyopathy in the experimental animals. It has also been shown previously that changes in the myocardium sensitivity to beta-adrenoreceptor agonists in diabetes mellitus are associated with abnormality in the Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes [35–37].

In our study the injection of siRNA led to significant changes in the responses of hDR. First of all, the treatment with PRKCD-siRNAs significantly potentiated the relaxation of coronary arteries in isolated hearts induced by isoproterenol. The maximum values of CPP during the response were not statistically different from those in hHR.

The decrease in CVR in response to isoproterenol (10⁻⁸ mol/L) was 1.5 c.u. in hHR, while the corresponding value in hDR was only 0.1 c.u. Considering these results, we suggest that endothelium-dependent relaxation is significantly blunted in hDR. Under the conditions of increased oxygen demands this may

result in development of myocardial ischemia in diabetes mellitus [38]. The siRNAs injection completely restored the relaxation of coronary arteries to the beta-adrenoreceptor agonist in diabetic rats. In this experiments, CVR was lower by 1.5–1.9 c.u., depending on the isoproterenol concentration, than in hDR without PRKCD-siRNAs treatment.

Despite the absence of significant changes in PKC- δ gene expression in the myocardium of diabetic rats, the myocardial contractility after administration PRKCD-siRNAs was decreased. This is supported by significant decrease in CI compared to other groups. These changes can be attributed to the fact that PKC- δ plays an important role in the regulation of myocardial contractility via mediation of the positive inotropic effect by activation of Ca²⁺-ATPase in the cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum [4, 39]. Perhaps, there is a threshold level of δ PKC activity, which is necessary to maintain the integrity of the cardiomyocyte cytoskeleton [40] and normal development of the heart [41]. We should also mention the important role of the PKC- δ activity in the regulation of glucose level and lipid utilization in cardiomyocytes [30, 42].

Conclusion

In summary, the obtained data demonstrate that the development of type 1 experimental diabetes in rats led to decrease in the endothelium-dependent relaxation capacity of coronary vessels and accompanied by the compensated impairment of heart contractile activity. The dilatory responses of coronary arteries were almost completely restored by administration of PRKCD-siRNAs in diabetic rats. Our results suggest that PKC- δ activity may be involved in reactivity of coronary arteries in rats, which can possibly play a role in coronary dysfunction in diabetes.

Thus, the use of PRKCD-siRNAs appears to be a good therapeutic approach to normalize coronary circulation in diabetic rats. However, we need to keep in mind that treatment with PRKCD-siRNAs leads to the significant decrease in myocardial contractility.

Abbreviations

c. u. – convention unit
CI – contractility index, s^{-1}
CPP – mean coronary perfusion pressure
mm Hg
CVR – coronary vascular resistance, r.u.
DM – diabetes mellitus

dP/dt – rate of LVP change, mm Hg · s^{-1}
ECG – electrocardiogram
hDR – hearts of the rats with streptozotocin-induced diabetes
hHR – hearts of healthy rats
LVP – pressure in the heart left ventricle, mm Hg
r.u. – relative unit

1. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants // *Lancet* 2016. V. 387. P. 1513–1530; doi: org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8.
2. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization, 2014. P. 9–20 (ISBN 978 92 4 156485 4; (NLM classification: WT 500).
3. Mathers C. D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 // *PLoS Med.* 2006. V. 3 (11). P. e442; doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
4. Geraldine P., King G. L. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications *Circ Res.* 2010. V. 106 (8). P. 1319–1331; doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.
5. Boudina S., Abel E. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects // *Rev Endocr Metab Disord.* 2010. V. 11 (1). P. 31–39; doi: 10.1007/s11154-010-9131-7.
6. Falcão-Pires I., Leite-Moreira A. F. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment // *Heart Fail Rev.* 2012. V. 17. P. 325–344; doi: 10.1007/s10741-011-9257-z.
7. Di Carlì M. F., Janisse J., Grunberger, G., Ager J. Role of Chronic Hyperglycemia in the Pathogenesis of Coronary Microvascular Dysfunction in Diabetes // *J. Amer Coll Cardiol.* 2003. V. 41 (8). P. 1387–1393; doi:10.1016/S0735-1097(03)00166-9.
8. Yu Y., Ohmori K., Kondo I. et al. Correlation of functional and structural alterations of the coronary arterioles during development of type II diabetes mellitus in rats // *J. Cardiovasc Res.* 2002. V. 56. P. 303–311; doi: 10.1016/S0008-6363(02)00513-8.
9. Selvin E., Lazo M., Chen Y. et al. Diabetes, Pre-Diabetes and Incidence of Subclinical Myocardial Damage // *Circulation.* 2014. V. 130. P. 1374–1382; doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010815.
10. Way K. J., Katai N., King G. L., Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications // *Diabet Med.* 2001. V. 18. P. 945–959; PMID: 11903393.
11. Giles T. D., Ouyang J., Kerut E. K. et al. Changes in protein kinase C in early cardiomyopathy and in gracilis muscle in the BB/Wor diabetic rat // *Am J. Physiol.* 1998. V. 274. H295–H307; PMID: 9458880.
12. Hiramatsu Y., Sekiguchi N., Hayashi M. et al. Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy // *Diabetes.* 2002. V. 51 (9). P. 2804–2410; PMID: 12196474.
13. Sutherland F. J., Hearse D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart // *Pharmacological Research.* 2000. V. 41 (6). P. 613–627; doi: 10.1006/rphrs.2000.0653.
14. Yoshida K., Flavahan N. A., Horibe M. et al. Endothelial defect mediates attenuated vasorelaxant response to isoproterenol after lung transplantation // *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1999. V. 276 (1). H159–H166; PMID: 9887029.
15. Klymenko K., Novokhatska T., Kizub I. et al. PKC- δ isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat // *J. Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2014. V. 25 (Iss. 4). P. 341–349; doi: 10.1515/jbcpp-2013-014.
16. Obrosova I. G., Minchenko A. G., Vasupuram R. et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats // *Diabetes.* 2003. V. 52. P. 864–871; PMID: 12606532.
17. Wendt T., Harja E., Bucciarelli L. et al. Rage modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes // *Atherosclerosis.* 2006. V. 185. P. 70–77; PMID: 16076470.
18. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // *Nature.* 2001. V. 414. P. 813–820; PMID: 11742414.
19. Koya D., King G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications // *Diabetes.* 1998. V. 47. P. 859–866; PMID: 9604860.
20. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C // *Science.* 1992. V. 258. P. 607–614; PMID: 1411571.
21. Jackson R., Brennan S., Fielding P. et al. Distinct and complementary roles for α and β isoenzymes of PKC in mediating vasoconstrictor responses to acutely elevated glucose // *Br J. Pharmacol.* 2016. V. 173 (5). P. 870–887; doi: 10.1111/bph.13399.
22. Langham R. G., Kelly D. J., Gow R. M. et al. Increased renal gene transcription of protein kinase C- β in human diabetic nephropathy: Relationship to long-term glycaemic control // *Diabetologia.* 2008. V. 51. P. 668–674; PMID: 18278479.

23. Mehta N. N., Sheetz M., Price K. et al. Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type-2 diabetes mellitus // *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009. V. 23. P. 17–24; doi:10.1007/s10557-008-6144-5.
24. Beckman J. A., Goldfine A. B., Goldin, A. et al. Inhibition of Protein Kinase C β Does Not Improve Endothelial Function in Type 2 Diabetes // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2010. V. 95 (8). P. 3783–3787; doi:10.1210/jc.2010-0286.
25. Aronis, K.N., Mantzoros, C.S., 2012. A brief history of insulin resistance: from the first insulin radioimmunoassay to selectively targeting protein kinase C pathways. *Metabolism, clinical and experimental.* 61(4), 445–449; doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.001.
26. Safi S. Z., Qvist R., Kumar S. et al. Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets // *BioMed Research International.* 2014. Article ID 801269, 18 p.; doi:10.1155/2014/801269.
27. Kim J. H., Kim J. H., Jun H. O. et al. Inhibition of protein kinase C delta attenuates blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy // *Am J. Pathol.* 2010. V. 176 (3). P. 1517–2154; doi: 10.2353/ajpath.2010.090398.
28. Cai W., Torreggiani M., Zhu L. et al. AGER1 regulates endothelial cell NADPH oxidase-dependent oxidant stress via PKC- δ : implications for vascular disease // *American Journal of Physiology – Cell Physiology.* 2010. V. 298 (3). P. C624–C634; doi:10.1152/ajpcell.00463.2009.
29. Li X., Pabl N., Wei Q. et al. PKC- δ Promotes Renal Tubular Cell Apoptosis Associated with Proteinuria // *Journal of the American Society of Nephrology.* 2010. V. 21 (7). P. 1115–1124; doi:10.1681/ASN.2009070760.
30. Pappachan J. M., Varughese G. I., Sriraman R., Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management // *World J. Diabetes.* 2013. V. 4 (5). P. 177–189; doi:10.4239/wjd.v4.i5.177.
31. Nahser P. J., Brown R. E., Oskarsson H. et al. Maximal Coronary Flow Reserve and Metabolic Coronary Vasodilation in Patients With Diabetes Mellitus // *Circulation.* 1995. V. 91. P. 635–640; doi: 10.1161/01.CIR.91.3.635.
32. Cardillo C., Kilcoyne C. M., Quyyumi A. A. et al. Decreased Vasodilator Response to Isoproterenol During Nitric Oxide Inhibition in Humans // *Hypertension.* 1997. V. 30. P. 918–921; doi: 10.1161/01.HYP.30.4.918.
33. Kizub I., Klymenko K., Soloviev A. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus // *International Journal of Cardiology.* 2014. V. 174 (Iss.2). P. 230–242; doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.117.
34. Soloviev A. I., Zelenskyi D. S. PKC- δ isozyme gene silencing normalizes Ca²⁺-signaling and decreases myofilament calcium sensitivity in aortic smooth muscle from streptozotocin-induced diabetic rats. In: *Physiology 2015: Proceedings of the General Meeting of The Physiological Society (Abstract Book)*; 2015. July 6–8, Cardiff, UK. 2015. P. 77P (<http://www.physoc.org/proceedings/abstract/Proc%20Physiol%20Soc%2034C34>).
35. op den Buijs J., Miklós Z., van Riel N. A. et al. beta-Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes // *Life Sci.* 2005. V. 76. P. 1083–1098; doi: 10.1016/j.lfs.2004.08.018.
36. Kang M., Walker J. W. Protein kinase C delta and epsilon mediate positive inotropy in adult ventricular myocytes // *J. Mol Cell Cardiol.* 2005. V. 38. P. 753–764; PMID: 15850569.
37. Chavali V., Tyagi S. C., Mishra P. K. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 2013. V. 6. P. 151–160; doi: 10.2147/DMSO.S30968.
38. Murthy V. L., Naya M., Foster C. R. et al. Association Between Coronary Vascular Dysfunction and Cardiac Mortality in Patients With and Without Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2012. V. 126 (15). P. 1858–1868; doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.120402.
39. Periasamy M., Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+) homeostasis and cardiac contractility // *J. Mol Cell Cardiol.* 2001. V. 33 (6). P. 1053–1063; MID: 11444913.
40. Hahn H. S., Yussman M. G., Toyokawa T. et al. Ischemic Protection and Myofibrillar Cardiomyopathy. Dose-Dependent Effects of *In Vivo* PKC Inhibition // *Circ Res.* 2002. V. 91 (8). P. 741–748; doi: 10.1161/01.RES.0000037091.64492.69.
41. Song M., Matkovich S. J., Zhang Y. et al. Combined cardiomyocyte PKC δ and PKC ϵ gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth // *Science Signaling.* 2015. V. 8 (373). ra39; doi: 10.1126/scisignal.aaa1855.
42. Mayr M., Chung Y. L., Mayr U. et al. 2004. Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism // *Am J. Physiol-Heart Circ Physiol.* V. 287 (2). H937–H945; doi: 10.1152/ajpheart.00877.2003.

A. Khromov, N. Dobrelya, I. Strielkov, K. Klymenko, T. Novokhatska, V. Dosenko, A. Soloviev

Inhibition of PKC-delta expression using siRNAs restores coronary dilation in rats with streptozotocin-induced diabetes

It is well known that expression of PKC delta-isoform (PKC- δ) in mammalian heart and aorta is increased in diabetes mellitus (DM). However, its role in coronary circulation dysfunction and cardiomyopathy remains

unclear. *The aim of this study* was to evaluate the involvement of PKC- δ in coronary circulatory and cardiac contractile dysfunction in rats with streptozotocin-induced DM. In diabetic animals, a severe hyperglycemia was accompanied by increased blood pressure. DM resulted in some alterations of myocardial contractile activity and in significant decreased dilatory response to isoproterenol (10^{-8} – 10^{-6} mol/L) in coronary arteries. PKC- δ gene silencing in diabetic rats using siRNAs had no effect on blood pressure and glucose levels. In contrast, PKC- δ gene silencing completely restored the coronary dilatory response in isolated rat hearts, but led surprisingly to decrease in myocardial contractility.

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, protein kinase C, siRNAs, coronary flow, myocardial contractility

О. С. Хромов, Н. В. Добреля, Є. В. Стрелков, К. І. Клименко, Т. В. Новохацька, В. Є. Досенко, А. І. Соловйов
Інгібування експресії РКС-дельта з використанням siRNAs відновлює дилатацію коронарних артерій у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом

Добре відомо, що в артеріальних судинах ссавців за умов цукрового діабету (ЦД) збільшується експресія дельта-ізоформи протеїнкінази С (РКС- δ). Проте її значення в порушеннях коронарного кровообігу та розвитку кардіоміопатії залишається нез'ясованим.

Мета дослідження – з'ясування ролі РКС- δ у регуляції коронарного кровообігу та скоротливої функції серця у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом.

У діабетичних тварин важка гіперглікемія (> 30 ммоль/л) супроводжувалася підвищенням артеріального тиску. Розвиток ЦД призводив до деяких змін скоротливої активності міокарда та значно зменшував дилатаційну відповідь коронарних артерій на ізопроterenол (10^{-8} – 10^{-6} моль/л). Сайленсинг гена РКС- δ з використанням siRNAs у щурів з ЦД не супроводжувався достовірними змінами вмісту глюкози та величини артеріального тиску. Разом з тим, спостерігалось повне відновлення дилатаційної відповіді коронарних артерій ізольованих сердець щурів і несподівано зменшувалася скоротливість міокарда.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, дельта-ізоформа протеїнкінази С, малі інтерферуючі РНК, коронарний кровоток, скоротливість міокарда

А. С. Хромов, Н. В. Добреля, Е. В. Стрелков, К. И. Клименко, Т. В. Новохацкая, В. Е. Досенко, А. И. Соловьев
Ингибирование экспрессии РКС-дельта с использованием siRNAs восстанавливает дилатацию коронарных артерий у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

Хорошо известно, что в артериальных сосудах млекопитающих при сахарном диабете (СД) увеличивается экспрессия дельта-изоформы протеинкиназы С (РКС- δ). Однако ее роль в нарушениях коронарного кровообращения и развитии кардиомиопатии остается неясной.

Цель исследования – выяснение роли РКС- δ в регуляции коронарного кровотока и сократительной функции сердца у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом.

У диабетических животных тяжелая гипергликемия сопровождалась повышением артериального давления. Развитие СД приводило к некоторым изменениям сократительной активности миокарда и значительно уменьшало дилатационный ответ коронарных артерий на изопроterenол (10^{-8} – 10^{-6} моль/л). Сайленсинг с использованием siRNAs гена РКС- δ у крыс с СД не сопровождался достоверными изменениями содержания глюкозы и величины артериального давления. Вместе с тем, наблюдалось полное восстановление дилатационного ответа коронарных артерий изолированных сердец крыс и неожиданно уменьшалась сократимость миокарда.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоцин, дельта-форма протеинкиназы С, малые интерферирующие РНК, коронарный кровоток, сократимость миокарда

Надійшла: 30 серпня 2017 р.

Контактна особа: Хромов О. С., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 536 13 41. Електронна пошта: askhromov@ukr.net,

К. В. Садогурська, Р. Б. Косуба, І. М. Яремій, В. Г. Зеленюк
**Вивчення гіпоглікемічної активності нанохрому
цитрату в тварин з експериментальним
цукровим діабетом 2 типу**

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

Ключові слова: нанохрому цитрат,
гіпоглікемічна дія, цукровий діабет 2 типу

Сьогодні проблема цукрового діабету (ЦД) з огляду на його поширеність, тяжкість перебігу та ускладнень є однією з найактуальніших у світі. За даними ВООЗ та Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) кількість хворих на ЦД коливається від 1,5 до 4,0 %, особливо в розвинутих країнах світу. В Україні показники захворюваності на ЦД щорічно зростають на 5–7 % і сягають понад 2 млн хворих [1]. За класифікацією ВООЗ (1999 р.) розрізняють два основних типи захворювання. ЦД 1 типу – це хронічне автоімунне захворювання, при якому виникає абсолютний дефіцит інсуліну внаслідок гіпофункції β-клітин острівців Лангерганса. За ЦД 2 типу, що також супроводжується гіперглікемією, зумовленою, насамперед, зниженням чутливості інсулінзалежних органів до інсуліну, що призводить до нездатності їх поглинати глюкозу з крові та утилізувати в тканинах (м'язи, печінка, жирова тканина тощо), пригнічується глікогенез з посиленням глюконеогенезу в печінці. Прогнозують, що до 2035 року загальна чисельність хворих на ЦД збільшиться на 55 % і досягне 592 млн осіб, серед яких 90 % матимуть ЦД 2 типу [1].

Для лікування ЦД з замісною метою використовують інсулін та синтетичні гіпоглікемічні пероральні препарати різні за хімічною будовою та механізмом дії, які, на жаль, не позбавлені побічних ефектів [2, 3]. Незважаючи на значний масив клінічних та експериментальних наукових досліджень у цьому напрямі, пошук нових засобів і способів профілактики та лікування

ЦД є однією з актуальних медичних та соціальних проблем сучасності.

Оскільки відомо, що хром як мікроелемент бере участь у регуляції продукції та метаболізмі інсуліну, відіграє важливу роль у вуглеводному, ліпідному, білковому обміні [4, 5], увагу вчених привернула органічна сполука хрому – нанохрому цитрат (НХЦ), отримана в Державному НДІ нанобіотехнологій і ресурсозбереження (м. Київ) [6]. Нашими попередніми скринінговими дослідженнями встановлено наявність у НХЦ гіпоглікемічної дії [8], патогенетичний механізм якої потребує поглибленого вивчення.

Мета дослідження – з'ясувати ефективність застосування нанохрому цитрату як засобу корекції за експериментального ЦД 2 типу.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження виконані на білих безпородних 18-місячних щурах-самцях масою 220–270 г. Тварини були поділені на 4 групи по 6 особин у кожній. До I контрольної групи ввійшли інтактні щури. У тварин II–IV груп моделювали експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) підшкірним введенням дексаметазону (КРКА, Словенія) у дозі 0,125 мг/кг маси тіла впродовж 14 діб, що сприяло відтворенню ЦД 2 типу [7]. Щурам III групи поєднано з дексаметазоном вводили в шлунок НХЦ в умовно ефективній гіпоглікемічній дозі (0,01мг/кг) [8]. Як препарат порівняння обрано еталонний гіпоглікемічний засіб метформін (метформін, таблетки 500 мг, САНДОЗ, Польща), який у вигляді водної суспензії вводили тваринам IV групи в шлунок через зонд у дозі 200 мг/кг [9]. Напередодні за 10–12 год до визначення вмісту глюкози та інсуліну в крові тварин позбавля-

ли їжі за вільного доступу до води. На 14 добу тварин виводили з досліду одномоментною декапітацією під легкою ефірною анестезією, забирали кров для визначення основних показників вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, а для гістологічного дослідження вилучали підшлункову залозу.

Гіпоглікемічні властивості НХЦ оцінювали за базальною глікемією (у динаміці на 1, 7, 14 добу) та вмістом інсуліну в сироватці крові (на 14 добу дослідження) порівняно з референс-препаратом метформіном. Для оцінки інсулінорезистентності (IR) використовували математичну модель інсулін-глюкозного зв'язку Homeostasis Model Assessment (НОМА) [7]. Концентрацію глюкози натще визначали в зібраній з хвостової вени крові за допомогою портативного глюкометра (Accu-Chek ActiveNew, Німеччина), уміст інсуліну в сироватці крові – за допомогою імунолюмінесцентного аналізу на автоматичному імунохемілюмінесцентному аналізаторі (SnibeCo., Ltd, КНР) з використанням тест-набору «Maglumi». Індекс інсулінорезистентності (НОМА-IR) розраховували за формулою [10]:

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{глюкоза (ммоль/л)} \cdot \text{інсулін (мкОд/мл)}}{22,5 \text{ (константа)}}$$

У разі оцінки гіпоглікемічної активності сполук, крім дослідження рівнів глюкози та інсуліну, згідно з методичними рекомендаціями [7], доцільно вивчати також стан обміну білків і ліпідів. Визначення біохімічних показників у сироватці крові проводили фотоколориметрично за загальноприйнятими методиками з використанням діагностичних наборів «Реагент» та НВП «Філісіт-діагностика» (м. Дніпро) [11].

Зразки підшлункової залози для гістологічного дослідження фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в батареї висхідних спиртів та заливали в парафін. Парафінові зрізи (5 мкм завтовшки) після депарафінізації фарбували гематоксилином і еозином загальноновизнаним способом. На зрізах підраховували кількість та розподіл за розміром панкреатичних острівців Лангерганса та їхній клітинний профіль. Препарати вивчали у світлооптичному

мікроскопі ЛЮМАМ-Р8. Цифрові фотокопії зображення отримували за допомогою мікроскопа та цифрового апарата Olympus С 740UZ.

Утримання тварин та всі маніпуляції проводили згідно з національними «Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програм «Excel-7» та параметричних методів статистики з визначенням t-критерію Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У таблиці 1 наведено дані щодо динаміки рівня глюкози в контрольних та дослідних тварин натще в процесі моделювання дексаметазонового ЦД і застосування НХЦ. У першу добу концентрація глюкози в крові інтактних та дослідних тварин коливалася в межах норми і не відрізнялася в тварин різних груп.

На 7 добу моделювання контрольної патології концентрація глюкози в крові тварин після введення дексаметазону збільшилася в 1,3 разу. Подібне зростання глікемії спостерігали й у разі поєднаного застосування дексаметазону з НХЦ або метформіном. На 14 добу дексаметазонова глікемія зросла ще майже вдвічі, і порівняно з інтактним контролем рівень глюкози в крові збільшився в 2,6 разу, що є вірогідною ознакою відтворення експериментального ЦД (ЕЦД) 2 типу [7].

У тварин, які отримували з профілактично-лікувальною метою НХЦ, рівень глікемії на 14 добу залишився на попередньому рівні (як на 7 добу), проте, виявився в 2,1 разу нижчим, ніж у тварин з ЕЦД. Аналогічний ефект спостерігали в разі введення метформіну (табл. 1), що свідчить про гіпоглікемічну дію НХЦ, подібну референс-препарату метформіну. Із даних літератури відомо, що гіпоглікемічний ефект НХЦ можливий і за стрептозотоцин-індукованого ЦД [13], а також у разі

Динаміка глікемії в щурів у процесі моделювання цукрового діабету та застосування нанохрому цитрату, ($M \pm m, n = 6$)

Умова досліджу	Уміст глюкози в крові, ммоль/л		
	1 доба	7 доба	14 доба
Інтактний контроль	5,30 ± 0,20	5,40 ± 0,07	5,47 ± 0,21
Дексаметазон, 0,125 мг/кг (контрольна патологія)	5,37 ± 0,26	7,20 ± 0,20*	14,22 ± 0,36*
Дексаметазон + Нанохрому цитрат, 0,01 мг/кг	5,52 ± 0,19	6,47 ± 0,30*	6,63 ± 0,34*/#
Дексаметазон + Метформін, 200 мг/кг	5,65 ± 0,16	7,05 ± 0,35*	6,98 ± 0,41*/#

Примітка. *Різниця вірогідна порівняно з інтактним контролем; #різниця вірогідна порівняно з контрольною патологією ($p < 0,05$).

застосування хрому цитрату за алоксанового ЦД [14].

У тварин з ЕЦД уміст інсуліну в сироватці крові вірогідно підвищився в 2,2 разу (табл. 2), а інсулін-глюкозний зв'язок (індекс НОМА-IR) зріс у 7,2 разу, що є наслідком низької чутливості периферичних тканин до дії інсуліну [12]. Під впливом НХЦ та метформіну рівень інсулінемії порівняно з контрольною патологією вірогідно знизився в 2,3 та 2,6 разу, індекс НОМА-IR – у 6,4 та 6,8 разу відповідно й не суттєво відрізнялися від показників інтактних тварин (табл. 2).

Аналізуючи результати дослідження гіпоглікемічної активності НХЦ на тлі ЕЦД, слід зазначити, що показники глікемії, інсулінемії та інсулін-глюкозного зв'язку (НОМА-IR) знижуються до рівня інтактних тварин.

За дослідження гістоструктури підшлункової залози як основного продуцента інсуліну встановлено, що в інтактних тварин (рис. 1А) острівці Лангерганса зустрічаються майже в кожному полі зору (99 %), розмір їх коливається в середньому в межах (205,0 ± 12,65)

мкм, клітинний профіль на одному гістологічному зрізі острівця становить (84,0 ± 5,69) без ознак альтерації. У тварин з ЕЦД загальна кількість острівців значно менша (до 27 % у полі зору), розміри менші – до (43,0 ± 4,27) мкм, форма змінена до неправильної. Клітинний профіль острівців на одному зрізі в 3,3 разу менший (до (25,50 ± 3,56)), більшість клітин у стані некрозу (рис. 1Б).

У тварин, які отримували НХЦ у процесі моделювання ЦД (рис. 2А), альтеративні прояви в ендокринній частині залози значно зменшилися. Розміри острівців суттєво не відрізнялися від інтактних тварин (217,5 ± 19,36) мкм, їхній клітинний профіль коливався в середньому в межах (133,0 ± 12,4), що дещо більше, ніж в інтактних щурів. У стані некрозу знаходилися лише поодинокі клітини острівців. У разі введення метформіну на тлі ЦД (рис. 2Б) розміри острівців Лангерганса в 1,5 разу менші, ніж при застосуванні НХЦ (у середньому – (140,0 ± 11,1) мкм). Кількість клітин на один гістологічний зріз острівця хоча і наближалася до рівня контролю (67,50 ± 4,98),

Таблиця 2

Уміст інсуліну в крові щурів та індекс інсулінорезистентності НОМА-IR на тлі цукрового діабету 2 типу та застосування нанохрому цитрату ($M \pm m, n = 6$)

Умова досліджу	Контроль (інтактні тварини)	Експериментальний цукровий діабет	Експериментальний цукровий діабет + нанохрому цитрат	Експериментальний цукровий діабет + метформін
Інсулін, мкОД/мл	1,90 ± 0,15	4,20 ± 0,20*	1,80 ± 0,09#	1,60 ± 0,06#
НОМА-IR	0,46 ± 0,03	3,33 ± 0,26*	0,52 ± 0,03#	0,49 ± 0,04#

Примітка. *Різниця вірогідна порівняно з інтактним контролем; #різниця вірогідна порівняно з ЕЦД ($p < 0,05$).

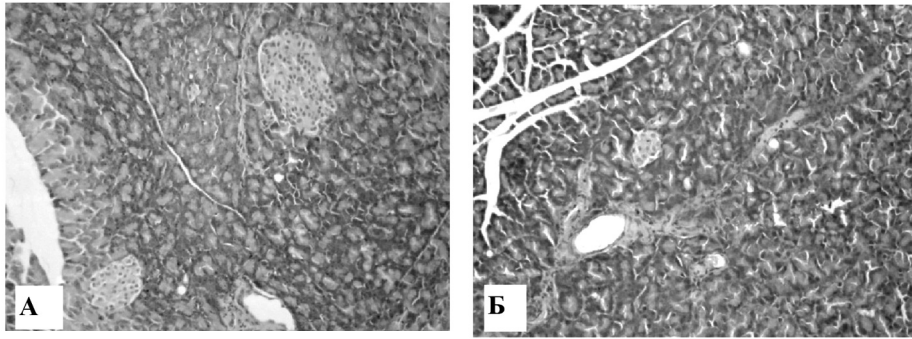


Рис. 1. Ультраструктура острівця підшлункової залози інтактного щура (А) і за цукрового діабету (Б). Забарвлення гематоксилином і еозином. Ок. 10х. Об. 10х

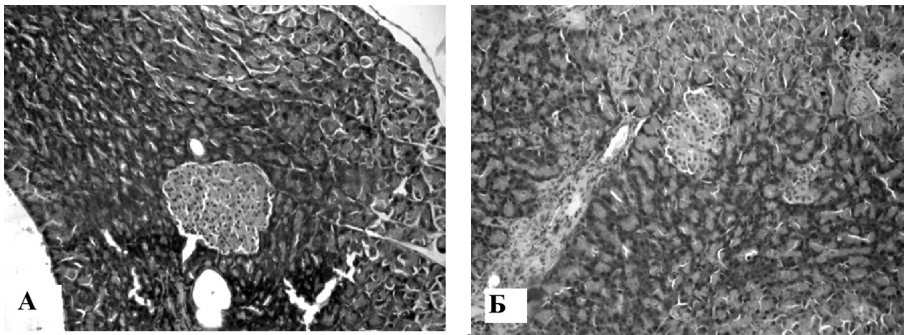


Рис. 2. Ультраструктура острівця підшлункової залози щурів за дії нанохрому цитрату (А) та метформіну (Б) на тлі цукрового діабету. Забарвлення гематоксилином і еозином. Ок. 10х. Об. 10х

однак, майже вдвічі менше клітинного профілю за умов дії НХЦ. Ознаки некрозу мали 3–12 % клітин.

Отже, проведені патоморфологічні дослідження підшлункової залози щурів виявили виразніший позитивний вплив НХЦ на гістоструктуру залози за умов ЕЦД порівняно з дією метформіну.

Проведеними біохімічними дослідженнями встановлено, що в сироватці крові щурів з ЕЦД на 36 % вищий вміст загальних ліпідів, на 83 % – загального холестерину і на 36 % нижчий вміст холестерину ЛПВЩ порівняно з інтактними тваринами (табл. 3), що не протирічить результатам інших дослідників [12]. Такі зміни показників ліпідного обміну можуть бути наслідком гіперглікемії та інсулінорезистентності периферичних тканин і підтверджують відтворення ЕЦД 2 типу [12]. У тварин з ЕЦД не виявлено суттєвих порушень білоксинтезуючої та білірубіндетоксикуючої функцій печінки, оскільки показники вмісту загального білка, альбумінів, білірубину, сечової кислоти та креатиніну в сироватці крові

вірогідно не відрізнялися від показників інтактних тварин (табл. 3). Проте в сироватці крові таких щурів на 31 % знизився вміст сечовини, що, найімовірніше, свідчить про порушення функціонування в печінці орнітинового циклу сечовиноутворення й узгоджується з даними літературних джерел [12].

У сироватці крові тварин з ЦД, лікованих НХЦ, знизився на 21 % вміст загальних ліпідів, на 36 % – загального холестерину і на 53 % зріс вміст холестерину ЛПВЩ, вміст сечовини піднявся до рівня інтактних тварин. Отримані дані свідчать про гіполіпідемічну, гіпохолестеринемічну дію НХЦ за умов ЕЦД за відсутності впливу на вміст загального білка, альбуміну, креатиніну, сечової кислоти та загального білірубину (табл. 3).

Профілактично-лікувальне введення метформіну також запобігло розвитку метаболічних порушень, викликаних ЕЦД. Порівняно з нелікованими тваринами в сироватці крові на 39 % знизився вміст загального холестерину і на 38 % підвищився холестерин ЛПВЩ. Усі інші

Біохімічні показники сироватки крові щурів за дії нанохрому цитрату на тлі цукрового діабету ($M \pm m$, $n = 6$)

Умова досліджу / Показник	Контроль (інтактні тварини)	Цукровий діабет	Цукровий діабет + нанохром цитрат	Цукровий діабет + метформін
Загальні ліпіди, г/л	4,14 ± 0,09	5,65 ± 0,34*	4,47 ± 0,07#	4,74 ± 0,25
Холестерин загальний, ммоль/л	2,62 ± 0,14	4,80 ± 0,44*	3,07 ± 0,18#	2,94 ± 0,20#
Холестерин ЛПВЩ, ммоль/л	0,91 ± 0,03	0,58 ± 0,05*	0,89 ± 0,04#	0,80 ± 0,04#
Білірубін загальний, мкмоль/л	5,01 ± 0,24	5,54 ± 0,25	5,26 ± 0,20	5,08 ± 0,25
Загальний білок, г/л	54,43 ± 2,17	54,43 ± 4,53	55,61 ± 2,31	53,50 ± 4,10
Альбумін, г/л	39,14 ± 1,29	38,53 ± 1,28	38,17 ± 1,12	37,65 ± 1,19
Креатинін, мкмоль/л	98,84 ± 5,30	110,47 ± 7,13	101,93 ± 6,15	105,51 ± 7,77
Сечова кислота, ммоль/л	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Сечовина, ммоль/л	7,32 ± 0,55	5,07 ± 0,55*	7,24 ± 0,46#	8,08 ± 0,50

Примітка. *Різниця показників вірогідна порівняно з контролем, #порівняно з ЦД ($p < 0,05$).

показники в сироватці крові суттєво не відрізнялися від інтактних тварин.

Таким чином, застосування НХЦ за ЕЦД 2 типу запобігає наростанню гіперглікемії, ймовірно, шляхом збільшення чутливості інсулінозалежних тканин до гормону та покращання утилізації в них глюкози і, таким чином, запобігає розвитку суттєвих метаболічних порушень, виявляючи гіполіпідемічний та гіпохолестеринемічний ефекти. Саме тому для зниження ризику розвитку судинних ускладнень, які виникають за ЦД, до складу комплексної терапії захворювання доцільно вводити не лише засоби, які ефективно контролюють глікемічний профіль пацієнтів, рівень інсуліну та обмін вуглеводів, але й поліфункціональні препарати, які діють і на інші патогенетичні ланки ускладнень, зокрема, мають антиатерогенну та гіполіпідемічну дію [2]. На основі вищезазначеного, НХЦ може бути запропонований для подальшого вивчення як перспективний засіб у лікуванні ЦД. Поряд з подаль-

шим вивченням патогенетичних механізмів гіпоглікемічної дії нанохрому цитрату доцільно зосередити увагу на дослідженні безпекового його застосування.

Висновки

1. На тлі експериментальної моделі дексаметазонавого ЦД у щурів нанохром цитрат знижує рівень глікемії, уміст інсуліну у сироватці крові та індекс НОМА-IR до рівня інтактних тварин і запобігає пошкодженню гістоструктури підшлункової залози.
2. Гіпоглікемічний ефект нанохрому цитрату супроводжується нормалізацією порушених показників ліпідного обміну.
3. За ефективністю коригуючого впливу на показники вуглеводного, ліпідного, білкового обміну та протективною дією на морфоструктуру підшлункової залози нанохрому цитрат за експериментального ЦД 2 типу не поступається препарату порівняння метформіну.

1. Ткаченко В. І. Аналіз поширеності та захворюваності на цукровий діабет і його ускладнення серед населення України та у Київській області за 2004–2013 рр. / В. І. Ткаченко, Н. В. Видиборець, О. Ф. Коваленко // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2014. – № 2. – С. 177–182.
2. Паньків В. І. Сучасні підходи до медикаментозної профілактики цукрового діабету 2-го типу / В. І. Паньків // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2015. – № 2 (50). – С. 58–63.
3. Metformin: from mechanisms of action to therapies / M. Foretz, G. Bruno, B. Luc [et al.] // Cell Metabolism. – 2014. – V. 20, № 6. – P. 953–966.

4. Микроэлементозы человека / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Раш [и др.]. – Москва : Медицина, 1991. – 496 с.
5. Pechova A. Chromium as an essential nutrient: a review / A. Pechova, L. Pavlata // Veterinarni Medicina. – 2007. – V. 52, № 1. – P. 1–18.
6. 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.
7. Полторак В. В. Експериментальне вивчення нових гіпоглікемічних засобів / В. В. Полторак, Н. І. Горбенко // Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. – Київ, 2001. – С. 396–408.
8. Садогурська К. В. До питання безпечності нанохрому цитрату за умов повторного введення / К. В. Садогурська // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 4–5 (50). – С. 95–100.
9. Вплив метформіну на розвиток інсулінорезистентності, індукованої дексаметазоном у щурів / В. В. Полторак, Н. І. Горбенко, О. В. Іванов [та ін.] // Ендокринологія. – 2000. – Т. 5, № 2. – С. 249–251.
10. Matthews D. R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski // Diabetologia. – 1985. – V. 28, № 7. – P. 412–419.
11. Камышников В. С. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2003. – 775 с.
12. Відтворення експериментальної стрептозотозин-індукованої моделі цукрового діабету 2 типу у щурів / Т. І. Галенова, В. В. Конопельнюк, О. М. Савчук [та ін.] // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 50–54.
13. Іскра Р. Я. Вплив цитрату на вуглеводний обмін у крові щурів за стрептозотозин-індукованого діабету / Р. Я. Іскра, О. М. Слівінська // Медична хімія. – 2014. – Т. 16, № 3 (60). – С. 16–19.
14. Anti-diabetic properties of chromium citrate complex in alloxan-induced diabetic rats / F. Li, X. Wu, T. Zhao [et al.] // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2011. – V. 25, № 4. – P. 218–224.

К. В. Садогурська, Р. Б. Косуба, І. М. Яремій, В. Г. Зеленюк
Вивчення гіпоглікемічної активності нанохрому цитрату в тварин
з експериментальним цукровим діабетом 2 типу

Зважаючи на поширеність цукрового діабету (ЦД) у світі, тяжкість перебігу та ускладнення, пошук засобів і методів лікування цієї недуги є однією з актуальних медичних та соціальних проблем сучасності.

Мета дослідження – з'ясувати ефективність застосування нанохрому цитрату як засобу корекції за експериментального ЦД 2 типу.

На моделі дексаметазонового (0,125 мг/кг, 14 діб) ЦД у 18-місячних щурів-самців досліджено вплив нанохрому цитрату (НХЦ, 0,01 мг/кг) на рівень глікемії, інсулінемії, інсулінорезистентності (НОМА-IR), морфоструктуру підшлункової залози, показники ліпідного та білкового обміну порівняно з препаратом метформіном. У разі вивчення морфоструктури підшлункової залози враховували кількість, розподіл за розміром панкреатичних островців, їхній клітинний профіль. Визначення біохімічних показників у сироватці крові проводили фотоколориметрично за загальноприйнятими методиками з використанням діагностичних наборів «Реагент» та НВП «Філісіт-діагностика» (Україна).

На 14 добу моделювання ЦД, коли рівень глюкози в крові зріс в 2,6 разу, профілактично-лікувальне застосування НХЦ сприяло зниженню рівня глікемії вдвічі ($6,63 \pm 0,34$) ммоль/л проти ($14,22 \pm 0,36$) ммоль/л за ЦД. У разі ЦД на тлі підвищеного вмісту інсуліну в сироватці крові ($4,2 \pm 0,20$) мкОд/мл введення НХЦ знизило вміст інсуліну в 2,3 разу ($1,8 \pm 0,09$) мкОд/мл до рівня інтактних тварин, індекс (НОМА-IR) знизився в 6,4 разу з ($3,33 \pm 0,26$) до ($0,52 \pm 0,03$). За виразністю гіпоглікемічної дії застосування НХЦ на тлі ЦД не поступається препарату порівняння метформіну, а захисний його ефект на морфоструктуру підшлункової залози переважає вплив метформіну. Під впливом НХЦ у сироватці крові тварин з ЦД знизився вміст загальних ліпідів, загального холестерину, зріс холестерин ЛПВЩ та нормалізувався вміст сечовини.

Під впливом нанохрому цитрату на тлі експериментального ЦД показники глікемії, інсулінемії та інсулін-глюкозного зв'язку (НОМА-IR) знижуються до рівня інтактних тварин. Нанохрому цитрат також запобігає пошкодженню гістоструктури підшлункової залози, нормалізує порушені показники ліпідного обміну. За ефективністю коригуючого впливу на показники вуглеводного, ліпідного, білкового обміну та протективною дією на морфоструктуру підшлункової залози НХЦ за умов ЦД 2 типу не поступається препарату порівняння метформіну.

Ключові слова: нанохрому цитрат, гіпоглікемічна дія, цукровий діабет 2 типу

Е. В. Садогурская, Р. Б. Косуба, И. Н. Яремий, В. Г. Зеленюк
Изучение гипогликемической активности нанохрома цитрата у животных
с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа

Учитывая распространение сахарного диабета (СД) в мире, тяжесть течения и осложнения, поиск средств и методов лечения этой болезни является одной из актуальных медицинских и социальных проблем современности.

Цель исследования – выяснить эффективность применения нанохрома цитрата как средства коррекции при экспериментальном сахарном диабете 2 типа.

На модели дексаметазонового (0,125 мг/кг, 14 суток) сахарного диабета (СД) у 18-месячных крыс-самцов исследовано влияние нанохрома цитрата (НХЦ, 0,01 мг/кг) на уровень гликемии, инсулинемию, инсулинорезистентность (НОМА-IR), морфоструктуру поджелудочной железы, показатели липидного и белкового обмена в сравнении с препаратом метформина. При изучении морфологической структуры поджелудочной железы учитывали количество, распределение по размеру панкреатических островков, их клеточный профиль. Определение биохимических показателей в сыворотке крови проводили фотокolorиметрически по общепринятым методикам с использованием диагностических наборов «Реагент» и НПП «Филисит-диагностика» (Украина).

На 14 сут моделирования СД, когда уровень глюкозы в крови возрос в 2,6 раза, профилактическо-лечебное применение НХЦ способствовало снижению уровня гликемии вдвое ($6,63 \pm 0,34$ ммоль/л против $14,22 \pm 0,36$ ммоль/л при СД). При СД введение НХЦ привело к снижению содержания инсулина в 2,3 раза (с $4,2 \pm 0,20$ мкОд/мл до $1,8 \pm 0,09$ мкОд/мл) до уровня интактных животных, индекс (НОМА-IR) снизился в 6,4 раза (с $3,33 \pm 0,26$) до $0,52 \pm 0,03$). По выраженности гипогликемического действия применение НХЦ на фоне СД не уступает препарату сравнения метформину, а защитный его эффект на морфоструктуру поджелудочной железы превосходит влияние метформина. Под влиянием НХЦ в сыворотке крови животных с СД снизилось содержание общих липидов, общего холестерина, вырос холестерин ЛПВП и нормализовалось содержание мочевины.

НХЦ у крыс с моделью дексаметазонового СД уменьшает уровень гликемии, повышает содержание инсулина в сыворотке крови до уровня интактных животных, предотвращает повреждение гистоструктуры поджелудочной железы, нормализует показатели липидного обмена. По эффективности корректирующего влияния на показатели углеводного, липидного, белкового обмена и протективного действия на морфоструктуру поджелудочной железы НХЦ при СД 2 типа не уступает препарату сравнения метформину.

Ключевые слова: нанохрома цитрат, гипогликемическое действие, сахарный диабет 2 типа

K. V. Sadohurska, R. B. Kosuba, I. M. Yaremiy, V. G. Zeleniuk
Study of hypoglycemic activity of nanochromium citrate in animals with experimental type 2 diabetes mellitus

Considering occurrence of diabetes mellitus (DM) in the world, diabetes morbidity and complications severity, the search of methods of treatment of this disease is one of the topical medical and social issues today.

The aim of the study was to find out the efficacy of nanochromium citrate administration as the means of correction in case of simulated type 2 diabetes mellitus.

The effects of nanochromium citrate (NCC, 0,01 mg/kg) on the level of glycemia, insulinemia, insulin resistance (НОМА-IR), morphologic structure of the pancreas, indices of lipid and protein metabolism as compared to metformin were examined on the model of diabetes mellitus (DM) induced by dexamethasone (0,125 mg/kg, 14 days) in 18-month male rats. While investigating morphologic structure of the pancreas the number, distribution and cellular profile of pancreatic islets (Langerhans islets) by their size were considered. Biochemical indices of the blood serum were determined by means of photocolormetric and common methods using diagnostic sets «Reagent» and the package «Filisit-Diagnostics».

On the 14th day of simulating DM when glucose level in the blood was 2,6 times higher, administration of NCC with preventive-therapeutic purpose reduced hyperglycemia level in 2,2 times ($6,63 \pm 0,34$ mmol/l versus $14,22 \pm 0,36$ mmol/l in DM). In DM associated with elevated insulin content in the blood serum ($4,2 \pm 0,20$ μ U/ml), administration of NCC decreased the blood serum insulin by 2,3 times ($1,80 \pm 0,09$ μ U/ml) to the level of those in intact animals, and HOMA-IR index decreased by 6,4 times (from $3,33 \pm 0,26$ to $0,52 \pm 0,03$). Hypoglycemic action of NCC is not worse than that of metformin, and its protective effect on the morphologic structure of the pancreas was higher than that of metformin. NCC in the blood serum of animals with DM reduced the content of total lipids, total cholesterol and reduced the content of cholesterol of high density lipoproteins and normalized urea content.

At dexamethasone simulated diabetes mellitus in rats NCC reduces glycemia level, insulinemia and insulin-glucose ratio to the level of those in intact animals. NCC also prevents damage of the histological structure of the pancreas, normalizes indices of lipid metabolism. NCC in case of type 2 DM is not worse than that of metformin by its effect on the indices of carbohydrate, lipid, protein metabolism and protective action on the morphological structure of the pancreas.

Key words: nanochromium citrate, hypoglycemic action, type 2 diabetes mellitus

Надійшла: 3 вересня 2017 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 04 17. Електронна пошта: sadogurska.katya@ukr.net

О. А. Фіцнер, М. В. Хайтович

Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей мелатоніну

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

Ключові слова: мелатонін, антиоксиданти, напівемпіричний метод квантово-хімічних розрахунків

Останнім часом активно вивчається роль мелатоніну в лікувальній практиці. Мелатонін (N-ацетил-5-метокси-триптамін або N-[2-(5метокси-1H-індол-5-іл)етил] ацетиламід) (рис. 1) – основний гормон епіфіза, регулятор добових ритмів. Його синтез відбувається з L-триптофану за участю триптофан-гідроксилази, декарбоксилази ароматичних амінокислот, серотонін-N-ацетилтрансферази, гідроксиіндол-O-метилтрансферази. Проміжним продуктом синтезу є серотонін (5-окситриптамін). Саме з нього в нічний час під дією серотонін-N-ацетилтрансферази утворюється N-ацетилсеротонін, який після O-метилування ферментом гідроксиіндол-O-метилтрансферазою перетворюється на мелатонін [1, 2].

Ефекти мелатоніну пов'язані з дією на власні рецептори (MEL-1 (MEL-1A, MEL-1B, MEL-1C) та MEL-2). Вони розташовані практично на клітинах усіх органів і тканин людини – в ендотелії судин, серці, головному мозку, нирках, нейтрофілах, лімфоцитах тощо. Висока щільність специфічних мелатонінових рецепторів виявлена на мембранах нейронів [1].

Результати останніх досліджень показали, що мелатонін характеризується великим спектром біологічних ефектів, а саме: снодійним, антиоксидантним, протипухлинним, адаптогенним, антистресовим, антидепресивним, імуномодуючим [3, 4].

Антиоксидантні властивості мелатоніну пов'язані зі здатністю зв'язувати найтоксичніший гідроксильний радикал, що утворюється за перекисного окиснення ліпідів, а також пероксині-

трит та оксид азоту [5]. Ймовірні два механізми нейтралізації вільних радикалів мелатоніном. Перший – передача електрона від молекули мелатоніну до активного радикала з утворенням катіона-радикала мелатоніну та аніона, наступним транспортом протона від катіона-радикала до аніона з утворенням мелатонін-радикала та R-H. Інший – прямий перенос атома водню між мелатоніном та вільним радикалом [3, 5]. Також мелатонін стимулює активність антиоксидантних ферментів – глутатіон-пероксидази, глутатіон-редуктази, супероксиддисмутази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [1]. Отже мелатонін сприяє синтезу глутатіону, пригнічує синтез оксиду азоту, знижує продукцію радикалів пероксинітриту. Антиоксидантні властивості мелатоніну роблять його ефективним компонентом програми попередження загибелі клітин у наслідок некрозу або апоптозу під впливом різних ксенобіотиків [4, 6].

Завдяки антиоксидантним властивостям мелатонін має виражену нейропротекторну дію. Кількість вільних радикалів, які утворюються в центральній нервовій системі, вища порівняно з іншими органами, що пов'язано з підвищеною потребою в кисні клітин головного мозку, а також відносним місцевим дефіцитом ферментів антирадикального захисту. Мелатонін не тільки захищає нейрони від загибелі під час оксидативного стресу, але й сприяє заміні клітин шляхом стимуляції попередників клітинної поліферації нейронів [6].

Експериментальні дані вказують на здатність мелатоніну зменшувати дисфункцію β-клітин, затримувати розвиток цукрового діабету (ЦД) та його ускладнень, зокрема нейропатії [7–9]. Так, у дослідженні на 24 щурах лінії

Wistar зі стрептозоциновим ЦД та нейропатією введення мелатоніну ($n = 8$) сприяло покращанню нервової провідності [7]. Інше рандомізоване дослідження на щурах лінії Wistar показало, що введення мелатоніну на 8 тижні експерименту сприяло значному зниженню рівня глюкози, тригліцеридів крові, споживанню води та їжі [8]. Експериментальне дослідження на лабораторних тваринах підтвердило здатність мелатоніну зменшувати експресію NF- κ B, I κ B- α та фосфорилування I κ B- α . Терапія мелатоніном сприяла зменшенню кількості прозапальних цитокінів (TNF- α і IL-6), iNOS та COX-2 у сідничному нерві тварин. Результати даного дослідження вказують на нейропротекторний ефект препарату за рахунок зменшення NF- κ B, який активує каскад реакцій оксидативного стресу [9].

Мета дослідження – вивчення електронних та просторових властивостей молекули мелатоніну для встановлення механізмів антиоксидантної активності даної сполуки.

Матеріали та методи. Побудову структурної формули молекули мелатоніну здійснено з використанням програми «ISIS/Draw 2.5». Вивчення просторової будови молекули здійснено за допомогою програми «HyperChem 8.0.8». Оптимізацію геометрії молекули проведено напівемпіричним методом МР3. Для всіх досліджень використано алгоритм Полака-Рібера.

Напівемпіричні методи ґрунтуються на розрахунку молекулярних орбіталей за допомогою параметризованих наборів, що описують різні міжатомні взаємодії. Серед переваг напівемпіричних методів слід також відзначити високу обчислювальну ефективність і достовірність результатів [10].

Міжмолекулярні механізми взаємодії сполук в організмі людини можуть бути описані різними показниками: зарядами на атомах, потенціалами іонізації (енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі (ВЗМО), спорідненістю до електрона (енергія нижчої вакантної молекулярної орбіталі (НВМО) [11].

Розраховано квантово-хімічні та енергетичні показники для молекули

мелатоніну, а саме: загальні розміри молекули (Å); розміри кутів між зв'язками (°); заряди на атомах; розподіл електростатичного потенціалу в молекулі; енергію та локалізацію ВЗМО та НВМО (eV); загальну енергію напруги молекули (ккал/моль); теплоту утворення (ккал/моль); значення дипольного моменту (Д); абсолютну жорсткість (η) (eV) [11–13].

Результати та їх обговорення. На рисунку 1 зображено структурну формулу молекули мелатоніну. На рисунку 2 надано тривимірну структуру молекули мелатоніну, отриману в результаті квантово-хімічних розрахунків. Нумерацію атомів показано на рисунку 3.

Згідно з результатами дослідження, розміри молекули мелатоніну за всіма складають: X – 7,32 Å; Y – 4,16 Å; Z – 11,31 Å. Відстані між атомами надано в таблиці 1.

На рисунку 4 зображено значення зарядів на атомах у молекулі мелатоніну. Найнегативніші заряди в молекулі спостерігаються на атомах кисню O3 (-0,371), O2 (-0,191) та вуглецю C5 (-0,209), C8 (-0,193). Найпозитивніші заряди мають атоми вуглецю C4 (0,238), азоту N9 (0,252) та водню H 21 (0,139) H 23 (0,124).

Для встановлення механізму взаємодії лікарських засобів з рецепторами організму важливе значення має визначення розподілу електростатичного потенціалу. Негативні та позитивні

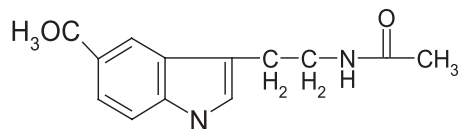


Рис. 1. Структура молекули мелатоніну

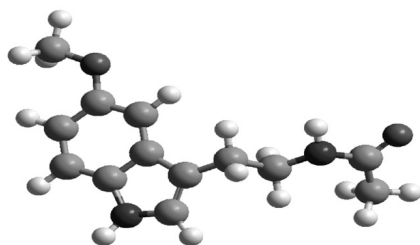
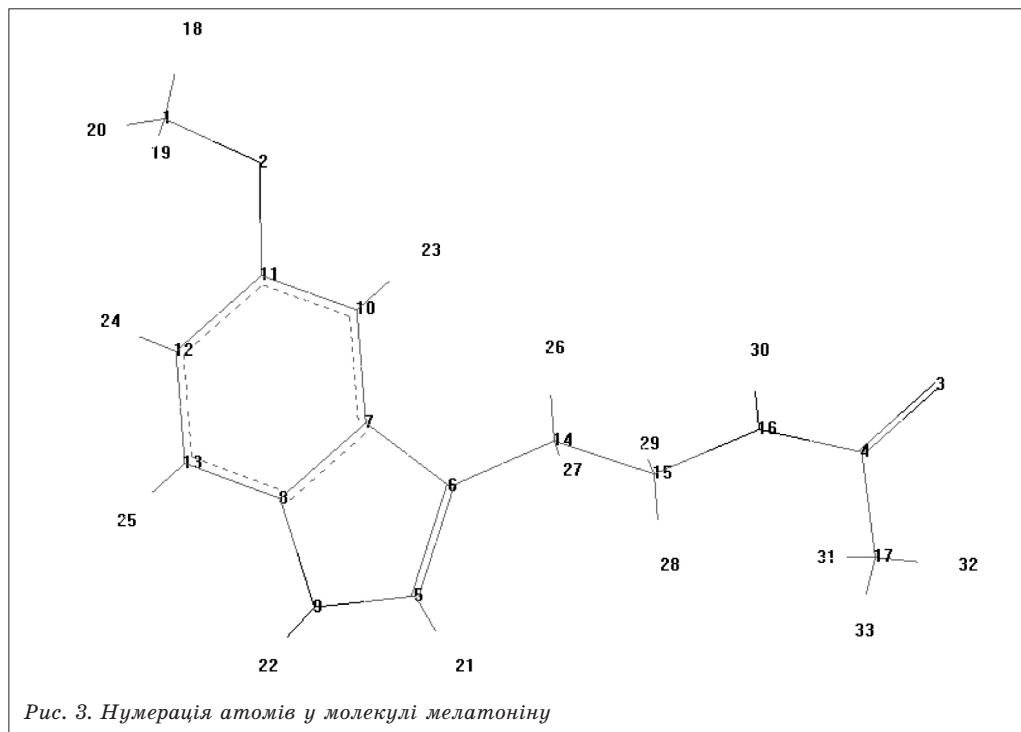


Рис. 2. Тривимірна структура молекули мелатоніну



Таблиця 1
Відстань між атомами в молекулі мелатоніну, Å

1	R1 – R9	6,42
2	R2 – R9	5,53
3	R2 – R3	8,74
4	R3 – R10	7,07
5	R6 – R13	3,64
6	R5 – R15	3,24
7	R9 – R16	5,82
8	R11 – R16	6,56
9	R14 – R16	2,45
10	R16 – R17	2,54

значення потенціалу вказують на можливість взаємодії з електрофілами та нуклеофілами відповідно. На рисунку 5 наведено конгурний графік розподілу електростатичного потенціалу молекули мелатоніну. Чим вища густина ліній, тим стрімкіше зростає електростатичний потенціал у тому місці. Фактично цей рисунок візуалізує ті області молекули, які будуть взаємодіяти з позитивно зарядженими центрами молекули.

Атоми кисню в молекулі мелатоніну мають негативний електростатичний

потенціал і здатні до протонування. Одже, саме ці атоми беруть участь у формуванні водневих зв'язків у разі взаємодії мелатоніну з активними центрами рецепторів.

Основним механізмом антиоксидантної активності речовин, які мають у своєму складі азотвмісний гетероцикл, є взаємодія з утвореними в результаті перекисного окиснення ліпідів перокси- (ROO^\bullet) та алкоксирадикалами (RO^\bullet), за участю рухомого атома водню біля азоту в складі гетероциклу [14].

Важливим показником антиоксидантної активності є значення енергії граничних орбіталей. Відповідно до літературних джерел, вищим антиоксидантним властивостям токоферолу ацетату порівняно з іонолом відповідають більші значення енергії ВЗМО та відповідно нижчі величини іонізованого потенціалу, що свідчить про більш високу електронодонорну активність. Ці закономірності зберігаються за різних методів розрахунку енергії граничних молекулярних орбіталей: розширеного методу Хюккеля, AM1, MP3 [15].

На рисунку 6 представлено локалізацію ВЗМО та НВМО в молекулі мелатоніну.

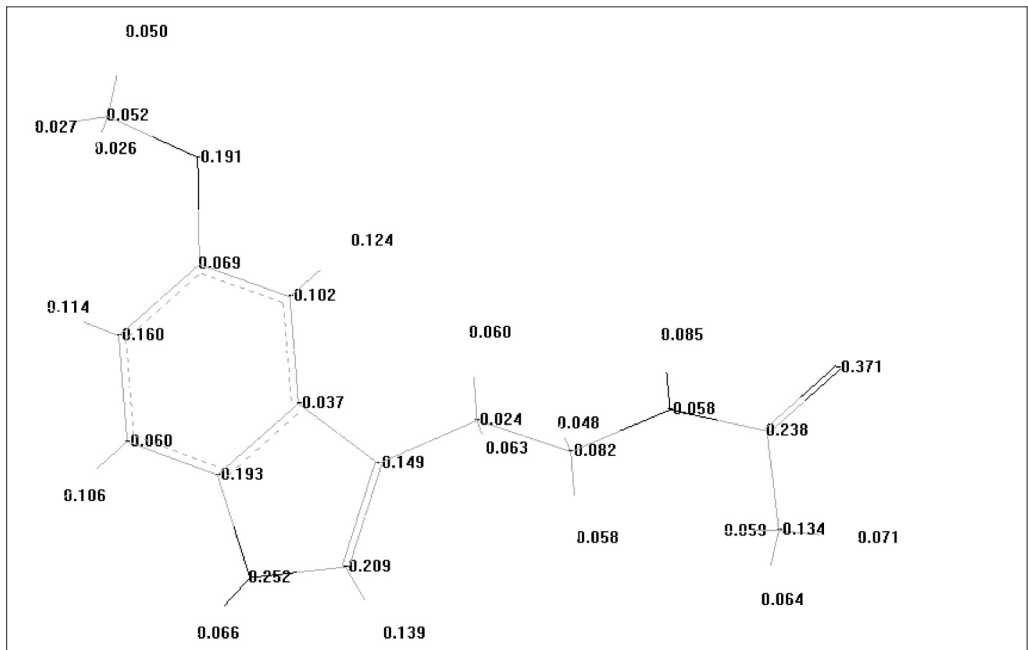


Рис. 4. Заряди на атомах мелатоніну

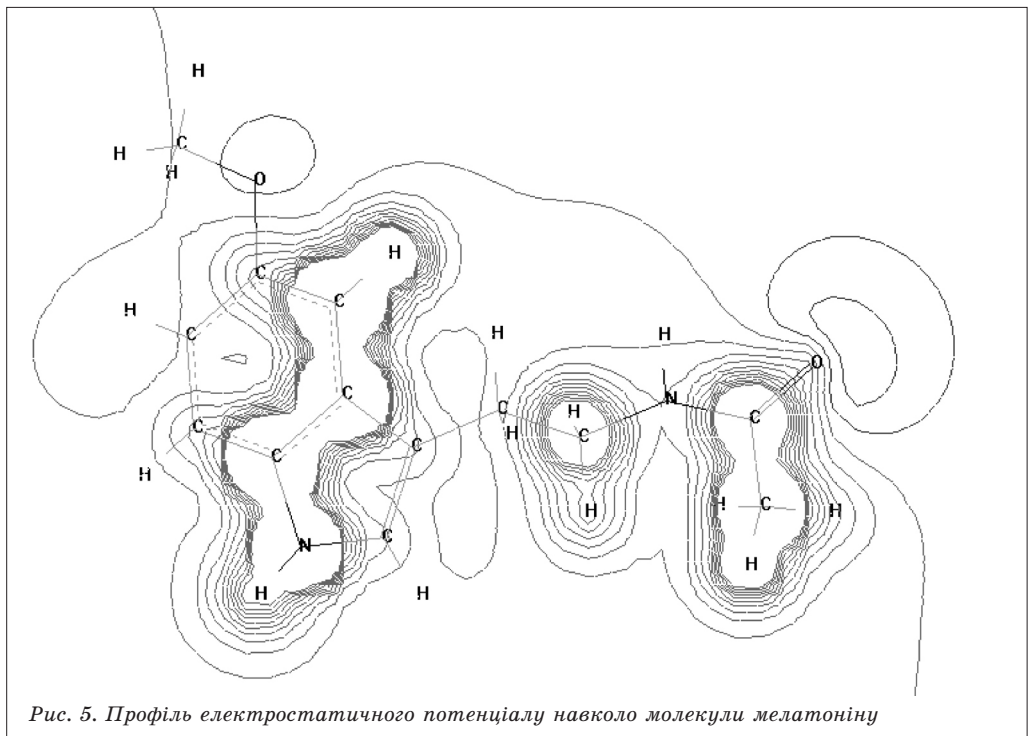
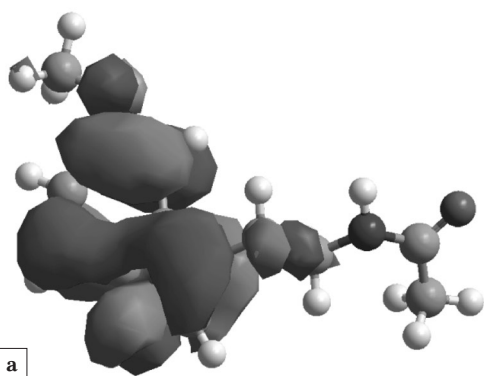


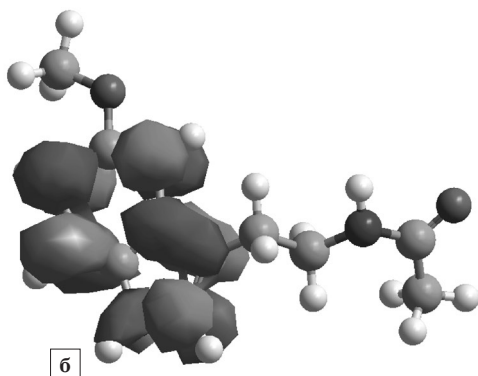
Рис. 5. Профіль електростатичного потенціалу навколо молекули мелатоніну

У молекулі мелатоніну нараховується 84 молекулярні орбіталі. ВЗМО (№ 45) локалізується на атомі кисню метоксигрупи, атомах вуглецю бензольного кільця, водню, який знаходиться біля атома азоту в складі ароматичного гетероциклу, та має енергію

-8,421 еВ. НВМО (№ 46) знаходиться на атомах вуглецю гетероциклу та має енергію -0,179 еВ. Показово, що ВЗМО знаходиться на рухомому атомі водню азотвмісного гетероциклу, завдяки якому, найімовірніше, мелатонін виявляє свої антиоксидантні властивості.



а



б

Рис. 6. Локалізація вищої зайнятої (а) та нижчої вакантної (б) молекулярних орбіталей у молекулі мелатоніну

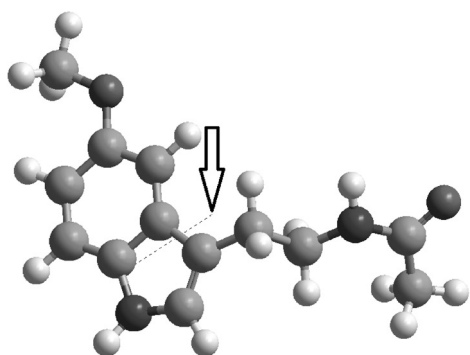


Рис. 7. Напрямок дипольного моменту в молекулі мелатоніну

Дипольний момент молекули мелатоніну (рис. 7) складає 5,79 D, що свідчить про її полярність.

За значеннями енергії ВЗМО та НВМО розрахована абсолютна жорсткість молекули (η) [11]:

$$\eta = 1/2 (E_{\text{нвмо}} - E_{\text{взмо}}).$$

Порівнюючи значення абсолютної жорсткості, можна зробити висновок, що мелатонін є м'яким реагентом ($\eta = 4,12$). Негативне значення енергії НВМО зумовлює електрофільні властивості молекули. У таблиці 2 надано енергетичні характеристики молекули мелатоніну.

Висновки

1. Встановлені квантово-хімічні та енергетичні параметри молекули мелатоніну: загальні розміри молекули (за всіяма) складають: X – 7,32 Å; Y – 4,16 Å; Z – 11,31 Å, енергія ВЗМО

Таблиця 2

Загальні енергетичні характеристики молекули мелатоніну

Показники	Значення
Загальна енергія, ккал/моль	-62233,4
Теплота утворення, ккал/моль	-48,1
Енергія ВЗМО, еВ	-8,421
Енергія НВМО, еВ	-0,179
Дипольний момент сумарний, дебай	5,79
Абсолютна жорсткість, еВ	4,12

(-8,421 еВ), енергія НВМО (-0,179 еВ), абсолютна жорсткість (4,12 еВ), напрямок та значення дипольного моменту (5,79 дебай), загальна енергія (-62233,4 ккал/моль), теплота утворення (-48,1 ккал/моль), що дозволяє поглибити сучасні уявлення про механізми його фармакологічної дії.

- У молекулі мелатоніну найпозитивніший заряд має атом азоту N9, найнегативніший заряд атом кисню O3. Також, атоми кисню мають негативний електростатичний потенціал і здатні до протонування. ВЗМО знаходиться на рухомому атомі водню азотвмісного гетероциклу.
- Результати квантово-фармакологічних досліджень свідчать, що водень, який знаходиться біля атома азоту в складі гетероциклу, має важливе значення для реалізації антиоксидантних властивостей мелатоніну.

1. Дорогой А. П. Мелатонін – основний гормон передньої долі епіфізу (шишковидної залози). Біологічне і клінічне значення гормона в кардіологічній практиці [Електронний ресурс] / А. П. Дорогой. – 2006 – Режим доступу: <http://www.journal.ukrcardio.org>.
2. Мелатонин: теория и практика / А. Ю. Беснятых, В. Я. Бродский, О. В. Бурлакова [и др.]. – Москва : Медпрактика-М, 2009. – 100 с. – (ISBN 978-5-98803).
3. Galano A. Melatonin as a naturally against oxidative stress: a physicochemical examination [Електронний ресурс] / A. Galano, X. Dun, J. Russel // Pineal Research. – 2011. – Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com>.
4. Левин Я. И. Мелатонин (Мелаксен) в неврологической практике [Електронний ресурс] / Я. И. Левин // CONSILIUM MEDICUM. – 2012. – Режим доступу: <https://medi.ru/info/4924/>.
5. Особенности функционирования глутатионовой антиоксидантной системы крови больных с синдромом тиреотоксикоза при комбинированной терапии с мелаксеном [Електронний ресурс] / М. В. Горбенко, С. С. Попов, К. К. Шульгин [и др.] // Вестник ВГУ, серия : Химия. Биология. Фармация. – 2013. – Режим доступу: <http://www.vestnik.vsu.ru/pdf/chem-bio/2013/02/2013-02-17>.
6. Квантово-фармакологический прогноз биологических свойств мелатонина как обоснование рациональности его использования в спорте / Л. М. Гунина, Т. Ю. Небесная, Р. В. Головащенко [и др.]. // Современные здоровьесберегающие технологии. – 2016. – № 3. – С. 24–31.
7. Seyit D. A. Evaluation of Electrophysiological Effects of Melatonin and Alpha Lipoic Acid in Rats with Streptozotocine Induced Diabetic Neuropathy. [Електронний ресурс] / D. A. Seyit, E. Degirmenci, A. Oguzhanoglu // Exp Clin Endocrinol Diabetes. – 2016. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27219687>.
8. Effects of melatonin on biochemical factors and food and water consumption in diabetic rats [Електронний ресурс] / B. Bibak, M. Khalili, Z. Rajaei [et al.] // Adv Biomed Res. – 2014. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25250287>.
9. Negi G. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades [Електронний ресурс] / G. Negi, A. Kumar, S. S. Sharma // J. Pineal Res. – 2011. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062351>.
10. Квантова хімія: медико-фармацевтичний аспект / І. С. Чекман, Г. Ю. Сирова, О. О. Казакова [та ін.]. – Київ – Харків, 2017. – 139 с.
11. Соловьев М. Е. Компьютерная химия / М. Е. Соловьев, М. М. Соловьев. – Москва : Солон-пресс, 2005. – С. 536
12. Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей силімарину / І. С. Чекман, Г. А. Поготова, Т. Ю. Небесна, Т. Ю. Горчакова. // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 2. – С. 24–28.
13. Встановлення квантово-хімічних основ фармакокінетичних властивостей компонентів нової лікарської композиції / І. С. Чекман, Т. В. Звягінцева, Г. О. Сирова [та ін.]. // Український біофармацевтичний журнал. – 2012. – № 1. – С. 28–32.
14. Зайцев В. Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – № 4. – С. 66–70.
15. Губский Ю. И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография / Ю. И. Губский. – Винница : Нова Книга, 2015. – 360 с.

О. А. Фіцнер, М. В. Хайтович

Квантово-фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей мелатоніну

Мета дослідження – вивчення електронних та просторових властивостей молекули мелатоніну для встановлення механізмів антиоксидантної активності даної сполуки. Вивчення просторової будови молекули мелатоніну здійснено за допомогою програми «HyperChem 8.0.8». Оптимізацію геометрії молекули проведено напівемпіричним методом МР3. Для всіх досліджень використано алгоритм Полака-Рібера.

Встановлено квантово-хімічні та енергетичні параметри молекули мелатоніну, а саме: загальні розміри молекули (за всіма складають: X – 7,32 Å; Y – 4,16 Å; Z – 11,31 Å), енергія ВЗМО (-8,421 eV), енергія НВМО (-0,179 eV), абсолютна жорсткість (4,12 eV), напрямок та значення дипольного моменту (5,79 дебай), загальна енергія (-62233,4 ккал/моль), теплота утворення (-48,1 ккал/моль), що дозволяє поглибити сучасні уявлення про механізми його фармакологічної дії. У молекулі мелатоніну найпозитивніший заряд має атом азоту N9, найнегативніший заряд атом кисню O3. Також атоми кисню мають негативний електростатичний потенціал і здатні до протонування. ВЗМО знаходиться на рухомому атомі водню азотвмісного гетероциклу.

Результати квантово-фармакологічних досліджень свідчать, що водень, який знаходиться біля атома азоту в складі гетероциклу, має важливе значення для реалізації антиоксидантних властивостей мелатоніну.

Ключові слова: мелатонін, антиоксиданти, напівемпіричний метод квантово-хімічних розрахунків

Е. А. Фицнер, Н. В. Хайтович

Квантово-фармакологическое исследование антиоксидантных свойств мелатонина

Цель исследования – изучение электронных и пространственных свойств молекулы мелатонина для установления механизмов антиоксидантной активности данного соединения. Изучение пространственного строения молекулы мелатонина осуществлено с помощью программы «HyperChem 8.0.8». Оптимизация геометрии молекулы проведена полуэмпирическим методом MP3. Для всех исследований использован алгоритм Полака-Рибера.

Установлены квантово-химические и энергетические параметры молекулы мелатонина, а именно: общие размеры молекулы (по осям составляют: X – 7,32 Å; Y – 4,16 Å; Z – 11,31 Å), энергия ВЗМО (-8,421 эВ), энергия НСМО (-0,179 эВ), абсолютная жесткость (4,12 эВ), направление и значение дипольного момента (5,79 дебай), общая энергия (-62233,4 ккал / моль), теплота образования (-48,1 ккал / моль), что позволяет углубить современные представления о механизмах его фармакологического действия. В молекуле мелатонина наибольший положительный заряд имеет атом азота N9, самый отрицательный заряд – атом кислорода O3. Также, атомы кислорода имеют отрицательный электростатический потенциал и способны к протонированию. ВЗМО находится на подвижном атоме водорода азотсодержащего гетероцикла.

Результаты квантово-фармакологических исследований свидетельствуют, что водород, который находится у атома азота в составе гетероцикла, имеет важное значение для реализации антиоксидантных свойств мелатонина.

Ключевые слова: мелатонин, антиоксиданты, полуэмпирический метод квантово-химических расчетов

O. A. Fitsner, M. V. Khaitovych

A quantum-pharmacological study of melatonin's antioxidant properties

The aim of the work – to study the electronic and spatial properties of the melatonin molecule to determine the mechanisms of antioxidant activity for this compound. The studying of the spatial structure of the melatonin molecule was carried out using the HyperChem 8.0.8 program. Optimization of the molecule's geometry was carried out by the semiempirical method MP3. The Polaco-Ribera algorithm was used for all investigations.

The quantum-chemical and energy parameters of the melatonin's molecule were established: the total dimensions of the molecule (on the axes are: X – 7,32 Å; Y – 4,16 Å; Z – 11,31 Å); HOMO energy (-8,421 eV), LUMO energy (-0,179 eV), absolute stiffness (4,12 eV), direction and value of the dipole moment (5,79 dB), total energy (-62233,4 kcal / mol), heat of formation (-48,1 kcal / mol), which allow to extend contemporary ideas about the mechanisms of its pharmacological action. In the molecule of melatonin, a nitrogen atom N9 has the largest positive charge, oxygen atom O3 has the most negative charge. Also, oxygen atoms have a negative electrostatic potential and are capable to protonation. HOMO is located on the mobile hydrogen atom of the nitrogen-containing heterocycle.

The results of quantum-pharmacological studies indicate that hydrogen, that is located at the nitrogen atom in the composition of heterocycle, is important for the realization of the antioxidant properties of melatonin.

Key words: melatonin, antioxidants, semiempirical method of quantum-chemical calculations

Надійшла: 8 серпня 2017 р.

Контактна особа: Фицнер Олена Анатоліївна, аспірант, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 39/1, вул. Шовковична, м. Київ, 01601. Тел.: + 38 0 67 909 90 65.
Електронна пошта: lfitsner@gmail.com

О. І. Яцина¹, О. В. Паршиков², Ф. І. Костєв³, А. І. Соловійов²

Зміни скоротливої діяльності гіперактивного сечового міхура щурів під впливом троспію хлориду

¹Державна установа «Інститут урології

Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Державна установа «Інститут фармакології та токсикології

Національної академії медичних наук України», м. Київ

³Одеський національний медичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Ключові слова: гіперактивний сечовий міхур, фармакотерапія, троспію хлорид, скоротлива активність детрузора

Клінічні прояви синдрому гіперактивного сечового міхура (ГСМ) набувають поширення як наслідки вікових розладів та хронічних захворювань органів сечовивідної системи. За даними епідеміологічних досліджень вважають, що імперативним сечовипусканням страждають понад 25 % дорослого населення. Симптоми захворювання, що супроводжуються частим і неконтрольованим сечовипусканням, значно погіршують якість життя хворих, тому впровадження ефективних засобів лікування залишається актуальною проблемою сучасної урології.

У більшості хворих терапія спрямована на полегшення симптомів, проте останнім часом ГСМ визнається як системне хронічне захворювання. Принципи лікування базуються на зменшенні частоти сечовипускання, кількості епізодів нетримання сечі та ноктурії [1]. Розповсюдженим засобом лікування ГСМ є препарати на основі М-холінолітиків, що як антагоністи рецепторів ацетилхоліну блокують вплив еферентних нервових стимулів на функції сечового міхура [2]. Серед препаратів цієї групи найвідоміший троспію хлорид (ТХ), який призначають хворим на тривалий термін для усунення симптомів ГСМ [3]. Проте вплив такого лікування на стан скоротливої діяльності сечового міхура не визначений. *Мета дослідження* – вивчення особливостей нейрогенних і агоніст-залежних реак-

цій смужок сечового міхура, ізольованого в щурів з ГСМ після курсового введення ТХ.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на 34 дорослих щурах-самках популяції Вістар масою 200–250 г, розподілених на 3 групи: 1 – контрольні тварини (К); 2 – тварини з ГСМ (ГСМ), яким вводили препарат хомвіотензин (Хомвіотензин, Маурман-Арцнайміттель КГ, Німеччина), щоденно внутрішньоочеревинно протягом 2 тижнів, у дозі 0,45 мг/кг маси тіла в розрахунку на діючу речовину резерпін; 3 – тварини з ГСМ, яким вводили препарат спазмекс (Спазмекс, Др Р. Пфлегер фабрика ГмбХ, Німеччина), щоденно внутрішньошлунково протягом 2 тижнів у дозі 2 мг/кг маси тіла в розрахунку на діючу речовину ТХ. Евтаназію щурів проводили під тіопенталовим наркозом на 14 і 30 добу експерименту. Усі процедури з тваринами проводили відповідно до правил щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях [4, 5].

Сечовий міхур (СМ) видаляли в щурів через 24–48 год після введення будь-яких препаратів і зберігали в охолодженому (4 °С) сольовому розчині Кребса такого складу (ммоль/л): 132 NaCl, 4,7 KCl, 1,4 NaH₂PO₄, 1,0 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 6,5 глюкози, рН 7,4 підтримували шляхом продування розчину газовою сумішшю 5 % CO₂/95 % O₂. Ізольований СМ очищували від залишків жирової та сполучної тканини, розрізали на 6–8 фрагментів (поздовжні смужки 2–3 мм завтовшки), які трима-

ли охолодженими до проведення дослідів. Скоротливу активність СМ, ізольованих у щурів усіх експериментальних груп, досліджували в ізометричному режимі. Смужки розміщували в проточній камері (1 мл) у розчині Кребса (35 °С) і розтягували на металевих гачках з попереднім навантаженням 1 г (10 mN). Силу м'язових скорочень детрузора реєстрували за допомогою тензометричних датчиків (ФТК-0.1, С. К. Качановський, Україна), адаптера LabTrax 4-CDA (WPI, США), програмного забезпечення DataTrax 2 (WPI, США).

Вимірювання амплітуди скоротливих реакцій гладеньких м'язів СМ проводили після стабілізації їхньої активності протягом 40–60 хв, а максимальний рівень скорочення окремих смужок під дією гіперкалієвого розчину Кребса (120 ммоль/л КСl) приймали за 100 % для подальших розрахунків (% КСl). Оцінювали відповідь гладеньких м'язів на стимуляцію ацетилхоліном і АТФ (кумулятивний доза-ефект), а також реакцію смужок на подразнення нервових закінчень шляхом трансмуральної стимуляції електричним полем (СЕР) протягом 10 с з інтервалом 2 хв (0,4 мс, 1–50 Гц, 60 В) за допомогою платинових електродів, розміщених у камері [6].

У дослідженні використовували солі кваліфікації х. ч. і ч. д. а., вітчизняного виробництва. Ацетилхолін (АХ), карбахолін (КХ), атропін (АТ), АТФ, $\alpha\beta$ -метилен-АТФ (ab-MeATФ) виробництва Sigma (США). Достовірність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента, розбіжності вважали значущими за $p \leq 0,05$. Статистичну обробку та графічне оформлення результатів дослідження проводили з використанням комп'ютерних програм OriginPro 8.1 (OriginLab Co, США) і Excel (Microsoft, США).

Результати та їх обговорення. Експериментальну модель ГСМ у щурів отримали згідно з процедурою, яка базується на порушенні метаболізму та спустошенні депо катехоламінів в організмі тварин внаслідок тривалого введення резерпіну [7]. Відомо, що зниження рівня норадреналіну призводить

до послаблення гальмівної ланки рефлекторної регуляції скоротливої діяльності СМ шляхом редукції пресинаптичного інгібування за участю $\alpha 1$ -адренорецепторів парасимпатичних нервових закінчень та прямого ефекту розслаблення за участю β -адренорецепторів і супроводжується значним підвищенням базального тону, збудливості та неконтрольованими скороченнями детрузора у відповідь на стимуляцію [8].

Порівняльні дослідження засвідчили, що за абсолютними показниками амплітуда скорочення (E_{max} , mN) смужок СМ щурів групи ТХ у відповідь на 120 ммоль/л КСl ($14,9 \pm 1,8$) mN) була нижчою порівняно зі смужками контрольних тварин ($20,6 \pm 1,5$) mN) і тварин з ГСМ ($21,6 \pm 1,9$) mN). Ця тенденція також проявилася у відповідях на карбахолін (КХ, 10^{-5} моль/л), а саме реакція КХ-індукованого скорочення смужок щурів групи ТХ ($124,7 \pm 5,0$) % була пригніченою порівняно з контрольними тваринами ($191,7 \pm 33,0$) % і тваринами з ГСМ ($219,7 \pm 12,9$) %. Отримані результати свідчать, що скорочення смужок СМ під дією високої концентрації K^+ та карбахоліну в контрольних і ГСМ тварин не відрізнялися між собою, тобто, базова активність механізмів скорочення гладеньких м'язів залишалася на сталому рівні на відміну від тварин групи ТХ [9]. Серед можливих причин таких змін у реакції детрузора тварин групи ТХ на стимуляцію є збереження впливу на скоротливу активність гладеньких м'язів через 24–48 год після останнього введення препарату, а також ефект тривалої дії препарату на стан нейрогенних шляхів регуляції СМ, зокрема, порушення механізмів вивільнення або постсинаптичної дії трансмітерів.

Відомо, що нейрогенний контроль фізіологічних функцій СМ здійснюється за участю щільної мережі нервових закінчень і численних медіаторних механізмів (холінергічних, пуринергічних, адренергічних тощо), які відповідним чином впливають на регуляцію тривалості стану тонічного розслаблення й збудження регулярної скоротливої

діяльності [6]. Дослідження фазних скоротливих реакцій фрагментів СМ, опосередкованих подразненням нервових закінчень шляхом їхньої СЕП (частотно-залежний ефект) вказують на те, що СЕП-індуковані скорочення (E_{max} , % КСІ) смужок ізольованих у щурів з ГСМ ($241 \pm 4,5$ %) і групи ТХ ($261,0 \pm 6,9$ %) значно перевищували рівень групи контрольних тварин ($178,5 \pm 3,7$ %), як показано на рисунку 1. Спостерігалося також зменшення частоти СЕП, яка викликала 50 % скорочення (EF_{50} , Hz) у смужок ГСМ ($6,8 \pm 0,3$ Hz) і ТХ ($6,3 \pm 0,5$ Hz) порівняно з контрольними ($8,2 \pm 0,4$ Hz).

Визначення рівня кумулятивного інгібіторного ефекту АТ (10^{-6} моль/л) на СЕП-індуковане скорочення детрузора свідчить про зменшення АХ-чутливого (холінергічного) компонента ($E_{max} - E_{max+AT}$, % КСІ) у відповідях смужок щурів групи ТХ (85,1 %) порівняно з ГСМ (124,9 %) і контролем (108,4 %). Наступне додавання аб-МеАТФ ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) застосовували для визначення АТФ-чутливого (пуринергічного) компонента СЕП-скорочення за рахунок ефекту десенситизації пуринорецепторів, що викликало подальше пригнічення АТ-резистивних скоротливих відповідей ($E_{max+AT} - E_{max+ab-MeATP}$, % КСІ) у смужок контролю (38,3 %) і тварин з ГСМ (54,7 %), але найбільше в смужок тварин групи

ТХ (78,9 %). Рівень скоротливих відповідей, який зберігався після блокування холінергічного та пуринергічного компонентів ($E_{max+AT+ab-MeATP}$, % КСІ), був значно вищим у смужок тварин групи ТХ ($97,3 \pm 4,3$ %) порівняно з контролем ($31,8 \pm 3,5$ %) і смужками тварин з ГСМ ($61,5 \pm 2,2$ %).

Порівняльні дослідження нейрогенних скорочень смужок контрольних і ГСМ тварин узгоджуються з даними стосовно провідної ролі холінергічних механізмів у стимуляції скоротливої діяльності СМ, зокрема, впливу блокаторів М-холінорецепторів на реактивність детрузора [10]. Проте дослідження СЕП-індукованих відповідей смужок тварин групи ТХ вказує на відносно зменшення холінергічного компонента та виразне збільшення пуринергічного компонента в загальному рівні скорочення. Крім того, спостерігали зростання впливу третього компонента, що значною мірою підтримував скорочення в смужок тварин з ГСМ і групи ТХ порівняно з контролем. Цей компонент блокувався індометацином (10^{-5} моль/л) до рівня контролю (дані не представлені), тобто був пов'язаний з синтезом простаноїдів, підвищення вмісту яких в тканині СМ є характерною ознакою вікових фізіологічних змін у людини і супроводжує розвиток ГСМ в експериментах на тваринах [11, 12].

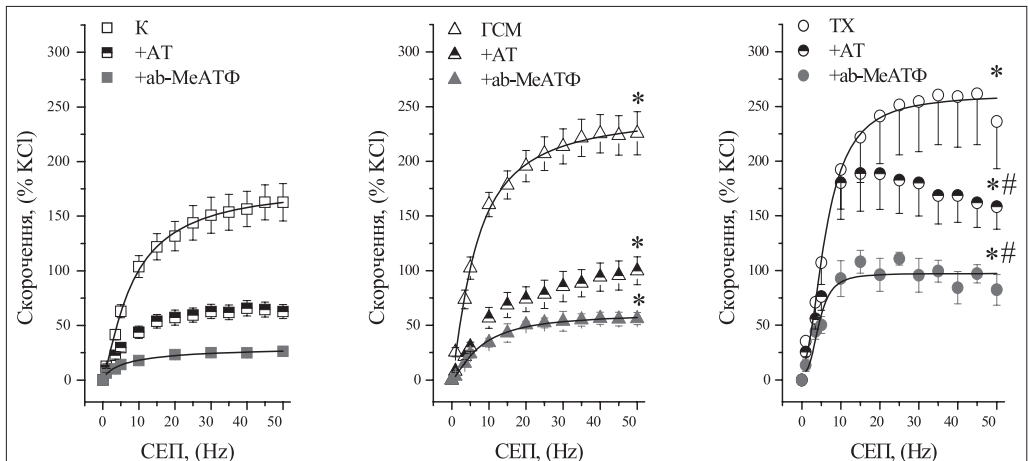


Рис. 1. Скоротлива реакція смужок сечових міхурів щурів у відповідь на стимуляцію електричним полем (СЕП, частотно-залежний ефект) окремо, у присутності атропіну (АТ, 10^{-6} моль/л) і аб-МеАТФ ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Сечові міхури ізольовані в контрольних тварин (К), тварин з гіперактивним сечовим міхуром (ГСМ) і тварин з ГСМ після введення тростію хлориду (ТХ)

Примітка. Тут і на рис. 2: * $P \leq 0,05$ відносно контролю, # $P \leq 0,05$ відносно ГСМ, $n = 10-12$.

Зміни в реакції на стимуляцію агоністами самих гладеньких м'язів СМ у щурів усіх експериментальних груп досліджували за показниками кумулятивного доза-ефекту, залежно від здатності смужок до фазних скорочень, індукованих АХ і АТФ (10^{-8} – 10^{-2} моль/л), як показано на рисунку 2. Встановлено, що за рівнем скоротливих відповідей (E_{\max} , % КСІ) та чутливістю до АХ (EC_{50} , моль/л) смужки контрольних тварин ($151,9 \pm 19,0$ %; $(1,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$ моль/л) і тварин з ГСМ ($150,5 \pm 5,9$ %; $(5,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$ моль/л) не відрізнялися між собою. Характерною ознакою АХ-залежних реакцій у смужок тварин групи ТХ було те, що рівень скоротливих відповідей суттєво зростає ($263,7 \pm 11,0$ %), а чутливість зменшувалася ($(6,0 \pm 1,2) \cdot 10^{-4}$ моль/л) порівняно з контролем і тваринами з ГСМ (зсув вправо кривої доза-ефект). Відомо, що за умови розвитку ГСМ можуть відбуватися порушення у функціонуванні механізмів холінергічної регуляції скоротливої діяльності СМ, які позначаються на чутливості детрузора до АХ і обумовлені кількістю та рівнем представництва різних типів М-холінорецепторів, а також пов'язані з вивільненням АХ з нервових закінчень і уротелію [13]. Наведені відмінності в реакції смужок СМ на АХ дають підстави припускати, що під дією препарату ТХ відбуваються такі зміни в кількісному або якісному скла-

ді М-холінорецепторів, які призводять до зниження чутливості гладеньких м'язів у середньому діапазоні концентрацій і стрімкого підвищення їхньої реактивності в разі стимуляції високими концентраціями агоніста. Натомість, рівень продукції ендogenous АХ у разі стимуляції нейрогенних скорочень СМ може залишатися незмінним або зменшуватися.

Скорочення смужок СМ під впливом АТФ не досягали максимального рівня за умов експерименту (рис. 2), а свідчили про однаково низький рівень чутливості гладеньких м'язів детрузора (EC_{50} , моль/л) у контрольних тварин ($(6,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$ моль/л), тварин з ГСМ ($(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ моль/л) і тварин групи ТХ ($(4,0 \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$ моль/л). Орієнтуючись на розраховані показники, треба зауважити, що скоротливі відповіді смужок на АТФ (E_{\max} , % КСІ) у тварин з ГСМ ($31,6 \pm 0,8$ %) і групи ТХ ($38,7 \pm 4,5$ %) близькі до показників контролю ($40,9 \pm 1,5$ %).

Відомо, що пуринергічний компонент бере участь у парасимпатичній і механосенсорній передачі збудження в СМ [14]. У нормальному фізіологічному стані пуринергічний компонент є пластичним і регульованим багатьма чинниками, зокрема, активація М-холінорецепторів блокує АТФ-залежні механізми скорочення СМ, висока активність екто-АТФаз забезпечує швидкий розпад позаклітинного АТФ, який у

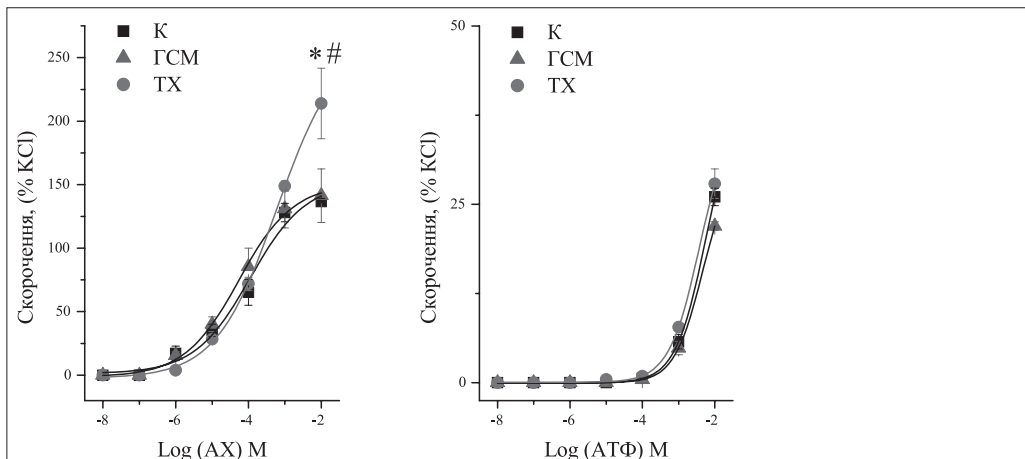


Рис 2. Дозозалежний ефект ацетилхоліну (АХ) і АТФ (10^{-8} – 10^{-2} моль/л) на скоротливу активність смужок сечового міхура, ізольованих у контрольних тварин (К), тварин з гіперактивним сечовим міхуром (ГСМ) і тварин з ГСМ після введення тропію хлориду (ТХ) Примітка. $n = 6-8$.

свою чергу здатен викликати зворотну десенситизацію пуринорецепторів [15]. Разом з тим, за умов розвитку патології (цистит, обструктивні та нейрогенні порушення, діабет, бактеріальні інфекції тощо) роль пуринергічного компонента в активації скоротливої функції СМ суттєво збільшується. Таку саму тенденцію спостерігали в тварин групі ТХ, порівняно з тваринами з ГСМ, тобто, блокування холінергічного компонента внаслідок введення препарату не призводило до зменшення гіперактивної відповіді детрузора, проте зростала участь інших регуляторних механізмів у формуванні нейрогенного скорочення, зокрема пуринергічного компонента та простаноїдів.

Отримані дані необхідно враховувати при застосуванні М-холінолітиків у

комбінації з іншими лікарськими засобами, що дозволить впливати на різні ланки в регуляції скоротливої активності СМ і покращати ефект лікування.

Висновки

1. За експериментального моделювання ГСМ у щурів спостерігали збільшення амплітуди нейрогенних відповідей ізольованих смужок детрузора, переважно за рахунок холінергічного компоненту активації скорочення.
2. Введення тваринам ТХ специфічним чином посилювало патологічні зміни в регуляції скоротливої діяльності ГСМ, а саме збільшувалася участь пуринергічного компоненту та простаноїдів у регуляції нейрогенних скорочень на тлі зменшення холінергічного компонента.

1. Hashim H. Overactive bladder: an update / H. Hashim, P. Abrams // *Curr Opin Urol.* – 2007. – V. 17 (4). – P. 231–236.
2. Rovner E. S. Trosipium chloride in the management of overactive bladder / E. S. Rovner // *Drugs.* – 2004. – V. 64. – P. 2433–2446.
3. Trosipium chloride improves overactive bladder symptoms: a multicenter phase II trial. / N. Zinner, M. Gittelman, R. Harris [et al.] // *J Urol.* – 2004. – V. 171. – P. 2311–2315.
4. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 990.
5. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986 р., Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи), (електронний ресурс).
6. Triguero D. Changes in nerve-mediated contractility of the lower urinary tract in a mouse model of premature ageing / D. Triguero, A. Lafuente-Sanchis, A. Garsia-Pascual // *Brit J. Pharmacol.* – 2014. – V. 171. – P. 1687–1705.
7. Костєв Ф. І. Енерготропний ефект препарату кверцетин на гіперактивний сечовий міхур в експерименті / Ф. І. Костєв, Р. В. Савчук // *Одеський медичний журнал.* – 2008. – № 5. – С. 33–35.
8. Andersson K. E. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology / K. E. Andersson, A. Arner // *Physiol Rev.* – 2004. – V. 84. – P. 935–986.
9. Andersson K. E. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence / K. E. Andersson, A. J. Wein // *Pharmacol Rev.* – 2004. – V. 56. – P. 581–631.
10. Prejunctional M1 facilitatory and M2 inhibitory muscarinic receptors mediate rat bladder contractility / A. S. Braverman, I. J. Kohn, G. R. Luthin, M. R. Ruggieri // *Am J. Physiol.* – 1998. – V. 274. – P. R517–R523.
11. Nerve growth factor and prostaglandins in urine from female patients with overactive bladder / J. C. Kim, E. Y. Park, S. I. Seo [et al.] // *J Urol.* – 2006. – V. 175. – P. 1773–1776.
12. Oxidative stress, nitric oxide and prostaglandins E2 levels in the gastrointestinal tract of aging rats / F. Marmol, J. Sanchez, D. Lopez [et al.] // *J. Pharm Pharmacol.* – 2009. – V. 61. – P. 20–206.
13. Fry C. H. The physiological function of lower urinary tract smooth muscle / C. H. Fry, E. Meng, J. S. Young // *Auton Neurosci.* – 2010. – V. 154. – P. 3–13.
14. Burnstock G. Purinergic signaling in the urinary tract in health and disease / G. Burnstock // *Purinergic Signalling.* – 2014. – V. 10. – P. 103–155.
15. Plasticity of non-adrenergic non-cholinergic bladder contractions in rats after chronic spinal cord injury / H. H. Lai, A. Munoz, C. P. Smith [et al.] // *Brain Res Bull.* – 2011. – V. 86 (1–2). – P. 91–96.

О. І. Яцина, О. В. Паршиков, Ф. І. Костєв, А. І. Соловійов

Зміни скоротливої діяльності гіперактивного сечового міхура щурів під впливом троспію хлориду

Досліджували здатність троспію хлориду (ТХ), сучасного представника препаратів М-холінолітиків, впливати на регуляцію скоротливої активності сечового міхура (СМ). Експериментальну модель гіперактивного сечового міхура (ГСМ) у щурів-самок отримали шляхом введення 0,45 мг/кг резер-

піну (Хомвіотензин) протягом 2 тижнів. Для відтворення ефекту лікування тваринам з ГСМ додатково вводили 2 мг/кг ТХ (Спазмекс) протягом 2 тижнів. Досліджували особливості нейрогенних (стимульованих електричним полем) і агоніст-залежних скоротливих відповідей смужок СМ, ізольованих у тварин після введення препаратів.

Встановлено, що рівень нейрогенних скорочень у смужок тварин з ГСМ окремо і після введення ТХ значно перевищували показники контрольних тварин. В активації скорочення смужок ГСМ переважав холінергічний компонент, який пригнічувався в смужок ТХ, вірогідно за рахунок зниження чутливості гладеньких м'язів до ацетилхоліну. Разом з тим, збільшувалося значення пуринаргічного компонента та простаноідів в активації скорочень смужок ТХ. Ефективність застосування ТХ у комбінації з іншими препаратами за ГСМ потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: гіперактивний сечовий міхур, фармакотерапія, тропію хлорид, скоротлива активність детрузора

А. И. Яцина, А. В. Паршиков, Ф. И. Костев, А. И. Соловьев
Изменения сократительной деятельности гиперактивного мочевого пузыря у крыс под влиянием тропия хлорида

Исследовали способность тропия хлорида (ТХ), современного представителя препаратов М-холинолитиков, оказывать влияние на регуляцию сократительной активности мочевого пузыря (МП). Экспериментальную модель гиперактивного мочевого пузыря (ГМП) у крыс-самок получали путем введения 0,45 мг/кг резерпина (Хомвиотензин) в течение 2 недель. Для воспроизведения эффекта лечения животным с ГСМ дополнительно вводили 2 мг/кг ТХ (Спазмекс) в течение 2 недель. Исследовали особенности нейрогенных (стимулированных электрическим полем) и агонист-зависимых сократительных ответов полосок МП, изолированных у животных после введения препаратов.

Установлено, что уровень нейрогенных сокращений полосок животных с ГМП отдельно и после введения ТХ значительно превышали показатели контрольных животных. В активации сокращений полосок ГМП преобладал холинергический компонент, который угнетался у полосок ТХ, вероятно за счет снижения чувствительности гладких мышц к ацетилхолину. Вместе с тем, увеличивалось значение пуринаргического компонента и простаноидов в активации сокращений полосок ТХ. Эффективность применения ТХ в комбинации с другими препаратами при ГМП требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: гиперактивный мочевой пузырь, фармакотерапия, тропия хлорид, сократительная активность детрузора

O. I. Iatsyna, O. V. Parshykov, F. I. Kostev, A. I. Soloviev
Tropium chloride treatment alterates rats hyperactive bladder contractile activity

The effect of trospium chloride (TC), a modern representative of antimuscarinic medicines for urinary bladder (UB) contractility regulation, has been studied. The experiments were performed on female rats following 0,45 mg/kg of reserpine (Homviotensin) treatment within 2 weeks for hyperactive bladder (HAB) modelling. Trospium chloride 2 mg/kg (Spazmex) was additionally administrated to animals with HAB within two weeks to estimate treatment effect. The characteristics of neurogenic contractile responses (induced by electrical filed stimulation) and agonist-dependent reactions of isolated bladder strips were studied.

Bladder strips of HAB and TC treated animals displayed increased excitatory contractility of neurogenic origin as compared to control animals UB. Cholinergic component dominated in activation of HAB strips contractility and it was suppressed in TC treated animals strips, probably due to decreasing sensibility of smooth muscles to acetylcholine. In addition purinergic component and prostanoids contribution in TC treated animals strips contractility activation was increased. The efficacy of trospium chloride in combination with other medicines under HAB requires further study.

Key words: hyperactive bladder, pharmacotherapy, trospium chloride, contractile activity of detrusor

Надійшла: 6 липня 2017 р.

Контактна особа: Яцина Олександр Іванович, кандидат медичних наук, лабораторія нейроурології, ДУ «Інститут урології НАМН України», буд. 9 А, вул. Ю. Коцюбинського, м. Київ, 04053. Тел.: + 38 0 67 698 55 11. Електронна пошта: yatsyna@gmail.com

С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, О. Ю. Кошова, І. О. Лебединець

Результати дослідження специфічної токсичності таблеток «Долосан Форте®»

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: специфічна токсичність, зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід, комбінований лікарський препарат

Проблема фармакокорекції больового синдрому дотепер залишається однією з найактуальніших, зважаючи на значну поширеність, суттєве зниження якості життя та працездатності. Ефективність впливу на хронічний біль не завжди є достатньою [1, 2], а традиційно вживані аналгетики, наприклад, метамізол натрію, спричиняють гематотоксичний вплив та інші побічні ефекти, їхнє застосування обмежують [3]. Отже, є актуальним створення нових високоактивних знеболювальних препаратів, які мають високий рівень безпечності. У цьому аспекті привертає увагу зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), який характеризується вираженою аналгетичною та протизапальною активністю та перевершує за терапевтичним індексом метамізол натрію та диклофенак натрію [4]. Оскільки поряд із запаленням частою причиною болю є спазм, доцільно поєднати зирилон зі спазмолітиками, а саме пітофенону гідрохлоридом (міотропний спазмолітик), фенпіверинію бромідом (М-холінолітик з додатковими міотропними та аналгетичними властивостями). Така комбінація – таблетки «Долосан Форте®» – створена на ПАТ «Червона Зірка», за виразністю фармакологічних ефектів вона не поступається препарату порівняння «Спазмалгон®» і демонструє переваги над останнім за величиною ефективних доз і відсутністю пригнічувального впливу на перистальтику кишечника за умов норми [5]. Відомо, що спазмолітична дія пітофенону активно виявляється за його комбінованого застосування з аналгетика-

ми *in vitro* [6], а синергізм аналгетичної дії пітофенону та фенпіверинію за поєднання з диклофенаком натрію підтверджено клінічно [7]. Водночас підтвердження безпечності є невід'ємною частиною доклінічних досліджень комбінованих препаратів.

Мета дослідження – встановити специфічну токсичність таблеток «Долосан Форте®», а саме: наявність мутагенної, гонадотоксичної, імунотоксичної, сенсibilізувальної, місцевоподразнювальної дії, впливу на секреторну функцію шлунка та ульцерогенних властивостей.

Матеріали та методи. Досліди проведено з дотриманням вимог Європейської конвенції з питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, за схвалення комісії НФаУ з біоетики. Догляд за тваринами та маніпуляції проводили відповідно до стандартних операційних процедур ЦНДЛ НФаУ.

Мутагенну дію таблеток «Долосан Форте®» досліджували на мишах [8] за методом реєстрації хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку [9]. Мишей-самців масою тіла (24 ± 2) г рандомізували на 5 груп по 6 тварин: інтактний контроль (ІК), негативний контроль (НК, отримували носій – дистильовану воду), тварини, яким внутрішньошлунково (в/ш) протягом 5 днів (оскільки передбачається застосування *per os* короткими курсами) вводили досліджуваний препарат (ДП) у дозах 5, 50 та 500 мг/кг за діючою речовиною зирилоном (виходячи з умовно-терапевтичної дози для мишей 5 мг/кг та значного терапевтичного індексу речовини). Тварин виводили з досліду через 24 год після останнього введення препарату (за 2 год до цього доочередивно (д/о) вводили розчин колхіцину в дозі 2,5 мг/кг), розчином Хенкса за темпе-

ратури 37 °С вимивали кістковий мозок з обох стегнових кісток, за стандартними методами проводили обробку клітин та їхню фіксацію, фарбували азур-еозинном. Аналіз виконували під імерсійним об'єктивом мікроскопа за збільшення 10 × 90, аналізували 100 метафаз на тварину за загальноприйнятими критеріями [9].

Вплив ДП на репродуктивну функцію визначали в обмеженому обсязі, оскільки не передбачається його тривале застосування в клінічній практиці. Гонадотоксичну дію вивчали на щурах обох статей, розподілених на 4 групи по 8 самок та 10 самців: ІК, НК та тварини, яким в/ш вводили ДП у вигляді водної суспензії в умовнотерапевтичній для щурів дозі 2,3 мг/кг за діючою речовиною зирилоном та десятиразово збільшеній дозі 23,0 мг/кг протягом 15 днів самкам (3–4 естральних цикли), 60 днів – самцям (період сперматогенезу 48 діб плюс період дозрівання сперматозоїдів у епідидимусі 10–14 діб). Після цього вивчали тривалість естрального циклу та виводили самок з експерименту в фазі еструс або прострус. Ячники досліджували макроскопічно та гістологічно (5 зразків ячників від різних тварин з кожної групи), визначали їхні масові коефіцієнти (МК). На серійних зрізах (фарбування – гематоксилін та еозин) проводили кількісну оцінку структурно-функціональних елементів [10]. Після завершення введення ДП самців виводили з експерименту, визначали МК сім'яників, їхній об'єм, МК придатків сім'яників, передміхурової та пухирцевої залоз, макроскопічно та гістологічно досліджували сім'яники. У гістопрепаратах (фарбування – гематоксилін та еозин) розраховували індекс сперматогенезу, відносну кількість каналців зі злущеним епітелієм, відносну кількість каналців у метафазі 2 поділу дозрівання, кількість нормальних сперматогоній у звивистих каналцях. Суспензію вмісту додатка сім'яників у 0,9 % розчині натрію хлориду використовували для визначення функціонального стану сперматозоїдів за концентрацією клітин, відотною кількістю нерухомих та патологічних форм, осмотично

та кислотної резистентністю, тривалістю руху [8].

Вплив ДП на гуморальний та клітинний імунітет досліджено на мишах-самцях масою 18–22 г. Стан гуморальної імунної відповіді визначали за кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці, титрів гемаглютининів (ГА) у сироватці крові імунізованих тварин (одноразове д/о уведення 3 % суспензії еритроцитів барана (ЕБ) у дозі 0,2 мл/20 г). Мишей рандомізували на 3 групи по 10 тварин: імунізований контроль; тварини, яким за 1 год до імунізації та надалі вводили ДП в умовнотерапевтичній та десятиразово збільшеній дозі 5 та 50 мг/кг відповідно. На 5 добу визначали кількість АУК методом локального гемолізу в гелі [11, 12], титри ГА методом серійних розведень [12, 13]. Вплив ДП на клітинну імунну відповідь вивчали в тесті реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) за методом К. Р. Kitamura [14]. Мишей рандомізували на 4 групи по 8 тварин: ІК; імунізований контроль; тварини, яким за 1 год до імунізації та надалі протягом усього її терміну (6 діб) в/ш вводили ДП у дозах 5 та 50 мг/кг. Тварин імунізували одноразовим підшкірним уведенням до міжлопаткової області суспензії свіжовідмитих ЕБ у дозі $2 \cdot 10^5$ клітин у 0,5 мл 0,9 % розчину натрію хлориду на 20 г. На 5 добу під апоневроз задньої кінцівки вводили завершальну дозу антигена (10^8 ЕБ у 0,02 мл), у контрлатеральну кінцівку – аналогічний об'єм 0,9 % розчину натрію хлориду. Через 24 год тварин виводили з дослідження, оцінювали місцеву запальну реакцію за різницею маси кінцівок з розрахунком індексу реакції (ІР).

Здатність ДП викликати сенсibilізацію оцінювали на моделі активної шкірної анафілаксії (АША), моделі «Реакція непрямої дегрануляції мастоцитів» (РНДМ) та в тесті «Кон'юнктивальна проба» (КП). АША відтворювали на мурчаках, рандомізованих на 3 групи по 10 тварин: інтактний контроль та тварини, яким в/ш вводили ДП в умовно терапевтичній дозі 2,1 мг/кг та десятиразово збільшеній дозі 21,0 мг/кг [12]. На 21 добу від початку сенсibilізації

внутрішньошкірно вводили завершальну дозу алергену (ДП, по 40 мкл/тварину в концентрації, що не викликає місцевого подразнення), у контрлатеральну ділянку для контролю розчинника аналогічним чином вводили 0,9 % розчин натрію хлориду, надалі внутрішньовенно – 0,5 мл 1 % розчину синього Еванса. Через 30 хв тварин виводили з досліду, відсепаровували шкіру та визначали діаметр і площу забарвлених плям у місцях ін'єкцій [13].

Спроможність ДП викликати алергічні реакції негайного типу визначали на моделі РНДМ [12]. Щурів-самців масою 250–300 г рандомізували на 3 групи по 10 тварин: ІК та тварини, яких сенсibilізували ДП, який вводили в/ш у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг протягом 2 тижнів. На 21 добу тварин виводили з досліду, одержували сироватку крові. У попередніх експериментах обрано концентрацію ДП, що викликає не більше ніж 10 % неспецифічної дегрануляції. Препарати на предметних скельцях фарбували 0,3 % спиртовим розчином нейтрального червоного. До 0,03 мл мастоцитів, отриманих з перитонеальної рідини інтактних тварин, додавали 0,03 мл сироватки, одержаної від сенсibilізованої або інтактною тварини, і 0,03 мл розчину ДП у 0,9 % розчині натрію хлориду. Враховували контрольні дані, одержані в разі використання сироватки без ДП (контроль сироватки), та контроль спонтанної дегрануляції мастоцитів (без внесення сироватки). Препарати інкубували 15 хв за температури 37 °С. Підраховували відносну кількість дегранульованих мастоцитів (світлова мікроскопія). Реакцію вважали позитивною, якщо кількість дегранульованих клітин перевищувала 10 %. Сенсibilізувальну дію оцінювали за наступною шкалою: слабка – 10–20 % дегранульованих клітин; позитивна – 20–30%; різко позитивна – 30% і більше.

Можливість ініціації ДП алергічної реакції повільного типу досліджували в тесті «Кон'юнктивальна проба» [12] на кролях масою 3,0–3,5 кг. Сенсibilізацію проводили введенням ДП у дозах 1 та 10 мг/кг в/ш протягом 2 тижнів.

На 21 добу після початку сенсibilізації під верхнє повіко закапували 1 краплю водної суспензії ДП, у контрлатеральне око – 1 краплю води (контроль). Через 15 хв та 24 год за шкалою оцінювали офтальморекцію: 0 – відсутність реакції; 1 – слабке почервоніння слізної протоки; 2 – почервоніння слізної протоки та склери в напрямку до рогівки; 3 – почервоніння всієї кон'юнктиви та склери.

Вивчення секреторної активності шлунка проводили за методом [15] на щурах-самках масою 250–300 г. Після 48-год голодування за вільного доступу до питної води тваринам в/ш вводили ДП у дозі 2,3 мг/кг або референс-препарат – таблетки «Спазмалгон®» у дозі 23,0 мг/кг, контрольним тваринам – еквівалентну кількість дистильованої води. Через 1 год тварин наркотизували, після лапаротомії накладали лігатуру на пілоричний сфінктер шлунка. Через 4 год накладали лігатуру на кардіальний сфінктер, вилучали шлунок і вимірювали об'єм шлункового соку. Визначали його загальну кислотність титруванням 0,1 N розчином натрію гідроксиду в присутності фенолфталеїну й бромтимолового синього. Загальну та вільну кислотність виражали як об'єм 0,1 N розчину натрію гідроксиду, необхідний для нейтралізації 100 мл шлункового соку. Зв'язану кислотність визначали за різницею між загальною та вільною кислотністю. Оскільки збір шлункового соку та тривале знаходження його надмірної кількості в шлунку є стресуючими чинниками, які створюють умови для ураження слизової оболонки, визначали ульцерогенну дію ДП згідно з [16]. Стан слизової оболонки оцінювали в балах: 0 – відсутність ушкоджень, 0,5 – набряк, гіперемія, краплинні крововиливи; 1 – 2–3 невеликих виразки; 2 – понад 3 невеликих виразок; 3 – виразка значних розмірів, 4 – декілька великих виразок, 5 – перфорація виразки.

Результати проаналізовано за допомогою програми Statistica-6. Використано непараметричні методи Крускала-Уолліса та критерій Манна-Уїтні, критерій χ^2 , у деяких випадках – параметричні методи (однофакторний диспер-

сійний аналіз ANOVA, критерій Ньюмена-Кейлса).

Результати та їх обговорення. *Результати вивчення мутагенного потенціалу таблеток «Долосан Форте®».* Аналіз хромосомних аберацій клітин кісткового мозку мишей (загалом вивчено 3000 метафазних пластин) показав, що сумарна кількість метафаз з абераціями в групах ІК та НК не перевищувала спонтанної частоти хромосомних пошкоджень – 1,0–2,5 % [17]. Аберації переважно були представлені поодинокими та парними фрагментами. Аналогічні результати без достовірних відмінностей показників відносно груп ІК та НК отримано на тлі «Долосану Форте®» у терапевтичній дозі 5 мг/кг. У препаратах мишей, яким вводили ДП у дозах 50 та 500 мг/кг, значно збільшувалась кількість парних фрагментів метафазних пластинок, однак ці зміни не зростали з підвищенням дози. Також підвищувалась кількість поодиноких фрагментів, переважно в групі тварин, яким вводили ДП у дозі 50 мг/кг, однак відмінності не сягали рівня статистичної значущості. Кількість аберацій, представлених обмінами, не відрізнялася в різних групах, але метафазні пластинки з хромосомними обмінами зустрічались частіше в мишей, які одержували ДП у дозах 50 та 500 мг/кг. Клітини з поліплоїдним набором хромосом зустрічались рідко і не були асоційовані з введенням препарату. Клітини з множинними абераціями та хроматидними обмінами – відсутні в усіх групах. Загальна кількість метафаз з абераціями в групах тварин, яким вводили ДП у дозах 50 та 500 мг/кг, відрізнялась від даних груп ІК та НК і дещо перевищувала спонтанну частоту клітин з хромосомними пошкодженнями (1,0–2,5%), становлячи 3,5 % на тлі дози 50 мг/кг та 2,5 % – на тлі дози 500 мг/кг. Отже, таблетки «Долосан Форте®» у терапевтичній дозі 5 мг/кг не чинять мутагенної дії в мишей. За 10- та 100-разового збільшення дози зростає кількість аберантних метафазних пластинок, однак цей показник лише на 1 % перевищує спонтанну частоту хромосомних пошкоджень. Клітини з множинними абераціями, які є

характерною ознакою впливу активних мутагенів, на тлі ДП відсутні.

За даними літератури [18] відомо, що 2,4-дихлорбензойна кислота (калієвою сіллю якої є зирилон) не виявляє мутагенної дії в тесті Беймса на *Salmonella typhimurium* різних штампів, а також *E. coli*, з використанням метаболічної активації та без неї. Важливо, що в разі поєднаного застосування зирилону, пітофенону гідрохлориду, фенпіверинію броміду не спостерігається зростання мутагенного потенціалу.

Результати дослідження гонадотоксичної дії таблеток «Долосан Форте®». Дослідження впливу таблеток «Долосан Форте®» на репродуктивну функцію проводили в обмеженому обсязі, оскільки тривале застосування препарату в клінічній практиці не передбачається, а також виходячи з того, що, згідно з методичними рекомендаціями, поглиблені дослідження цих аспектів не є доцільними для препаратів, які за механізмом дії чинять заздалегідь відомі негативні наслідки для плода. Водночас НПЗЗ притаманна ембріотоксична дія [19], широко обговорюються асоційовані з пригніченням ЦОГ-2 порушення запліднення та імплантації, а також овуляції [20], тератогенна дія, асоційована з пригніченням ЦОГ-1 [21], фетотоксична дія (у тому числі передчасне закриття артеріальної протоки [22]), збільшення ризику невиношування внаслідок прийому НПЗЗ у ранні терміни вагітності [23] та ослаблення пологової діяльності – у пізні строки [24]. Тому вивчення впливу ДП на репродуктивну функцію було обмежено оцінкою стану репродуктивної системи самців та самок щурів після курсового застосування ДП. Встановлено, що таблетки «Долосан Форте®» у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг у разі введення протягом 3–4 естральних циклів не впливали на тривалість естрального циклу та якісний клітинний склад вагінального епітелію, в усіх самок спостерігали послідовну зміну чотирьох фаз циклу, тривалість якого в більшості тварин становила 4–5 днів. Макроскопічно не виявлено змін органів малого таза, а також МК яєчників, мікроскопічно не зареєстровано помітних змін у їхній гістоструктурі

(кистозоподібних фолікулів, крововиливів, збільшення стромальної складової). За кількісного аналізу структурно-функціональних елементів встановлено відсутність статистично значущих відмінностей кількості примордіальних фолікулів (резерву фолікулогенезу), зростаючих фолікулів та атрезії фолікулів у самок, які одержували «Долосан Форте®» в обох дозах порівняно з даними груп ІК та НК (табл. 1). Кількість жовтих тіл достовірно збільшувалась у самок обох груп. Однак ці зміни відбувалися на тлі збільшення кількості примордіальних фолікулів (хоча й статистично недостовірного) та тенденційного зменшення атретичних фолікулів, тобто, імовірно, що більша кількість фолікулів досягала стадії овуляції з наступним утворенням жовтих тіл. Крім того, морфометрична оцінка серединних зрізів яєчників передбачає підрахунок як щойно утворених, так і раніше сформованих жовтих тіл, – фолікулів декількох останніх естральних циклів. Отже, можна вважати, що «Долосан Форте®» у

досліджених дозах не створював умов пригнічення дозрівання фолікулів. Ці дані збігаються з результатами токсикологічних досліджень класичного НПЗЗ індометацину [25], який не спричиняв грубих зсувів репродуктивної функції в щурів. Однак у цитованій роботі спостерігали виникнення лютеїнізованих кист, що асоціюють з відомим ефектом НПЗЗ – пригніченням апікального вивільнення фолікулів [20], у цьому разі також вказують на складність інтерпретації даних (диференціації лютеїнізованих кист та кистоподібних жовтих тіл, утворених за фізіологічної овуляції). Отже, отримані результати узгоджуються з наявними даними щодо репродуктивної токсичності НПЗЗ та непрямо підтверджують відсутність її різкого зростання за поєднання зирилону зі спазмолітиками.

Досліди на самцях щурів показали відсутність впливу ДП в обох дозах на МК та об'єм сім'яників, МК сім'яних пухирців, додатків сім'яників та передміхурової залози, а також на

Таблиця 1

Склад структурно-функціональних елементів яєчників самок щурів, яким вводили таблетки «Долосан Форте®», (n = 5), Me (LQ;UQ)

Показник	Експериментальна група				p
	Інтактний контроль	Негативний контроль	Таблетки «Долосан Форте®»		
			2,3 мг/кг	23,0 мг/кг	
Примордіальні фолікули	620 (580; 640)	690 (690; 720)	750 (690; 760)	720 (680; 760)	p = 0,4893
Фолікули з 2 та більше шарами гранульозних клітин	75 (70; 75)	70 (60; 75)	70 (60; 70)	70 (60; 75)	p = 0,7040
Порожнинні фолікули	5 (5; 5)	5 (0; 10)	5 (0; 5)	0 (0; 5)	p = 0,5048
Атретичні фолікули	1115 (1055; 1215)	925 (860; 1190)	1025 (985; 1060)	850 (800; 950)	p = 0,2090
Жовті тіла	14 (8; 15)	12 (10; 12)	18 (15; 18) p1 = 0,0954 p2 = 0,0952	18 (16; 21) p1 = 0,0317 p2 = 0,0159	p = 0,0322
Сумарна кількість фолікулів	1845 (1740; 1929)	1687 (1637; 1985)	1831 (1813; 1878)	1636 (1570; 1666)	p = 0,4059

Примітка. p – рівень статистичної значущості в разі порівняння вибірок за допомогою критерію Крускала-Уолліса, p1 та p2 – статистично значущі відмінності відносно групи інтактного (1) та негативного (2) контролю відповідно (за критерієм Манна-Уїтні), n – кількість тварин у групі.

показники спермограми. Гістоструктура сім'яників у тварин усіх груп відповідала нормі, відмічено нормальну структуру, кількість та розташування клітин Сертолі та Лейдига. У сім'яних каналцях самців груп ІК та НК, самців, які отримували «Долосан Форте®» у дозі 2,3 мг/кг і в більшості самців, які отримували препарат у дозі 23,0 мг/кг, спостерігали 3–4 генерації сперматогенних клітин на різних стадіях розвитку. Морфометричні показники сперматогенезу щурів, що одержували ДП у меншій дозі, були на рівні показників групи ІК, а в щурів, яким «Долосан Форте®» вводили в дозі 23,0 мг/кг, у 37,5 % випадків на тлі масиву неушкоджених сім'яних каналців виявлені нечисленні каналці з редукцією рядів статевих клітин або повним спустошенням сперматогенного епітелію, внаслідок чого тенденційно зменшувався індекс сперматогенезу. Отже, «Долосан Форте®» в умовнотерапевтичній дозі не чинить гонадотоксичної дії в самців щурів, але вона можлива за збільшення дози. Комбінація зирлону зі спазмолітиками не спричиняє різкого зростання репродуктивної токсичності в самців.

Результати вивчення імунотоксичної дії «Долосану Форте®». Як видно з даних таблиці 2, ДП у дозі 5 мг/кг (але не 50 мг/кг) помірно активує гуморальні реакції на тимусзалежний антиген, достовірно збільшуючи титр ГА у сироватці крові імунізованих тварин порів-

няно з імунізованим контролем. Кількість АУК під впливом ДП в обох дозах не змінювалася.

Водночас ДП в обох дозах (5 та 50 мг/кг) не впливав на розвиток реакції ГПТ: у всіх групах імунізованих мишей введення завершальної дози антигена (ЕБ) призводило до локального набряку, без достовірних міжгрупових відмінностей його виразності. Оскільки інфільтрація тканин клітинними елементами та локальний набряк у тесті ГПТ опосередковані звільненням медіаторів з лімфоцитів-ефекторів, можна стверджувати, що «Долосан Форте®» у досліджених дозах не сенсibiliзує ці клітини.

Результати дослідження алергізувальних властивостей «Долосану Форте®». Інтегральним показником у тесті АША є площа забарвленої плями, яка визначається реакцією каплярів на місці введення антигена (ДП) [12]. Виходячи з відсутності збільшення площі плями відносно показника ІК, ДП не спричиняв реакцію активної шкірної анафілаксії в мурчаків, сенсibiliзованих дозами 2,1 і 21,0 мг/кг.

Внутрішньошлункове введення «Долосану Форте®» не призводило до посилення дегрануляції мастоцитів, що свідчить про відсутність утворення гомоцитотропних антитіл (IgE) під впливом препарату.

У тесті «Кон'юнктивальна проба» ДП також не чинив сенсibiliзувальної

Таблиця 2

Кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці та титрів гемаглютининів у сироватці крові імунізованих мишей за впливу таблеток «Долосан Форте®»

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість антитілоутворюючих клітин на селезінку		Титри гемаглютининів, Log ₂	
		n	M ± m	n	Me (LQ; UQ)
Імунізований контроль (Еритроцити барана)	–	9	12260 ± 1599	10	12 (9; 13)
Еритроцити барана + таблетки «Долосан Форте®»	5	10	13030 ± 1815 p1 = 0,7984	10	13 (13; 15) p1 = 0,0379 [#]
Еритроцити барана + таблетки «Долосан Форте®»	50	9	10460 ± 1950 p1 = 0,3823	10	10 (7; 12) p1 = 0,4418 [#]
P		24	0,5298	10	0,0208 [#]

Примітка. p – рівень статистичної значущості в разі порівняння вибірок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA або критерію Крускала-Уолліса ([#]), p1 – рівень статистичної значущості за порівняння з групою імунізованого контролю, критерій Ньюмена-Кейлса або Манна-Уїтні ([#]); n – кількість тварин у кожній групі.

дії, оскільки в усіх кролів спостерігали відсутність ознак алергічної запальної реакції слизової оболонки ока.

Результати дослідження впливу «Долосану Форте®» на секреторну активність шлунка. Виходячи з фармакологічних властивостей інгібіторів ЦОГ-1, загальновідомих своєю гастро-токсичністю [19], принципово важливо оцінити вираженість цієї побічної дії. Виявилось, що в умовнотерапевтичній дозі «Долосан Форте®» не посилює ураження слизової оболонки шлунка: гіперемію, геморагії та набряк спостерігали як у групі НК, так і в групах тварин, які одержували ДП та референс-препарат «Спазмалгон®», достовірних міжгрупових відмінностей інтенсивності ураження не виявлено, як і змін секреторної функції шлунка – за показниками об'єму шлункового соку та його кислотності. Ці дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень хронічної токсичності ДП [26], згідно з якими не виявлено змін гістоструктури ШКТ, ознак подразнювальної дії на слизову оболонку стравоходу та шлунка.

Крім того, результати досліджень хронічної токсичності «Долосану Форте®» [26] вказують на відсутність у препарату вираженої здатності до кумуляції. Оскільки визначення коефіцієнта кумуляції утруднено для малотоксичних речовин, здатність до кумуляції оцінювали за впливом препарату за 30-денного введення на фізіологічні, біохімічні, гістологічні показники. Суттєві зсуви останніх відсутні.

Отже, доклінічні дослідження таблеток «Долосан Форте®» підтверджують їхню безпечність в умовнотерапевтичних дозах. При цьому ефективні дози «Долосан Форте®» у 10 разів нижчі, ніж у референс-препарату «Спазмалгон®» [5], що підтверджує перспективність цього лікарського препарату з вираженими анальгетичними, спазмолітичними

та протизапальними властивостями.

Висновки

1. Аналіз хромосомних аберацій клітин кісткового мозку мишей показав, що оригінальний спазмоаналгетик «Долосан Форте®» не чинить мутагенної дії в умовнотерапевтичній дозі 5 мг/кг (5-разове введення). На тлі 10- та 100-разового підвищення дози зростає кількість поодиноких та парних фрагментів (частота хромосомних пошкоджень лише на 1 % перевищує рівень їхньої допустимої спонтанної частоти (1,0–2,5 %), повністю відсутні клітини з множинними абераціями).
2. За 60-денного введення щурам «Долосан Форте®» (2,3 та 23,0 мг/кг) не чинить токсичний вплив на гонади самців, у самок після 15-денного введення в цих дозах дещо збільшується кількість жовтих тіл за збереження інших показників функції яєчників, а також тривалості естрального циклу, складу вагінального епітелію.
3. «Долосан Форте®» у дозах 5 і 50 мг/кг не впливає на перебіг реакції гіперчутливості сповільненого типу, не змінює кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці імунізованих мишей. У дозі 5 мг/кг (але не 50 мг/кг) він помірно збільшує титр гемоглобінів у сироватці крові імунізованих мишей.
4. «Долосан Форте®» не провокує алергічні реакції негайного та повільного типу в тесті «Активна шкірна анафілаксія» у мурчаків (у дозах 2,1 і 21,0 мг/кг), «Кон'юнктивальна проба» у кролів (у дозах 1 і 10 мг/кг), не посилює дегрануляцію мастоцитів у щурів (у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг).
5. За одноразового введення щурам в умовнотерапевтичній дозі 2,3 мг/кг «Долосан Форте®» не чинить суттєво-

го впливу на стан слизової оболонки та секреторну функцію шлунка.

1. Turk D. C. Treatment of chronic non-cancer pain / D. C. Turk, H. D. Wilson, A. Cahana // Lancet. – 2011. – V. 377. – P. 2226.
2. Hand-book of pain assessment; Eds D. Turk, R. Melzack. – 3-rd edn. – New York : Guilford Press. – P. 542.
3. Hedenmalm K. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole) / K. Hedenmalm, O. Spigset // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2002. – V. 58, № 4. – P. 265–274.

4. Яковлева Л. В. Порівняльна характеристика фармакологічної дії в ряді похідних бензойної кислоти / Л. В. Яковлева, О. М. Шаповал, Є. Я. Левітін // Вісник фармації. – 2001. – № 3 (27). – С. 172–173.
5. Експериментальне вивчення анальгетичної, протизапальної та спазмолітичної активності таблеток «Долосан Форте» / С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, Є. О. Ковальова, Ю. Ю. Штриголь // Фармаком. – 2016. – № 2. – С. 50–54.
6. Modulatory effect of diclofenac on antispasmodic effect of pitofenone in cholinergic spasm / S. K.ulkarni, C. S. Patil, N. K. Jain, A. Singh // Indian J. Exp. Biol. – 2004. – V. 42, № 6. – P. 567–569.
7. Golhar K. B. Open labelled evaluation of injection Manyana (a combination of diclofenac + pitofenone + fempiverinium) in ureteric, biliary and intestinal spasm – a preliminary report / K. B. Golhar, R. L. Gupta // J. Indian Med. Assoc. – 1999. – V. 97, № 9. – P. 398–400.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под общ. ред. чл.-кор. РАМН, проф. Р. У. Хабриева – Москва : ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. – 832 с.
10. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин (метод. рекомендації). – Київ, 2000. – 24 с.
11. lerne K. N. Plaque formation by single antibody-producing cells / K. N. lerne, A. A. Nordin // Science. – 1963. – V. 140. – P. 405–406.
12. Доклінічне вивчення сенсibiliзуючої дії лікарських засобів (методичні рекомендації). – Київ, 2002. – 27 с.
13. Иммунологические методы; под ред. Х. Фримеля. – Москва : Мед., 1987. – 472 с.
14. Kitamura K. A. Foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse / K. A. Kitamura // J. Immunol. Methods. – 1980. – V. 39. – P. 277–283.
15. Андреева Н. И. Некоторые показатели влияния пиразидола на желудочно-кишечный тракт / Н. И. Андреева, С. А. Шарова // Фармакол. и токсикол. – 1978. – № 4. – С. 428–432.
16. Marrazi-Uberti E. The experimental gastric ulcer from histamine in guinea pigs. Rept. II. Methodology for biologically controlling the antiulcer activity of drugs / E. Marrazi-Uberti, C. Turda // Med. Expt. – 1961. – V. 7, № 1. – P. 9–14.
17. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств. Метод. рекомендации. – Москва, 1998. – 30 с.
18. Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the industrial safety and health law / Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology And Information Center. – 2008. – Suppl. 4. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?/.temp/~YQQUy:4>
19. Побочное действие лекарств / С. М. Дрогвовоз, А. П. Гудзенко, Я. А. Бутко [и др.] – Харьков : СИМ, 2010. – 480 с.
20. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ovulation: lessons from morphology / M. Gaytán, C. Morales, C. Bellido [et al.] // Histol. Histopathol. – 2006. – V. 21, № 5. – P. 541–556.
21. Teratogenic mechanisms of medical drugs / M. M. van Gelder, I. A. van Rooij, R. K. Miller [et al.] // Hum. Reprod. Upd. – 2010. – V. 16, № 4. – P. 378–394.
22. Prediction of fetal ductus arteriosus constriction by systemic and local dermatological formulations of NSAIDs based on PK/PD analysis / S. Tanaka, S. Hori, H. Satoh, Y. Sawada // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 2016. – V. 54, № 10. – P. 782–794.
23. Use of nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the risk of spontaneous abortion / H. R. Nakhai-Pour, P. Broy, O. Sheehy, A. Bérard // CMAJ – 2011. – V. 183, № 15. – P. 1713–1720.
24. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn / R. Antonucci, M. Zaffanello, E. Puxeddu [et al.] // Curr. Drug Metab. – 2012. – V. 13, № 4. – P. 474–490.
25. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 12. Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of indomethacin in female rats / K. Tsubota, K. Kushima, K. Yamauchi [et al.] // J. Toxicol. Sci. – 2009. – V. 34, Suppl. 1. – P. SP129–SP136.
26. Трутаєв С. І. Результати визначення хронічної токсичності таблеток «Долосан форте®» / С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, Ю. Б. Лар'яновська // Фармацевтичний часопис. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, О. Ю. Кошова, І. О. Лебединець

Результати дослідження специфічної токсичності таблеток «Долосан форте®»

Досліджено специфічну токсичність таблеток «Долосан Форте®», розроблених ПАТ «Червона Зірка», які містять зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієву сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід.

Встановлено, що цей препарат в умовно-терапевтичній дозі для мишей 5 мг/кг не збільшує частоту хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку, за 10- та 100-разового підвищення дози помірно зростає загальна кількість метафаз із абераціями (за рахунок збільшення кількості поодиноких та парних фрагментів за повної відсутності клітин з множинними абераціями). «Долосан Форте®» (в умовно-

терапевтичній дозі для щурів 2,3 мг/кг та в дозі 23,0 мг/кг) не чинить токсичний вплив на гонади самців, у самок дещо збільшується кількість жовтих тіл за збереження інших показників функції яєчників, тривалості естрального циклу, складу вагінального епітелію. В імунізованих мишей препарат (5 і 50 мг/кг) не впливає на перебіг реакції гіперчутливості сповільненого типу, не змінює кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці, але помірно підвищує титр гемаглютининів у сироватці крові (у дозі 5 мг/кг, але не 50 мг/кг). «Долосан Форте®» не провокує алергічні реакції негайного та повільного типу в тестах «Активна шкірна анафілаксія» (в умовнотерапевтичній дозі для мурчаків 2,1 мг/кг та дозі 21,0 мг/кг) і «Кон'юнктивальна проба» (в умовнотерапевтичній дозі для кролів 1 мг/кг та дозі 10 мг/кг), не посилює дегрануляцію мастоцитів у щурів (у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг). «Долосан Форте®» (2,3 мг/кг одноразово) не впливає на стан слизової оболонки шлунка щурів та його секреторну функцію.

Ключові слова: специфічна токсичність, зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід, комбінований лікарський препарат

С. И. Трутаев, С. Ю. Штрыголь, Е. Ю. Кошечая, И. А. Лебединец

Результаты исследования специфической токсичности таблеток «Долосан форте®»

Изучена специфическая токсичность таблеток «Долосан Форте®», разработанных ПАО «Красная Звезда», содержащих зирилон (2,4-дихлорбензойной кислоты калиевая соль), питофенона гидрохлорид, фенпивериния бромид.

Установлено, что этот препарат в условнотерапевтической дозе для мышей 5 мг/кг не увеличивает частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга, при 10- и 100-кратном повышении дозы умеренно возрастает общее количество метафаз с aberrациями (за счет увеличения числа одиночных и парных фрагментов при полном отсутствии клеток с множественными aberrациями). «Долосан Форте®» (в условнотерапевтической дозе для крыс 2,3 мг/кг и в дозе 23,0 мг/кг) не оказывает токсическое влияние на гонады самцов, у самок несколько возрастает количество желтых тел при сохранении других показателей функции яичников, длительности эстрального цикла, состава вагинального эпителия. У иммунизированных мышей препарат (5 и 50 мг/кг) не влияет на течение реакции гиперчувствительности замедленного типа, не изменяет количество антителообразующих клеток в селезенке, но умеренно повышает титр гемаглютининов в сыворотке крови (в дозе 5 мг/кг, но не 50 мг/кг). «Долосан Форте®» не провоцирует аллергические реакции немедленного и замедленного типа в тестах «Активная кожная анафилаксия» (в условнотерапевтической дозе для морских свинок 2,1 мг/кг и дозе 21,0 мг/кг) и «Конъюнктивальная проба» (в условно-терапевтической дозе для кролей 1 мг/кг и дозе 10 мг/кг), не усиливает дегрануляцию мастоцитов у крыс (в дозах 2,3 и 23,0 мг/кг). «Долосан Форте®» (2,3 мг/кг однократно) не изменяет состояние слизистой оболочки желудка крыс и его секреторную функцию.

Ключевые слова: специфическая токсичность, зирилон (2,4-дихлорбензойной кислоты калиевая соль), питофенона гидрохлорид, фенпивериния бромид, комбинированный лекарственный препарат

S. I. Trutaev, S. Yu. Shtrygol', E. Y. Koshevaya, I. A. Lebedinets

The results of the specific toxicity studies of «Dolosan Forte®» tablets

This study addressed the specific toxicity of the tablets «Dolosan Forte®» containing zirilon (2,4-dichlorobenzoic acid potassium salt), pitofenone hydrochloride, and fempiverinium bromide, worked out by PJSC «Red Star».

It has been shown that this drug at a conventional therapeutic dose for mice 5 mg/kg does not increase the frequency of the spontaneous chromosome aberrations in bone marrow cells, when the dose is increased tenfold and hundredfold, the total number of metaphases with aberrations is moderately elevated (due to the increase in the quantity of single and paired fragments, while the cells with multitude aberrations are completely absent). «Dolosan Forte®» (at a conventional therapeutic dose for rats 2,3 mg/kg and at a dose of 23,0 mg/kg) does not exert gonadotoxic action in males, in females there is a slight elevation of the corpora lutea number, while the other markers of the ovarian function are unchanged, as well as estrous cycle length and vaginal epithelium structure. The drug (5 and 50 mg/kg) does not influence on the course of the reactions of the immediate and delayed hypersensitivity, does not change the quantity of antibody-producing cells in the spleen, still moderately increases titre of hemagglutinins in blood serum (at a dose of 5 mg/kg, but not 50 mg/kg). «Dolosan Forte®» does not provoke the immediate- and delayed-type allergic reactions in the tests «Active skin anaphylaxis» (at a conventional therapeutic dose for guinea pigs 2,1 mg/kg and at a dose of 21,0 mg/kg) and «Conjunctive test» (at a conventional therapeutic dose for rabbits 1 mg/kg and at a dose of 10 mg/kg), it does not enhance mast cells degranulation in rats (at doses of 2,3 and 23,0 mg/kg). «Dolosan Forte®» (2,3 mg/kg at a single administration) does not influence on the state of the gastric mucosa and the secretion function of the stomach.

Key words: specific toxicity, zirilon (2,4-dichlorobenzoic acid potassium salt), pitofenone hydrochloride, fempiverinium bromide, combined drugs

Надійшла: 5 вересня 2017 р.

Контактна особа: Штрыголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: shtrygol@mail.ru