
СПІВЗАСНОВНИКИ

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

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 2(58)/2018

ISSN 2524-2563 (Online)

ISSN 2227-7943 (Print)

ЗМІСТ

Бухтіарова Т. А., Григор'єва Г. С., Мисливець С. О. До 25-річчя Національної академії медичних наук України. Сьогодення ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».....3

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Демченко С. А., Шарикіна Н. І., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Демченко А. М. Синтез і протипухлинна активність гідробромідів 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанонів.....7

Добреля Н. В., Гула Н. С., Карацуба Т. А., Хромов О. С. Перспективи використання ліпосомальної форми цитохрому С для поповнення гострої масивної крововтрати..... 14

Іванова І. В., Мельник М. І., Соловйов А. І. Розвиток експериментального цукрового діабету пригнічує загальну калієву провідність у гладеньком'язових клітинах аорти, але збільшує її в клітинах легеневої артерії щурів 25

Коваленко В. М., Ткаченко О. Є., Шаяхметова Г. М., Матвієнко А. В. Вплив метформіну на морфофункціональні характеристики сім'яників щурів за метаболічного синдрому, що розвинувся в ювенільному віці.....32

Кудіна О. В., Штриголь С. Ю., Колобов О. О. Доклінічне дослідження треспротекторних властивостей олігопептидів – гомологів фрагмента АКГ₁₅₋₁₈ на моделі гострого холодового стресу..... 41

Серединська Н. М., Мохорт М. А., Киричок Л. М., Хоменко В. С., Бершова Т. А., Суворова О. С. Протибольова активність лефлуноміду за комбінованого застосування з цефекоксибом та амлодипіном на тлі експериментального ревматоїдного артриту, асоційованого з артеріальною гіпертензією..... 49

<i>Soloviev A. I. The BK_{Ca} channels deficiency and high protein kinase C activity as a main reasons for radiation-induced vascular hypercontractility</i>	57
<i>Шарова А. О., Гринчук Н. І., Дудікова Д. М., Недашківська В. В., Суворова З. С., Вринчану Н. О. Антибактеріальна активність 4-(1-адамантил)-(1-амінобутил)бензолу відносно біоплівки S. Aureus.</i>	79
<i>Шеремета Л. М., Гайнюк М. Б., Багрій М. М. Вплив пектину яблучного на гістоструктуру печінки щурів й активність процесів ПОЛ за умов хронічної алкогольної інтоксикації</i>	86

КЛІНІЧНА ФАРМАКОЛОГІЯ

<i>Дроговоз С. М., Матвеева Е. В., Лукиянчук Ю. О., Ракеев П. В. Факторы, способствующие побочным эффектам off label препаратов.</i>	92
--	----

ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ

<i>Брицун В. М., Останіна Н. В. Особливості кондуктометричного контролю якості дистильованої води для фармакопейних потреб.</i>	97
---	----

ОСОБИСТОСТІ

Пам'яті вченого, колеги, друга Віктора Миколайовича Бобирьова.....	104
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ	106
-------------------------	-----

CONTENT	107
----------------------	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Бухтиарова Т. А., Григорьева А. С., Мысливец С. А. К 25-летию Национальной академии медицинских наук Украины. Сегодняшний день ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины» 3

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Демченко С. А., Шарыкина Н. И., Бухтиарова Т. А., Бобкова Л. С., Демченко А. М. Синтез и противоопухолевая активность гидробромидов 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанола 7

Добреля Н. В., Гула Н. С., Карацуба Т. А., Хромов А. С. Перспективы использования липосомальной формы цитохрома С при восполнении острой массивной кровопотери 14

Иванова И. В., Мельник М. И., Соловьев А. И. Развитие экспериментального сахарного диабета подавляет общую калиевую проводимость в гладкомышечных клетках аорты, но увеличивает ее в клетках легочной артерии крыс 25

Коваленко В. Н., Ткаченко А. Е., Шяхметова А. М., Матвиенко А. В. Влияние метформина на морфофункциональные характеристики семенников крыс с метаболическим синдромом, развившемся в ювенильном возрасте 32

Кудина О. В., Штрыголь С. Ю., Колобов А. А. Доклиническое изучение стресспротекторных свойств олигопептидов – гомологов фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ на модели острого холодового стресса 41

Серединская Н. Н., Мохорт Н. А., Киричок Л. М., Хоменко В. С., Бершова Т. А., Суворова А. С. Противоболевая активность лефлуномида при комбинированном применении с целекоксибом и амлодипином на фоне экспериментального ревматоидного артрита, ассоциированного с артериальной гипертензией. 49

Соловьев А. И. Нарушение функции Ca²⁺-зависимых калиевых каналов большой проводимости и высокая активность протеинкиназы С – главные причины развития гиперсократимости сосудов, вызванной воздействием радиации 57

Шарова А. А., Гринчук Н. И., Дудикова Д. М., Недашковская В. В., Суворова З. С., Врынчану Н. А. Антибактериальная активность 4-(1-адамантил)-(1-аминобутил) бензола относительно биопленок *S. aureus* 79

Шеремета Л. М., Гайнюк М. Б., Багрий М. М. Влияние яблочного пектина на гистоструктуру печени крыс и активность процессов ПОЛ в условиях хронической алкогольной интоксикации 86

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Дроговоз С. М., Матвеева Е. В., Лукиянчук Ю. О., Ракеев П. В. Факторы, способствующие побочным эффектам *off label* препаратов 92

ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА, ФАРМАКОЭКОНОМИКИ

Брицун В. Н., Останина Н. В. Особенности кондуктометрического контроля качества дистиллированной воды для фармакопейных потребностей 97

ЛИЧНОСТИ

Памяти ученого, коллеги, друга Виктора Николаевича Бобырева 104

CONTENT

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

<i>Demchenko S. A., Sharikina N. I., Bukhtiarova T. A., Bobkova L. S., Demchenko A. M.</i> Synthesis and antitumor activity of hydrobromides 1-(4 ¹ -cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4 <i>H</i> -[1,3] thiazin-2-yl) arylamino] ethanone.....	7
<i>Dobrel'ya N. V., Gula N. S., Karazuba T. A., Khromov O. S.</i> Prospects of using the liposome encapsulated cytochrome C at replenishment of acute massive hemorrhage	14
<i>Ivanova I. V., Melnyk M. I., Soloviev A. I.</i> Experimental diabetes mellitus inhibits the total potassium conduction in the rat aorta smooth muscle cells, but increases it in the rat pulmonary artery cells.....	25
<i>Kovalenko V. N., Tkachenko A. E., Shayakhmetova A. M., Matvienko A. V.</i> Impact of metformin on testis morpho-functional characteristics in male rats induced by metabolic syndrome developed at the juvenile age.....	32
<i>Kudina O. V., Shtrygol' S. Yu., Kolobov A. A.</i> Preclinical investigation of stress-protective properties of oligopeptides – homologs of the ACTH ₁₅₋₁₈ fragment on the model of acute cold stress.....	41
<i>Seredinska N. M., Mokhort N. A., Kirichok L. M., Khomenko V. S., Bershova T. A., Suvorova A. S.</i> Analgesic activity of leflunomide in combination with celecoxib and amlodipine under experimental rheumatoid arthritis associated with arterial hypertension	49
<i>Soloviev A. I.</i> The BK _{Ca} channels deficiency and high protein kinase C activity as a main reasons for radiation-induced vascular hypercontractility	57
<i>Sharova A. O., Hrynychuk N. I., Dudikova D. M., Nedashkivska V. V., N. O. Suvorova, Z. S. Vrynchanu</i> Antibacterial activity of 4-(adamantyl)-(1-aminobutyl) benzole against <i>S. aureus</i> biofilms.....	79
<i>Sheremeta L. M., Haynyuk M. B., Bagriy M. M.</i> The influence of apple pectin on the rat's liver histological structure and activity of the lipid peroxidation in experimental chronic alcohol intoxication	86

CLINICAL PHARMACOLOGY

<i>Drogovoz S. M., Matveeva E. V., Lukianchuk J. O., Rakeev P. V.</i> Factors which promote adverse effects off label drugs.....	92
--	----

ISSUES OF PHARMACY, PHARMACEUTICAL MARKET, PHARMACOECONOMICS

<i>Britsun V. M., Ostanina N. V.</i> Features of conductometric quality control of distilled water for pharmacopoeial needs	97
---	----

PERSONALITIES	104
----------------------------	-----

Т. А. Бухтіарова, Г. С. Григор'єва, С. О. Мисливець

До 25-річчя Національної академії медичних наук України

Сьогodenня ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

ДУ «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», що був заснований у 1934 році, знаходиться в підпорядкуванні Національної академії медичних наук України протягом 25 років її діяльності. У цей час Інститут очолюють академік НАМН України О. В. Стефанов (1992–2007 рр.) та член-кореспондент НАМН України Т. А. Бухтіарова (з 2007 р.).

Інститут є провідною спеціалізованою науково-дослідною установою України в галузі фармакології та лікарської токсикології.

Чинна структура Інституту включає 5 наукових підрозділів:

- відділ фармакології (завідувач – доктор медичних наук Н. М. Серединська) у складі 3 лабораторій: лабораторія онкофармакології (завідувач – доктор медичних наук, професор Н. І. Шарікіна), лабораторія фармакології протимікробних засобів (завідувач – доктор медичних наук Н. О. Вринчану), лабораторія фармакології ефекторних органів і систем (доктор медичних наук Н. М. Серединська);
- відділ токсикології (завідувач – доктор біологічних наук, професор В. М. Коваленко);
- відділ фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії (завідувач – доктор медичних наук, професор А. І. Соловйов);
- відділ медичної хімії (завідувач – доктор фармацевтичних наук, професор А. М. Демченко);
- Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів (завідувач – кандидат фармацевтичних наук О. П. Колядич);
- відділ науково-медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (завідувач – кандидат медичних наук С. С. Таніна).

У складі Інституту функціонує відповідно до правил «Належної лабораторної практики» (GLP) експериментально-біологічна клініка (віварій).

Наукова тематика Інституту, що координується Національною академією медичних наук України, відповідає пріоритетним напрямам розвитку науки та техніки: науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань; нові речовини та матеріали (Закон України від 11 липня 2001 р. № 2623-III (зі змінами) «Про пріоритетні напрями розвитку науки і техніки»).

До актуальних напрямів наукових досліджень Інституту належать:

- Спрямований пошук потенційних лікарських засобів у нових рядах хімічних сполук (синтез, скринінг) з визначенням сполук лідерів, їхньою подальшою оптимізацією, визначенням кандидатів для поглибленого вивчення як потенційних засобів лікування серцево-судинних, онкологічних захворювань, протимікробних засобів, засобів фармакологічної корекції болю та запалення.
- Дослідження нових аспектів фармакодинаміки відомих лікарських засобів з метою їхнього медичного застосування за новим призначенням.
- Експериментальне обґрунтування оптимізації схем і методів фармакотерапії поширених захворювань, включно за коморбідної патології.
- Пошук нових шляхів фармакокорекції патологічних станів на підставі вивчення їхнього патогенезу та механізмів дії лікарських засобів різних класів.
- Дослідження в галузі лікарської токсикології, нанофармакології, фармакопротеоміки, фармакогнозії та фармацевтичної хімії.
- Впровадження GLP у процес доклінічного вивчення лікарських засобів.



Інститут має високий кадровий потенціал (168 співробітників, серед яких: членів-кореспондентів НАМН України – 2; професорів – 7; докторів наук – 15; кандидатів наук – 23, молодих учених – 25; 4 співробітники Інституту мають почесне звання «Заслужений діяч науки і техніки»).

Інститут здійснює підготовку кадрів вищої кваліфікації зі спеціальностей «Медицина», «Біологія» (спеціалізація «фармакологія», «токсикологія»).

З метою поглиблення знань з фундаментальних і прикладних питань фармакології та токсикології під егідою Інституту з 1994 року проводяться Національні школи-семінари молодих учених-фармакологів України. Для підтримки талановитої моло-

ді в Інституті започатковані стипендії імені академіків О. І. Черкеса та О. В. Стефанова.

Плідна співпраця науковців різного фаху (лікарі, біологи, хіміки, фармацевти) та різних поколінь сприяє вирішенню актуальних проблем фармакологічної науки, створенню підґрунтя сучасної раціональної терапії, забезпечує спадкоємність наукових шкіл, збереження кращих традицій науково-дослідної діяльності.

Основу наукової діяльності Інституту становлять фундаментальні дослідження, які спрямовані на вивчення патогенетичних механізмів формування патологічних станів, загальних та специфічних особливостей дії фізіологічно-активних речовин на різних рівнях організа-



ції живої матерії з метою створення та впровадження нових ефективних і безпечних лікарських препаратів.

Прикладні розробки Інституту охоплюють повний цикл досліджень – від синтезу та первинної фармакологічної й токсикологічної оцінки фізіологічно-активних речовин до створення на їхній основі лікарських препаратів з подальшим впровадженням у виробництво.

За роки незалежності України Інститутом розроблено та впроваджено в медичну практику низку оригінальних конкурентноздатних препаратів, а саме: «Амізон», «Хлофіден», «Бретеофін», «Мебіфон», «Антраль», «Вітам», «Есмін» та інші.

Піонерські розробки в галузі ліпосомо-фармакології, започатковані академіком НАМН України О. В. Стефановим, завершилися створенням і впровадженням у виробництво та медичну практику інноваційних засобів, одержаних на основі нанотехнологій – препаратів «Ліпін», «Ліолів», «Ліпофлавіон». Інститут готовий передати фармацевтичним виробникам матеріали завершених доклінічних випробувань ще 4 оригінальних лікарських засобів.

Інститут першим в Україні впровадив нові підходи для доведення біоеквівалентності лікарських засобів системної дії в умовах *in vitro* за методом проникності крізь моношар клітинної культури Сасо-2; сформовано експериментальну базу для проведення доклінічних досліджень стовбурових клітин і вперше проведено дослідження дорослих мезенхімальних стовбурових клітин людини на моделях артеріальної гіпертензії.

Інститут став ініціатором впровадження в Україні стандартів GLP у процес доклінічних досліджень лікарських засобів, першим в Україні пройшов міжнародну сертифікацію на відповідність принципам GLP. Інститут атестований на відповідність міжнародному стандарту системи менеджменту якості – ISO 9001:2008 (ДСТУ ISO 9001:2009, IDT).

У структурі Інституту функціонує Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів, яка на замовлення фармпідприємств і закла-



дів охорони здоров'я виконує роботи з контролю за якістю медичних препаратів. Розроблені оригінальні методики визначення біологічно активних речовин у рослинній сировині, що використані для стандартизації лікарських рослин і нових фітокомпозицій для практики охорони здоров'я.

Виконуючи функції науково-практичного, методичного та консультативного закладу, Інститут має великий досвід співпраці з вітчизняними та іноземними фірмами, підприємствами, установами та пропонує наступні послуги:

- доклінічне вивчення токсичності, специфічних видів токсичності та фармакології безпеки лікарських засобів;
- доклінічне вивчення специфічної фармакологічної дії (протипухлинної, антиметастазної, протизапальної, спазмолітичної, антигіпертензивної, антиаритмічної, протиішемічної, протимікробної, мембрано-, гепато- і генопротекторної тощо) лікарських засобів в експериментальних моделях *in vivo* та *in vitro*;
- молекулярно-генетичні дослідження з використанням ПЛР;
- дослідження біоеквівалентності лікарських засобів за методом проникливості крізь моношар клітинної культури Сасо-2;



- попередній, передреєстраційний і вихідний контроль якості субстанцій, допоміжних речовин й готових лікарських засобів;
- розробку та валідацію методик аналізу лікарських засобів і формування нормативно-аналітичної документації;
- консультативну та методичну допомогу щодо розробки програм і проведення токсикологічних і фармакологічних досліджень відповідно до правил GLP (The OECD Series on Principles of GLP).

Міжнародне співробітництво Інституту охоплює більшість країн Східної Європи, США, Великобританію, Ірландію та Австралію. Науковці Інституту беруть участь у роботі багатьох міжнародних наукових організацій та є їхніми постій-

ними членами, а саме: Міжнародної асоціації фундаментальної та клінічної фармакології (IUPHAR), Британського фізіологічного товариства, Британського Королівського товариства, Міжнародного ліпосомального товариства, Міжнародної асоціації клінічної мікробіології та антимікробної хіміотерапії, Асоціації ЄВРО-ТОКС, Європейської асоціації нейроендокринологів та інших професійних товариств та асоціацій.

Інститут є засновником та колективним членом ВГО «Асоціація фармакологів України», співзасновником журналу «Фармакологія та лікарська токсикологія»/Pharmacology and Drug Toxicology, який включено до переліку фахових видань МОН України та найбільшої бази серійних видань ULRICHSWEB Global Serials Directory.



С. А. Демченко, Н. І. Шарикіна, Т. А. Бухтіарова,
Л. С. Бобкова, А. М. Демченко

Синтез і протипухлинна активність гідробромідів 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро- 4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанонів

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології»

Ключові слова: протипухлинна активність, 5-фторурацил, похідні 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону

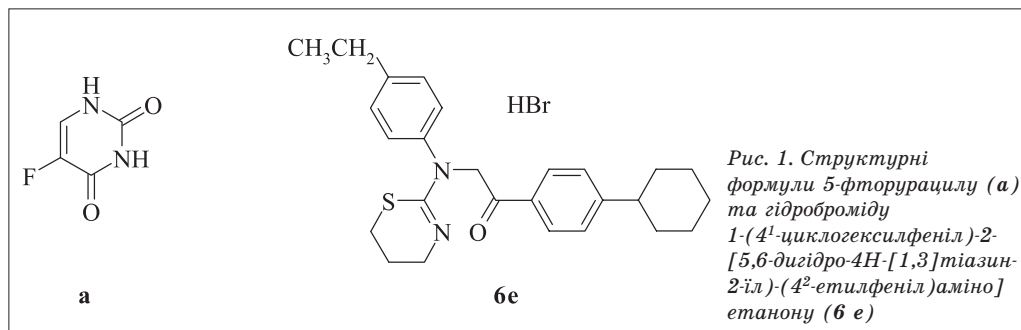
Фармакотерапія пухлинної патології є найважливішою складовою в боротьбі з онкологічними захворюваннями. Останніми роками вона збагатилась численними новими препаратами, що збільшують її ефективність та безпечність [1]. За даними ВООЗ, щороку з'являється понад 10 млн нових онкохворих. Ризик розвитку онкологічних захворювань становить 27,7 % для чоловіків і 18,5 % для жінок. Злоякісні новоутворення вражають в Україні кожного четвертого чоловіка й кожну шосту жінку [2]. Тому розробка нових протипухлинних засобів є нагальною проблемою сучасної фармацевтичної хімії.

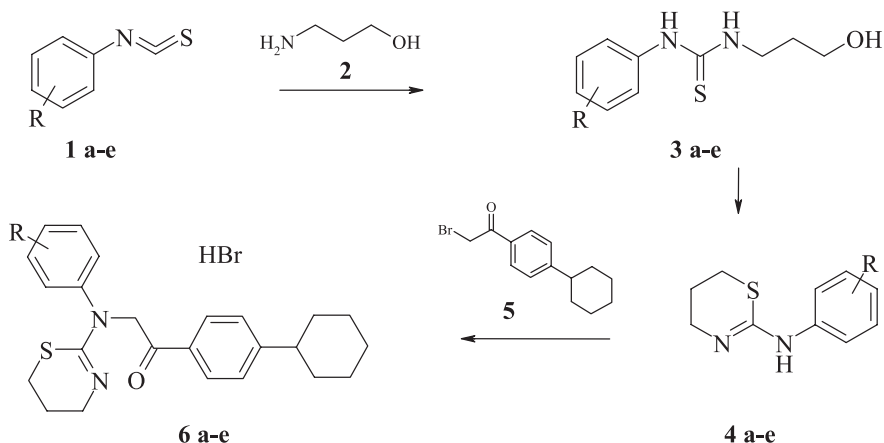
Арсенал сучасних фармацевтичних субстанцій для досягнення паліативного ефекту та зменшення пухлини та відповідно клінічної ремісії досить широкий. Відомі протипухлинні препарати мають різний механізм дії та застосовуються у відповідних схемах лікування, виражений клінічний ефект складає від 20 до 80 %. В окремих випадках ремісія складає до 2 років, а понад 10 % хворих мають ремісію понад 3 роки. Широке

застосування набули дитицен, метатрек-сат, вінкристин, адриабластин. Лікарські засоби, що перелічені, мають необхідні лікувальні властивості, але проявляють значні побічні ефекти, що супроводжуються розвитком патологічних процесів в організмі.

Як еталон для порівняння протипухлинної активності нових перспективних сполук використовують препарат з групи антагоністів – 5-фторурацил. Він пригнічує процес ділення ракових клітин, блокуючи синтез ДНК. Його використовують у лікуванні меланоми, раку товстого кишечника, прямої кишки, раку молочної залози, шлунка, печінки, карциноми ендометрію, раку яєчників та сечового міхура. Побічною дією цього препарату є: пригнічення кровотворення, центральної нервової системи, порушення серцево-судинної, травної та репродуктивної систем, дерматологічні та алергічні реакції [3].

Мета дослідження – синтезувати та вивчити протипухлинну активність похідних гідробромідів 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону порівняно з відомим протипухлинним препаратом 5-фторурацилом на етапі первинного фармакологічного скринінгу (рис. 1).





де **1, 3, 4, 6**: а) R = H; б) R = 2-CH₃; в) R = 2-OCH₂CH₃;
 д) R = 4-CH₃; е) R = 4-CH₂CH₃.

Матеріали та методи. Досліджувані сполуки (**6**) гідроброміди 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-ариламіно]етанону були синтезовані у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за схемою, наведеною вище.

(5,6-Дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-ариламіни **4 а-е** одержано за методом [4] конденсацією відповідного арилізотіоціанату **1 а-е** з пропаноламіном **2** та подальшою обробкою одержаних тіосечовин **3 а-е** водним розчином соляної кислоти. 2-Бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанон **5** був одержаний за методом [5].

Спектри ПМР були зареєстровані на спектрометрі Bruker DRX-500, робоча частота 500,13 МГц, внутрішній стандарт ТМС у розчині DMSO-d₆ + CCl₄ (1:3). Контроль за чистотою синтезованих сполук здійснювався за допомогою ТХС на пластинках Silufol UV-254 у системі хлороформ – метанол 9:1. Ліпофільність (LogP) синтезованих сполук була розрахована за допомогою програми ACD LogP.

Синтез гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-феніламіно]етанону **6 а:** Суміш 1,92 г (0,01 моль) (5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-феніламіну **4 а** та 2,81 г (0,01 моль) 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанону в 50 мл етилацетату кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1 год. Після чого осад, що утворився, відфільтрували та крис-

талізували з пропанолю-2. Вихід – 3,03 г (64 %). Т_{пл.} = 205–206 °С. Знайдено, %: N = 5,79 Br = 16,6 C₂₄H₂₉BrN₂OS. Вираховано, %: N = 5,91 Br = 16,9. Спектр ПМР (ДМСO-d₆, ТМС): 1,26–1,84 (м, 10H, (CH₂)₅), 2,10 та 2,23 (м+м, 2H, 5-CH₂), 2,56 (м, 1H, CH), 3,08 та 3,49 (м+м, 2H, 6-CH₂), 3,30 (м, 2H, 4-CH₂), 4,31 та 4,49 (д-д, 2H, NCH₂CO), 7,33 та 7,61 (д-д, 4H, C₆H₄), 7,49–7,68 (м, 5H, C₆H₅), 8,10 (с, 1H, HBr). Log P = 5,85 ± 0,40.

Синтез гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-(2²-метилфеніл)аміно]етанону **6 б** було одержано аналогічно гідроброміду **6 а** із 2,06 г (0,01 моль) (5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-(орто-толіл)аміну **4 б** та 2,81 г (0,01 моль) 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанону **5**. Вихід 2,88 г (59 %). Т_{пл.} = 248–250 °С (із пропанолю-2). Знайдено, %: N = 5,57 Br = 16,2 C₂₅H₃₁BrN₂OS. Вираховано, %: N = 5,74 Br = 16,4. Спектр ПМР (ДМСO-d₆, ТМС): 1,25–1,89 (м, 10H, (CH₂)₅), 2,20 та 2,44 (м+м, 2H, 5-CH₂), 2,36 (с, 3H, CH₃), 2,55 (м, 1H, CH), 3,11 та 3,78 (м+м, 2H, 6-CH₂), 3,28 та 3,45 (м+м, 2H, 4-CH₂), 4,20 та 4,49 (д-д, 2H, NCH₂CO), 7,27–8,25 (м, 8H, C₆H₄ + C₆H₄), 8,37 (с, 1H, HBr). Log P = 6,31 ± 0,40.

Синтез гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-їл)-(2²-етоксифеніл)аміно]етанону **6 в** було одержано аналогічно гідроброміду **6 а** з 2,36 г (0,01 моль)

(5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(2'-етоксифеніл)аміну **4 с** та 2,81 г (0,01 моль) 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанону **5**. Вихід 2,85 г (55 %). $T_{пл.} = 247-248\text{ }^{\circ}\text{C}$ (з пропанолу-2). Знайдено, %: N = 5,28 Br = 15,3 $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$. Вирахувано, %: N = 5,41 Br = 15,4. Спектр ПМР (DMCO-d₆, TMC): 1,26–1,85 (м, 10H, (CH₂)₅), 1,41 (т, 3H, CH₂CH₃), 2,11 та 2,19 (м+м, 2H, 5-CH₂), 2,56 (м, 1H, CH), 3,05 та 3,53 (м+м, 2H, 6-CH₂), 3,27 (м, 2H, 4-CH₂), 4,15 та 4,18 (д-д, 2H, NCH₂CO), 4,24 (кв, 2H, CH₂CH₃), 7,10–7,55 (м, 4H, C₆H₄), 7,34 та 7,59 (д-д, 4H, C₆H₄), 8,09 (с, 1H, HBr). Log P = 5,69 ± 0,40.

Синтез гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-метилфеніл)аміно]етанону **6 d** було одержано аналогічно гідроброміду **6 а** з 2,06 г (0,01 моль) (5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(паратоліл)аміну **4 d** та 2,81 г (0,01 моль) 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанону **5**. Вихід 2,85 г (55 %). $T_{пл.} = 172-173\text{ }^{\circ}\text{C}$ (з пропанолу-2). Знайдено, %: N = 5,61 Br = 16,6 $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{OS}$. Вирахувано, %: N = 5,74 Br = 16,4. Спектр ПМР (DMCO-d₆, TMC): 1,26–1,84 (м, 10H, (CH₂)₅), 2,07 та 2,23 (м+м, 2H, 5-CH₂), 2,37 (с, 3H, CH₃), 2,51 (м, 1H, CH), 3,08 та 3,47 (м+м, 2H, 6-CH₂), 3,26 (м, 2H, 4-CH₂), 4,26 та 4,43 (д-д, 2H, NCH₂CO), 7,31 та 7,60 (д-д, 4H, C₆H₄), 7,35 та 7,49 (д-д, 4H, C₆H₄), 8,06 (с, 1H, HBr). Log P = 6,31 ± 0,40.

Синтез гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону **6 е** було одержано аналогічно гідроброміду **6 а** з 2,20 г (0,01 моль) (5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(паратилфеніл)аміну **4 е** та 2,81 г (0,01 моль) 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанону **5**. Вихід 3,36 г (67 %). $T_{пл.} = 176-178\text{ }^{\circ}\text{C}$ (з пропанолу-2). Знайдено, %: N = 5,39 Br = 15,6 $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{OS}$. Вирахувано, %: N = 5,58 Br = 15,9. Спектр ПМР (DMCO-d₆, TMC): 1,26 (т, 3H, CH₂CH₃), 1,44–1,83 (м, 10H, (CH₂)₅), 2,23 та 2,30 (м+м, 2H, 5-CH₂), 2,57 (м, 1H, CH), 2,72 (кв, 2H, CH₂CH₃), 3,10 та 3,64 (м+м, 2H, 6-CH₂), 3,30 та 3,39 (м+м, 2H, 4-CH₂), 4,39 (с, 2H,

NCH₂CO), 7,26 та 7,60 (д-д, 4H, C₆H₄), 7,35 та 7,64 (д-д, 4H, C₆H₄), 8,15 (с, 1H, HBr). Log P = 6,85 ± 0,40.

Протипухлинну активність відносно 60 ліній ракових клітин (лейкемії, легень, товстого кишківника, ЦНС, меланоми, яєчників, нирок, простати та молочної залози) було проведено в Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) у рамках Development Therapeutic Program за стандартною процедурою [6]. Для проведення фармакологічного скринінгу нами було обрано сполуку, яка має найвище значення LogP = 6,85 – гідробромід 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону **6 е**.

Визначення протипухлинної активності проводили високочутливим флуорометричним методом, кількісно оцінюючи інтенсивність кольору флуоресцентного випромінювання (барвник – сульфородамін В) через 48 год опромінення клітини зі сполукою, що тестується. Результат проведених досліджень виражали у відсотках росту клітин раку до контролю – 5-фторурацилу. Використана система відбору та вивчення сполук з потенційною протипухлинною активністю *in vitro* базується на визначенні відсотка росту клітин пухлини (PG) під впливом сполуки, що тестується.

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів протипухлинної активності гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону **6 е** показав, що в концентрації 10⁻⁵ моль/л сполука **6 е** виявила здатність пригнічувати ріст клітин раку, які охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (таблиця).

Відповідно до результатів, наведених у таблиці, найефективнішою досліджувана сполука виявилася відносно всіх клітин лейкемії CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4 та RPMI-8226 зі значенням мітотичної активності -3,76 %, -55,48 %, -13,40 %, -24,41 % та -37,55 % відповідно. Від'ємні значення свідчать про те, що сполука **6 е** не тільки затримує ріст пухлини, але й знищує зазначені лінії ракових клітин. Також

Протипухлинна активність гідроброміду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4Н-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно] етанону (6 е) in vitro на лініях клітин раку в концентрації 10⁻⁵ моль/л та в градієнті концентрацій 10⁻⁴–10⁻⁸ моль/л

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності 6 е			
		мітотична активність, %	IgGI ₅₀	Ig TGI	Ig LC ₅₀
Лейкемія	CCRF-CEM	-3,76	-5,76	-5,32	-4,57
	HL-60(TB)	-55,48	-5,71	-5,38	-5,06
	K-562	-13,40	-5,84	-5,44	-5,05
	MOLT-4	-24,41	-5,81	-5,40	-4,92
	RPMI-8226	-37,55	-5,84	-5,45	-5,06
	SR		-5,84	-5,43	
Дрібноклітинний рак легенів	A549/ATCC	27,62	-5,79	-5,51	-5,23
	HOP-62	0,54	-5,74	-5,49	-5,24
	HOP-92	-17,44			
	NCI-H226	16,87	-5,80	-5,50	-5,20
	NCI-H23	17,02	-5,72	-5,38	-5,05
	NCI-H322M	61,73	-5,62	-5,23	-4,59
	NCI-H460	-73,50	-5,75	-5,45	
	NCI-H522	-23,31	-5,74	-5,45	-5,16
Рак товстого кишківника	COLO 205	2,00	-5,78	-5,50	-5,22
	HCC2998	4,65	-5,78	-5,48	-5,18
	HCT-116	-31,69	-5,85	-5,55	-5,26
	HCT-15	11,33	-5,82	-5,52	-5,22
	HT-29	-26,75	-5,83	-5,51	-5,20
	KM12	1,98	-5,75	-5,49	-5,22
	SW-620	28,24	-5,79	-5,50	-5,21
Рак головного мозку	SF-268	11,66	-5,75	-5,46	-5,17
	SF-295	13,41	-5,78	-5,51	-5,24
	SF-539	-26,88	-5,80	-5,53	-5,27
	SNB-19	35,20	-5,86	-5,56	-5,26
	SNB-75	28,35	-5,85	-5,39	-4,81
	U251	-45,57	-5,83	-5,55	-5,26
Меланома	LOX IMVI	-90,06	-5,74	-5,46	-5,18
	MALME-3M		-5,83	-5,53	-5,24
	M14	-37,64	-5,77	-5,49	-5,22
	MDA-MB-435	19,52	-5,81	-5,53	-5,24
	SK-MEL-2	48,64	-5,70	-5,45	-5,20
	SK-MEL-28	31,81	-5,81	-5,54	-5,27
	SK-MEL-5	-86,39	-5,83	-5,55	-5,28
	UACC-257	-12,90	-5,78	-5,50	-5,22
	UACC-62	27,92	-5,80	-5,53	-5,25

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності 6 е			
		мітотична активність, %	lgGI ₅₀	lg TGI	lg LC ₅₀
Рак яєчників	IGROV1	33,02	-5,74	-5,41	-5,07
	OVCAR-3	37,47	-5,77	-5,51	-5,25
	OVCAR-4	27,55	-5,82	-5,44	-5,05
	OVCAR-5	23,52	-5,71	-5,33	-4,89
	OVCAR-8	6,89	-5,80	-5,52	-5,23
	NCI/ADR-RES	32,38	-5,72	-5,36	-4,95
	SK-OV-3	36,42	-5,70	-5,39	-5,09
Рак нирок	786-0	8,76	-5,78	-5,51	-5,23
	A498	13,87	-6,26	-5,68	
	ACHN	13,62	-5,77	-5,48	-5,18
	CAKI-1	33,15	-5,79	-5,48	-5,17
	RXF 393	9,39	-5,88	-5,56	-5,24
	SN12C	24,18	-5,90	-5,57	-5,23
	TK-10	29,40	-5,76	-5,48	-5,20
	UO-31	29,02	-5,86	-5,39	-4,78
Рак простати	PC-3	12,89	-5,86	-5,56	-5,27
	DU-145	34,57	-5,76	-5,51	-5,25
Рак молочної залози	MCF7	4,83	-5,86	-5,57	-5,27
	MDA-MB-231/ATCC	10,34	-5,82	-5,53	-5,23
	HS 578T	33,54	-5,69	-5,32	> -4,00
	BT-549	25,56	-5,72	-5,47	-5,22
	T47D	-3,52	-5,68	-5,27	-4,44
	MDA-MB-468	-22,84	-5,91	-5,58	-5,26

сполука 6 е знищує клітини дрібноклітинного раку легенів HOP-92, NCI-H460 та NCI-H522, її мітотична активність складає -17,44 %, -73,50 % та -23,31 % відповідно. Найактивнішою сполука 6 е виявилася проти клітин меланоми LOX IMVI та SK-MEL-5 зі значеннями мітотичної активності -90,06 % та -86,39 % відповідно. Таким чином, у концентрації 10^{-5} моль/л сполука 6 е на всіх досліджених лініях ракових клітин перевищує препарат порівняння – 5-фторурацил за гальмуванням росту відповідних пухлин. А для 18 видів ракових клітин встановлено їхнє достовірне знищення (таблиця).

На другому етапі дослідження, поглибленому *in vitro* скринінгу, сполуку 6 е тестували в 5 концентраціях за 10-разового розведення (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M та 0,01 μ M) на переліче-

них лініях ракових клітин людини. У результаті експерименту розраховано 3 дозозалежні параметри, а саме: GI₅₀ – концентрація сполуки, яка викликає пригнічення росту 50 % клітин лінії; TGI – концентрація, що створює повне пригнічення росту клітин; LC₅₀ – концентрація, яка викликає загибель 50 % пухлинних клітин. GI₅₀ інтерпретовано як ефективний рівень інгібування, TGI – як цитостатичний ефект, а LC₅₀ – летальна концентрація, що характеризує цитотоксичну дію. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів (lgGI₅₀, lgTGI та lgLC₅₀) є меншими, ніж -4,00, то сполука вважається активною [7–9].

Встановлено, що гідробромід 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанолу за поглибленого скринінгу *in vitro* на

лініях клітин раку в концентраціях 10^{-4} – 10^{-8} моль/л має ефективний рівень інгібування щодо всіх ліній ракових клітин. Так, для ліній раку лейкемії показник $\text{Log}_{10} \text{GI}_{50}$ знаходиться в межах від -5,84 до -5,71, для клітин дрібноклітинного раку легенів – у межах від -5,80 до -5,62, для клітин раку товстого кишківника – у межах -5,83 – -5,75, для клітин раку головного мозку – в інтервалі від -5,86 до -5,74, для клітин меланоми – в інтервалі від -5,83 до -5,74, для клітин раку нирок – від -6,26 до -5,76. Відносно клітин раку молочної залози показник знаходиться в межах від -5,91 до -5,72.

Повне пригнічення росту всіх досліджених ракових клітин $\text{Log}_{10} \text{TGI}$ під дією сполуки **6 е** знаходиться в інтервалі -5,68 – -5,23.

Таким чином, гідробромід 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етано-

ну проявляє доведену протипухлинну активність відносно широкого спектра ракових клітин і може стати основою для створення нових ефективних протипухлинних засобів.

Висновки

1. Гідробромід 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону (**6 е**) проявляє доведену протипухлинну активність відносно широкого спектра ракових клітин.
2. Найактивнішою сполука **6 е** виявилась проти клітин меланоми LOX IMVI і SK-MEL-5, знищуючи ці клітини на 90,06 і 86,39 % відповідно.
3. Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення похідних 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону як потенційних протипухлинних засобів.

1. Протипухлинні (протибластомні) лікарські засоби. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://pidruchniki.com/68392/meditsina/protipuhlinni_protiblastomni_likarski_zasobi – Назва з екрану.
2. Статистика онкологічних захворювань в Україні. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://diapharma.ua/articles/statistika-onkologichnih-zahvoryuvan-v-ukrayini> – Назва з екрану.
3. 5-Фторурацил. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/5%D0%A4%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%83%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BB> – Назва з екрану.
4. Aminothiazine and aminthiazole open analogs of levamisole: synthesis and antihelminthic activity / R. Caujolle, H. Amarouch, M. Payard [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 1989. – V. 24. – P. 287–292.
5. Structure-activity relationship study of 4EGI-1, small molecule eIF4E/eIF4G protein–protein interaction inhibitors / K. Takroui, T. Chen, E. Papadopoulos [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – V. 77. – P. 361–377.
6. Beverly A. Teicher. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical / Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews // Medical. – 2004. – V. 1. – 450 p.
7. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture Tetrazolium assay / M. C. Alley, D. A. Scudiero, P. A. Monks [et al.] // Cancer Res. – 1988. – V. 48. – P. 589–601.
8. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF- α / P. H. Carter, P. A. Scherle, J. A. Muckelbauer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 11879–11886.
9. Grever M. R. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program / M. R. Grever, S. A. Schepartz, B. A. Chabner // Seminars in Oncol. – 1992. – V. 19, № 6. – P. 622–638.

С. А. Демченко, Н. І. Шарикіна, Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, А. М. Демченко **Синтез і протипухлинна активність гідробромідів 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону**

Фармакотерапія пухлинної патології є найважливішою складовою боротьби з онкологічними захворюваннями, оскільки злоякісні новоутворення вражають в Україні кожного четвертого чоловіка та кожну шосту жінку.

Мета дослідження – синтезувати та вивчити протипухлинну активність гідробромідів 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону порівняно з 5-фторурацилом на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Взаємодією еквімолярних кількостей відповідних (5,6-дигідро-4*H*-[1,3] тіазин-2-іл)-ариламінів з 2-бromo-1-(4-циклогексилфеніл)-етанолом в етилацетаті синтезовані гідроброміди 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4*H*-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону. Будову та чистоту всіх отриманих речовин підтверджено даними ЯМР ¹H спектроскопії.

Оцінено протипухлинну активність гідробромиду 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-(4²-етилфеніл)аміно]етанону в дослідях *in vitro* на лініях ракових клітин як в концентрації 10⁻⁵ моль/л, так і в градієнті концентрацій 10⁻⁴ – 10⁻⁸ моль/л. Показано, що досліджувана речовина на всіх тестованих лініях ракових клітин перевищує препарат порівняння – 5-фторурацил за гальмуванням росту відповідних пухлин. А для 18 видів ракових клітин встановлено їхнє достовірне знищення. Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення похідних 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону як нових потенційних протипухлинних засобів.

Ключові слова: протипухлинна активність, 5-фторурацил, гідроброміди 1-(4¹-циклогексилфеніл)-2-[5,6-дигідро-4H-[1,3]тіазин-2-іл)-ариламіно]етанону

С. А. Демченко, Н. І. Шарикіна, Т. А. Бухтиарова, Л. С. Бобкова, А. М. Демченко
Синтез и противоопухолевая активность гидробромидов 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанона

Фармакотерапия опухолевой патологии является важнейшей составляющей в борьбе с онкологическими заболеваниями, поскольку злокачественные новообразования поражают в Украине каждого четвертого мужчину и каждую шестую женщину.

Цель исследования – синтезировать и изучить противоопухолевую активность гидробромидов 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанона в сравнении с 5-фторурацилом на этапе первичного фармакологического скрининга.

Взаимодействием эквимольных количеств соответствующих (5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламинов с 2-бromo-1-(4-циклогексилфенил)-этаном в этилацетате синтезованы гидробромиды 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанона. Строение и чистота всех полученных соединений подтверждены данными ЯМР ¹H спектроскопии.

Изучена противоопухолевая активность гидробромидов 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-(4²-этилфенил)амино]этанона в опытах *in vitro* на линиях раковых клеток как в концентрации 10⁻⁵ моль/л, так и в градиенте концентраций 10⁻⁴ – 10⁻⁸ моль/л. Показано, что исследованное соединение на всех протестированных линиях раковых клеток превышает препарат сравнения – 5-фторурацил по торможению роста соответствующих опухолей. А для 18 видов раковых клеток установлено их достоверное уничтожение. Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейшего изучения производных (4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанона в качестве новых потенциальных противоопухолевых средств.

Ключевые слова: противоопухолевая активность, 5-фторурацил, гидробромиды 1-(4¹-циклогексилфенил)-2-[5,6-дигидро-4H-[1,3]тиазин-2-ил)-ариламино]этанона

S. A. Demchenko, N. I. Sharikina, T. A. Bukhtiarova, L. S. Bobkova, A. M. Demchenko
Synthesis and antitumor activity of hydrobromides 1-(4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3] thiazin-2-yl)-arylamino] ethanone

Pharmacotherapy of tumor pathology is the most important component in the fight against cancer since the malignant neoplasms affect every fourth man and every sixth woman in Ukraine.

The aim of the study was to synthesize hydrobromides of 1-(4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3]thiazin-2-yl)-arylamino]-ethanone and investigate its antitumor activity in comparison with 5-fluorouracil at the stage of the primary pharmacological screening.

Under interaction of equimolar amounts of the corresponding 5,6-dihydro-4H-[1,3] thiazin-2-yl) arylamines with 2-bromo-1-(4-cyclohexylphenyl) -ethanone in ethyl acetate have been synthesized 1-(4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3] thiazin-2-yl)-arylamino] ethanone hydrobromides.

The structure and purity of all obtained compounds were confirmed by NMR ¹H spectroscopy.

Antitumor activity of 1-(4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3]-thiazin-2-yl)-(4²-ethylphenyl) amino] ethanone hydrobromide in experiments *in vitro* on cancer cell lines has been studied both at a concentration of 10⁻⁵ mol/l and in a concentration gradient of 10⁻⁴–10⁻⁸ mol/l.

It was shown that the investigated compound exceeds the reference drug – 5-fluorouracil by the degree of inhibition of growth of the corresponding tumors on all tested cancer cell lines. Studies also established with high reliability that 18 species of cancer cells were destroyed.

The data obtained justified the expediency of further investigations of the 4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3]thiazin-2-yl)-arylamino]-ethanones derivatives as new potential antineoplastic agents.

Key words: anticancer activity, 5-fluorouracil, hydrobromide of 1-(4¹-cyclohexylphenyl)-2-[5,6-dihydro-4H-[1,3]thiazin-2-yl)-arylamino]-ethanone

Надійшла: 25 лютого 2018 р.

Контактна особа: Демченко С. А., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

Н. В. Добреля¹, Н. С. Гула², Т. А. Карацуба¹, О. С. Хромов¹

Перспективи використання ліпосомальної форми цитохрому С для поповнення гострої масивної крововтрати

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

²Альбертський університет, м. Едмонтон, Канада

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосомальна форма цитохрому С

Кровотеча та, як наслідок, крововтрата є причиною близько 28 % смертей, які пов'язані з травмою [1, 2].

Гостра масивна крововтрата (ГМК), за якої об'єм втраченої крові не менший, ніж 30 % об'єму циркулюючої крові (ОЦК), призводить до гіповолемії, падіння артеріального тиску з подальшим розвитком стійкої гіпотонії, гіпоксії, синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові (ДВЗ-синдрому), прояву ознак поліорганної недостатності та метаболічного ацидозу [3, 4]. Основними фізіологічними реакціями організму на крововтрату є централізація кровообігу, компенсаторна аутогемодилуція, активація гемопоезу, збільшення хвилинного об'єму крові, гіперкоагуляція. За таких умов централізація кровообігу, що забезпечує функціонування життєво важливих органів, ґрунтується на триваломому та вираженому спазмі прекапілярних артеріальних сфінктерів і посткапілярних венул, що призводить до зниження кровотоку в нирках, печінці, м'язах, накопичення в них недоокиснених продуктів обміну та вазоактивних речовин [5]. Гіперкоагуляція, що підвищує гемостатичний потенціал крові та сприяє підтриманню гемостазу в пошкоджених судинах, за масивної крововтрати трансформується в важку патологію – ДВЗ-синдром, коли рівновага між механізмами тромбоутворення та фібринолізу порушується [6]. Цьому сприяють тканинна гіпоксія, ацидоз, зниження мікроциркуля-

ції, агрегація елементів крові, ендотоксикоз, значна травма тканин [7]. Погіршення реологічних властивостей крові в умовах метаболічного ацидозу сприяє утворенню складжів з формених елементів крові, що повністю блокує мікроциркуляторне русло, зумовлює ще більше зменшення ОЦК та прогресування гіпоксії [8]. На зміну централізації кровообігу приходить ефект децентралізації – виникає стійка гіпотонія, знижується діурез, розвивається гемодилуція та респіраторний дистрес-синдром, прогресивно зменшується серцевий викид [9, 10]. У наслідок важкої гіпоксії органів і тканин замість спазму судин виникає їхнє розширення та переповнення застійною кров'ю, що різко збільшує ступінь гіповолемії.

Основою лікування ГМК є своєчасна й адекватна інфузійно-трансфузійна терапія, основні завдання якої – відновлення ОЦК, нормалізація мікроциркуляції та реології крові, усунення дефіциту інтерстиціальної рідини, корекція порушень системи гемостазу та профілактика або усунення гіпоксії з урахуванням сучасних уявлень про толерантність до анемії-гіпоксії [11–14]. Враховуючи статистику смертності, загальноприйняті методи лікування, у тому числі й масивна трансфузійно-інфузійна терапія, часто виявляються неефективними, отже існує необхідність подальшого вивчення механізмів ГМК та пошуку нових підходів і фармакологічних препаратів, спрямованих на підвищення ефективності терапії геморагічного шоку [15, 16].

Перспективним для корекції ГМК може виявитися препарат, в якому будуть поєднані антигіпоксичні, мембранотропні, детоксикуючі властивості

ліпосом з компонентами дихального ланцюга. Експериментальні та клінічні дослідження свідчать, що фосфатидилхолінові ліпосоми мають антигіпоксичну, антиоксидантну, мембраностабілізуючу та неспецифічну детоксикуючу дію. Уведення в організм фосфатидилхолінових ліпосом підвищує швидкість дифузії кисню крізь біологічні мембрани, знижує ступінь гіпоксії тканин організму, інгібує вільнорадикальні процеси, знижує концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів у тканинах [17–19]. Цитохром С, який коригує процеси клітинного дихання, нормалізує окиснювальне фосфорилування та енергозабезпечення клітин, здатний підтримувати фізіологічні показники за ГМК у вигляді водного розчину [20], а в разі завантаження в ліпосоми проявляє кардіопротекторні властивості [21].

Мета дослідження – вивчити вплив ліпосомальної форми цитохрому С (ліпохрому) на артеріальний тиск та гемостаз за ГМК.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені з використанням 70 самців статевозрілих білих лабораторних щурів масою (275 ± 25) г, яких утримували на стандартному раціоні віварію без обмеження доступу до води. Методом випадкової вибірки тварин розділили на 8 груп.

У групах I–V було по 8 щурів. У тварин I групи ГМК не компенсували жодним розчином. Щурам II та IV груп внутрішньовенно (в/в) вводили фізіологічний розчин (ф/р) в об'ємі, що відповідає об'єму втраченої крові, тваринам II групи – через 5 хв, щурам IV групи – через 30 хв після ГМК. Щурам III і V груп після ГМК в/в вводили ліпосомальну форму цитохрому С (ліпохром) у дозі 5 мг / 100 г за фосфоліпідом в об'ємі ф/р, що відповідає об'єму втраченої крові, наступним чином: щурам III групи – через 5 хв, щурам V групи – через 30 хв після крововтрати.

Тварин VI–VIII груп використовували для дослідження гемостазу. У 14 щурів VI групи крововтрату не компенсували жодним розчином. Кров для аналізів була взята перед крововтратою, через 30 і 45 хв після кровопус-

кання. 8 щурам VII групи в/в вводили ф/р через 30 хв після крововтрати в об'ємі, що відповідає об'єму втраченої крові. 8 щурам групи VIII в/в вводили ліпохром у дозі 5 мг/100 г за фосфоліпідом в об'ємі ф/р, що відповідає об'єму втраченої крові. Кров для аналізів у тварин VII–VIII груп була взята перед крововтратою та через 30 хв після введення розчину.

Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до законодавства України [22], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [23].

Усіх тварин виводили з експерименту шляхом в/в введення летальної дози хлориду кальцію (3 мг/кг).

Знеболювання та операційна підготовка. Знеболювання в тварин проводили за допомогою суміші хлоралоу й уретану (1:10 за масою, 2 мг/кг за хлоралоу, внутрішньоочеревино). Тварин у хірургічній стадії наркозу розташовували на термостабілізованому операційному столі та проводили хірургічну підготовку – трахеотомію, катетеризацію *a.a. carotis comm., v. jugularis sin.*

Тиск крові в лівій сонній артерії вимірювали датчиками тиску ISOTEC (HSE, Німеччина) з наступним підсиленням і диференціюванням отриманих сигналів за допомогою підсилювача DBA, тип 660 (HSE, Німеччина) і пристрою DIF, тип 664 (HSE, Німеччина). Оцифрування даних здійснювали аналогово-цифровими конверторами Power Lab 4/30 (ADInstruments; Австралія) та ADC (HSE, Німеччина). Обробку сигналів, що одержували, проводили за допомогою програм «Chart 5» (ADInstruments, Австралія).

Моделювання ГМК у щурів. ГМК проводили в об'ємі 2,5 мл/100 г зі швидкістю 2 мл/хв, що загалом становить близько 35 % від загальної кількості циркулюючої крові [24–26]. Кров була відібрана з катетеризованої лівої сонної артерії.

Дослідження системи згортання крові. Кров була зібрана з сонної артерії до початку кровопускання та через 30 та 45 хв після нього (група VI) або

через 30 хв після поповнення крововтрати (групи VII–VIII) у пробірки з 3,8 % цитратом натрію (Vascutest Kima, Італія). Виділено плазму з використанням центрифуги MPW – 340 (Mechanika Precyzyjna, Польща). За допомогою коагулометра K-3002 OPTIC (Ksel Med, Польща) визначали тромбіновий час (ТЧ), протромбіновий час (ПЧ) та активований парціальний тромбoplastиновий час (АПТЧ).

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

Параметри, що вимірювали: концентрація водневих іонів (рН), парціальна напруга вуглекислоти в крові (рСО₂), парціальна напруга кисню (РО₂); параметри, що розраховували: бікарбонати плазми (HCO₃), насичення крові киснем (О₂SA), надлишок лугів крові (BE), сума аніонів буферних систем крові (BB).

Використані реактиви та розчини. У ході досліджень були використані: альфа-хлоралоза (Sigma, США), етилкарбамат (уретан, Sigma, США), гепарин (ТОВ Фарма Лайф, Україна), кальцію хлорид (10 % розчин CaCl₂, Arterium, Україна), NaCl (Peaxim, Україна), КН₂РО₄ (Sigma, США), NaOH (Sigma, США), ліпохром (ТОВ «Нано-медтех», Україна). Як ліпід для формування ліпосом був використаний яєчний лецитин.

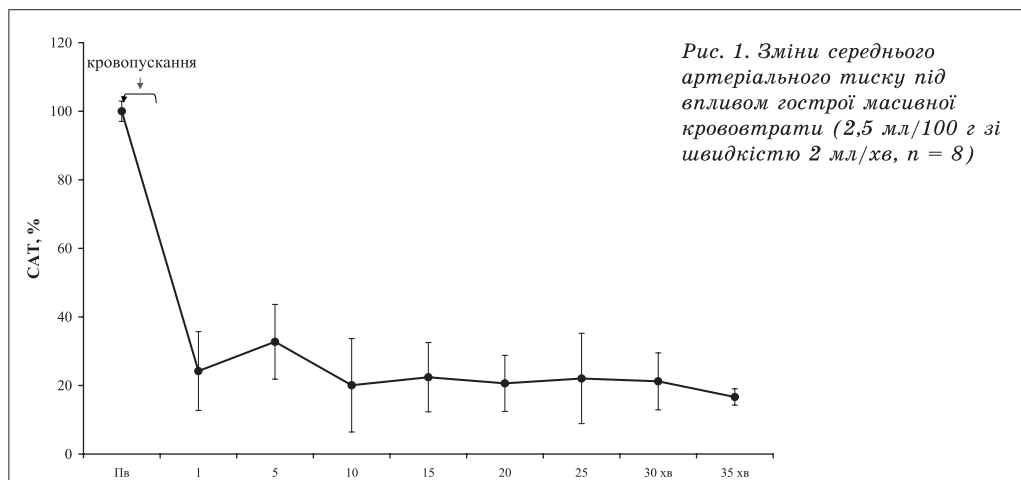
Аналіз та статистична обробка отриманих даних. Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка, нормально розподілені дані обчислювалися за критерієм Стюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Наведені дані представлені у випадку нормального розподілу у вигляді середнього арифметичного (М) та стандартної

похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n), у випадку розподілу, що відрізняється від нормального, у вигляді медіани (Med), першого та третього квантилей (Q1; Q3) для певної вибірки (n). Множинні порівняння проводили за допомогою тесту Манна-Уїтні (у разі нормального розподілу), непараметричного тесту Красскела-Уоліса та заключної апостеріорної перевірки за критерієм Ньюмена-Кейлса. Статистично значущими вважалися зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95 % або $p < 0,05$.

Усі розрахунки проводили на персональному комп'ютері з використанням програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результати та їх обговорення. У тварин I групи після ГМК спостерігали значну гіпотонію без періодів стабілізації середнього артеріального тиску (САТ), що свідчить про розвиток геморагічного шоку, який супроводжувався загибеллю всіх тварин протягом $(49,7 \pm 4,4)$ хв (рис. 1). Також ГМК призводила до розвитку різноспрямованих порушень у системі згортання крові, які через 30 хв після кровопускання проявлялися підвищеною активністю системи згортання крові, а до кінця періоду спостереження – її зниженням (рис. 2). Враховуючи це, поповнення проводили через 5 та 30 хв після кровопускання, внутрішньовенно зі швидкістю 2 мл/хв.

Виразніше різнонаправлені зміни системи гемостазу відстежуються на прикладі ПТ, який характеризує зовнішній шлях згортання крові. Через 30 хв після крововтрати цей показник скорочується на 31,5 %, що свідчить про посилення коагуляційної активності крові, надалі спостерігали подовження ПТ на 29,7 %, яке характерне для стадії гіпокоагуляції з виснаженням факторів згортання й антикоагулянтів, вираженою гіпофібриногенемією та тромбоцитопенією, а також посиленням фібринолітичної активності [27]. АПТЧ, що відображає шлях внутрішньої активації згортання крові [28], навіть у разі відсутності вірогідних змін за короткий проміжок часу, свідчить про тенденцію до гіперкоагуляції

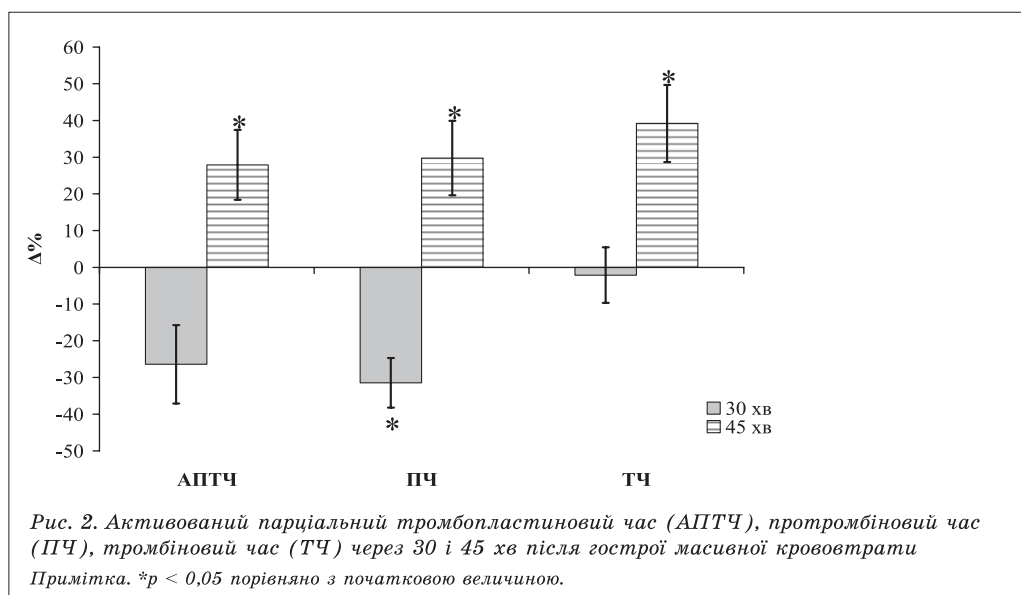


через 30 хв після ГМК та достовірно вказує на гіпокоагуляцію в більш пізній час (рис. 2).

Серед факторів, що сприяють порушенням у системі гемостазу, ацидоз є одним з найважливіших предикторів коагулопатії в травмованих хворих [29], до того ж збільшення проявів ацидозу підвищує ймовірність смерті [30–32]. Через 30 хв після кровопускання поряд із зазначеними порушеннями спостерігали розвиток декомпенсованого метаболічного ацидозу. На користь цього свідчили характерні зміни параметрів КЛС крові (табл. 1). Інші показники також змінювалися характерно для розвитку метаболічного ацидозу: відбувалося зменшення напруги CO_2 ,

зростав дефіцит буферних лугів (BE) в артеріальній крові. Згубними наслідками ацидозу за ГМК є порушення активності ферментів, зменшення концентрації фібриногену, подовження часу згортання крові та збільшення часу кровотечі [33].

Дані дослідження підтвердили незначну ефективність фізіологічного розчину за умов ГМК. Внаслідок швидкого переміщення з судинного русла в інтерстиціальний простір фізіологічний розчин не може підтримувати ОЦК й адекватну гемодинаміку тривалий час після закінчення інфузії та, крім того, може викликати набряк, стимулювати діурез та порушувати водно-сольовий баланс [34]. Введення ізоволемічного об'єму



Таблиця 1

Параметри кислотно-лужного стану артеріальної крові за гострої масивної крововтрати та її поповнення

Період	Показник					
	pH	pCO ₂ , мм рт. ст.	HCO ₃ , ммоль/л	O ₂ SA, %	BE, ммоль/л	BB, ммоль/л
Початкова величина (n = 8)	7,465 ± 0,003	38,62 ± 0,60	20,52 ± 0,42	99,29 ± 0,01	-0,75 ± 0,04	46,99 ± 0,36
Гостра масивна крововтрата, 30 хв (n = 6)	7,322 ± 0,003*	34,64 ± 0,45*	18,37 ± 0,56*	90,4 ± 0,02	-2,4 ± 0,09*	39,8 ± 0,27
Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин (n = 6)	7,333 ± 0,004*	36,5 ± 0,24**	19,4 ± 0,44	98,5 ± 0,03#	-5,4 ± 0,06**	42,5 ± 0,38**
Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 6)	7,442 ± 0,003#	35,64 ± 0,29	24,21 ± 0,28	99,34 ± 0,02#	1,30 ± 0,07#	49,34 ± 0,41#

Примітка. Тут і в табл. 3: *p < 0,05 порівняно з початковою величиною; **p < 0,05 порівняно з групою ГМК.

фізіологічного розчину через 5 хв після крововтрати призводило до майже повного відновлення величини САТ на момент закінчення інфузії. Однак, починаючи з 20 хв спостереження, відбувалося зниження САТ, величина якого досягала критичних значень (табл. 2). З 8 тварин цієї групи до кінця періоду спостереження вижили 5. Поповнення крововтрати фізіологічним розчином на тлі вже декомпенсованого геморагічного шоку зумовлювало

лише короткочасне незначне збільшення тиску крові.

Введення ліпосомальної форми цитохрому С як через 5, так і через 30 хв після крововтрати не викликало нормалізацію САТ (табл. 2, рис. 3, 4), але на кінець періоду спостереження САТ у щурів III і V груп був значно вищий, ніж у тварин, яким вводили фізіологічний розчин. Ліпосомальна форма цитохрому С у зазначеній дозі також практично усувала зміни функціональ-

Таблиця 2

Середній артеріальний тиск після гострої масивної крововтрати та поповнення ліпохромом (% , M ± m, n = 8)

Умова		Початкова величина	Початок введення	Кінець введення	Час після введення препарату, хв			
					15	30	45	60
5 хв після крововтрати	Фізіологічний розчин	112,9 ± 1,6	25,5 ± 0,8	63,9 ± 1,2	65,7 ± 1,5	62,5 ± 1,7	44,6 ± 4,5	36,2 ± 1,2
	Ліпохром	116,4 ± 1,0	21,0 ± 0,4	52,2 ± 1,0 p < 0,05	54,6 ± 4,6 p < 0,05	48,2 ± 5,6 p < 0,05	45,0 ± 5,5 p < 0,05	48,7 ± 5,0 p < 0,05
30 хв після крововтрати	Фізіологічний розчин	127,8 ± 4,4	28,6 ± 1,5	56,3 ± 2,1	35,4 ± 3,1	32,6 ± 4,3	30,5 ± 2,5	29,6 ± 3,0
	Ліпохром	122,4 ± 1,9	21,3 ± 0,7	110,4 ± 2,3 p < 0,05	84,6 ± 2,4 p < 0,05	50,1 ± 5,6 p < 0,05	70,7 ± 1,3 p < 0,05	54,7 ± 1,4 p < 0,05

Примітка. p – вірогідність відмінностей порівняно з показниками групи, що отримала фізіологічний розчин.

Функціональний стан системи згортання крові після гострої масивної крововтрати та її поповнення

Група тварин	Показник			
	активований парціальний тромбoplastинний час, с	протромбінний час, с	тромбіновий час, с	фібриноген, г/л
Початкова величина (n = 14)	39,4 ± 4,0	41,0 ± 3,7	47,2 ± 4,1	2,07 ± 0,02
Гостра масивна крововтрата 45 хв (n = 8)	50,4 ± 4,8	53,2 ± 5,4*	65,7 ± 6,9	1,77 ± 0,08*
Гостра масивна крововтрата + фізіологічний розчин (n = 8)	168,9 ± 12,6**	35,7 ± 0,9	65,4 ± 5,8	1,36 ± 0,08**
Гостра масивна крововтрата + ліпохром (n = 8)	23,73 ± 2,7*	39,6 ± 4,5#	48,2 ± 5,5	1,89 ± 0,08**

ного стану системи згортання крові та порушення КЛС крові (табл. 1, 3). Разом з тим, зменшення на 39,4 % АПТЧ свідчить про можливе збереження гіперкоагуляції.

Розглядаючи вплив ліпохрому на перебіг гемодинамічних порушень, викликаних ГМК, необхідно враховувати сукупну дію фосфатидилхолінових ліпосом та цитохрому С. Існує велика кількість даних літератури, що підтверджують залежність функціонування клітин, органів та організму в цілому від стану ліпідів мембран, їхнього кількісного та якісного співвідношення та змін під дією різноманітних факторів. Показано ключову роль дерегуляції обміну фосфоліпідів плазматичних мембран у розвитку пошкоджень клітин, а також змін складу фосфоліпідів мітохондріальних мембран, як одного з основних патогенетичних чинників зниження їхньої енергопродукуючої функції та посилення апоптозу клітин головного мозку за умов геморагічного шоку [35, 36].

За умов ГМК важливим маркером деградації клітинних мембран є втрата фосфатидилхоліну, що на початковому етапі може пояснюватися активізацією процесів перекисного окиснення ліпідів і надходженням у кров катехоламі-

нів, стимулюючих розпад фосфатидилхоліну, а в пізнішому періоді особливу вагу може набувати дефіцит холіну, що призводить до порушення синтезу фосфатидилхоліну в печінці. Накопичення лізоформ фосфоліпідів (лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), лізофосфатидилетаноламіну та лізофосфатидилсерину) у мембранних структурах свідчить про гіперактивацію фосфоліпаз, недостатню швидкість реакціювання та зменшення активності лізофосфоліпаз [37]. ЛФХ має вазоактивні властивості, пригнічує ендотелій-залежну релаксацію артерій, порушує ендотелій-залежний вазомоторний контроль і спричиняє модулюючий вплив на гормони й агоністи, проведення сигналу від яких здійснюється через певні G-білки й активацію протеїнкінази С [38–40]. Цей фосфоліпід впливає на агрегацію тромбоцитів, індукує експресію генів ростових факторів, включених в атерогенез і запальні процеси [41, 42], регулює експресію молекул адгезії ендотеліоцитами [43, 44]. Таким чином він сприяє подальшому зниженню реологічних властивостей крові та розвитку сладж-синдрому. За рахунок наявності в ЛФХ гідрофільної групи та великої гідрофобної групи він порушує структуру клітинної мембрани, змінюючи її фазовий стан, що,

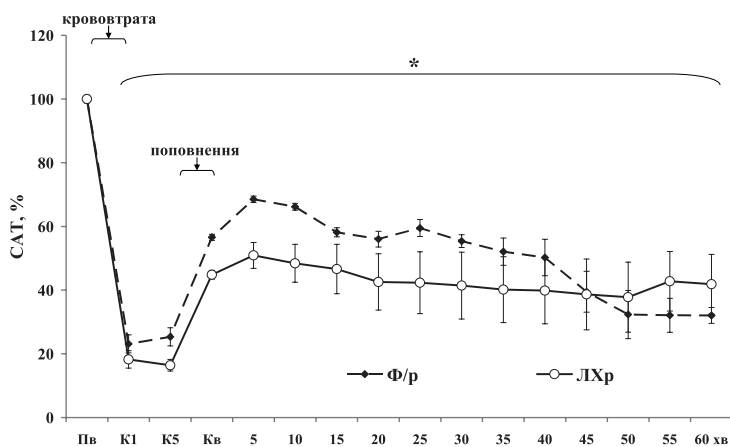


Рис. 3. Зміни середнього артеріального тиску за гострої масивної крововтрати та введення ліпохрому через 5 хв

Примітка. Пв – початкова величина; K1–K5 – час після крововтрати, Kв – кінець введення ліпохрому, *вірогідна відмінність порівняно з початковою величиною.

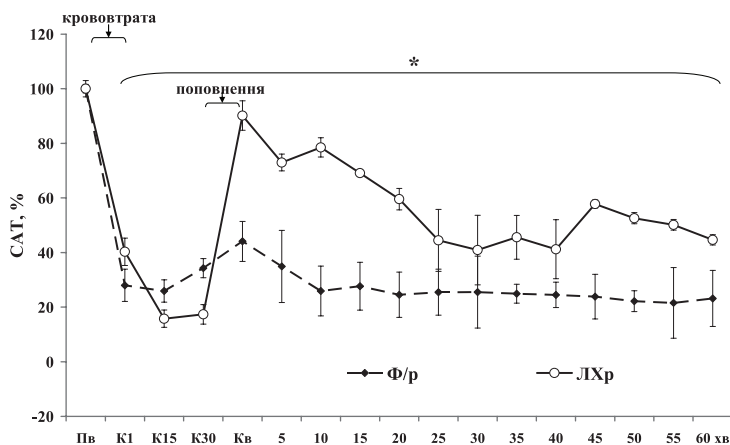


Рис. 4. Зміни середнього артеріального тиску за гострої масивної крововтрати та введення ліпохрому через 30 хв

Примітка. Пв – початкова величина, K1–K30 – час після крововтрати, Kв – кінець введення ліпохрому, *вірогідна відмінність порівняно з початковою величиною.

в свою чергу, впливає на функціональну активність мембранних білків [45, 46]. Нещодавно на еритроцитах людини було продемонстровано захисну дію блокатора фосфоліпази A2, що забезпечує синтез ЛФХ за умов оксидативного стресу, та підтверджено роль L- α -ЛФХ як фактора пошкодження клітинних мембран [47]. Введення препарату саме в ліпосомальній формі за умов геморагічного шоку запобігає накопиченню ЛФХ у клітинних мембранних структурах та відновлює вміст фосфатидилхоліну та

фосфатидилінозиту в плазматичних мембранах клітин печінки та головного мозку [35, 48].

Цитохром С – гемопротейн, що містить гем типу С, є необхідним компонентом дихального ланцюга [49]. Здатність перехоплювати та знешкоджувати активні форми кисню зумовлює застосування цитохрому С для терапії метаболічних порушень за гострого коронарного синдрому [50, 51], порушень мозкового кровообігу [52], атеросклеротичного ураження периферичних судин, хронічної дихальної недо-

статності [53], залізодефіцитної анемії [54] та інших патологічних станів, пов'язаних з гіпоксією. Цитохром С виходить з мітохондрій за ішемічного пошкодження, а екзогенний цитохром може його замінювати [55]. Мітохондрії, що втратили ендогенний цитохром С, поглинають екзогенну субстанцію та відновлюють дихальну та фосфорилуючу активність, підтримуючи енергетичний баланс клітини [50].

Перспективи застосування ліпохому за умов ГМК зумовлені здатністю цієї композиції впливати на взаємопов'язані та взаємозумовлені механізми, що активуються в разі гострої крововтрати, а саме: гіпоксія тканин, активізація процесів вільнорадикального окиснення, пригнічення енергетичного метаболізму, що посилює розладнання центрального та периферичного кровообігу та, зрештою, призводить до розвитку поліорганної недостатності [56, 57]. Підтримання артеріального тиску та нормалізація КЛС за крововтрати після інфузії ліпосомальної форми цитохрому С підтверджує доцільність подальшого вивчення можливостей корекції ГМК за допомогою ліпохому.

Висновки

Кровопопускання з загальної сонної артерії в об'ємі 2,5 мл/100 г зі швидкістю 2 мл/хв викликає розвиток геморагічного шоку, який характеризується вираженою гіпотонією, декомпенсованим метаболічним ацидозом, розвитком ДВЗ-синдрому в стадії гіпокоагуляції, що призводило до загибелі тварин протягом $(49,7 \pm 4,4)$ хв. Розвиток шоку супроводжується різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому періоді спостерігаються ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому.

Вивчення доцільності застосування ліпосомальної форми цитохрому С за ГМК з метою корекції гемодинамічних порушень показало, що введення ліпохому в ізоволемічному об'ємі фізіологічного розчину через 30 хв після крововтрати спричиняє помірну гемодинамічну дію та не допускає виникнення декомпенсованого метаболічного ацидозу. Застосування ліпохому після ГМК запобігає розвитку ДВЗ-синдрому.

Доцільність використання ліпосомальної форми цитохрому С для корекції порушень гемодинаміки та гемостазу за ГМК потребує подальшого вивчення.

1. Клигуненко О. М. Вплив якісних та кількісних змін поповнення крововтрати на прояви синдрому поліорганної недостатності при політравмі / О. М. Клигуненко, Д. А. Кріштафор, І. О. Йовенко // Медицина неотложных состояний. – 2017. – № 5 (84). – С. 91–99.
2. Minimizing Preventable Trauma Deaths in a Limited Resource Setting: A Test-Case of a Multidisciplinary Panel Review Approach at the Komfo Anokye Teaching Hospital in Ghana / D. Yeboah, C. Mock, P. Karikari [et al.] // World Journal of Surgery. – 2014. – № 38 (7). – P. 1707–1712.
3. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review / A. Fülöp, Z. Turóczi, D. Garbaisz [et al.] // European Surgical Research. – 2013. – № 50. – P. 57–70.
4. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation / M. Levi, C. H. Toh, J. Thachil, H. G. Watson // British Journal of Haematology. – 2009. – № 145. – P. 24–33.
5. Aljedani H. M. Literature Review for Management of Massive Hemorrhage [Електронний ресурс] / Aljedani H. M., Anwar F. // Hematology & Transfusion International Journal. – 2016. – V. 2, Iss. 3. – 8 p. Режим доступу: <http://medcraveonline.com/HTIJ/HTIJ-02-00036.pdf>.
6. Hayakawa M. Pathophysiology of trauma-induced coagulopathy: disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype / M. Hayakawa // Journal of Intensive Care. – 2017. – V. 5 (14). – [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186%2Fs40560-016-0200-1.pdf>.
7. Hayakawa M. Management of disseminated intravascular coagulation: current insights on anti-thrombin and thrombomodulin treatments / M. Hayakawa // Open Access Emergency Medicine. – 2018. – V. 10. – P. 25–29.
8. Blood Component Therapy and Coagulopathy in Trauma: A Systematic Review of the Literature from the Trauma Update Group / D. Poole, A. Cortegiani, A. Chiericato [et al.]. <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1513/AnnalsATS.201308-280OC-aff2> // PLoS One. – 2016. – V. 11 (10). – p. e0164090.
9. Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition / Writing Committee and the Members of the ARDS Definition Task Force // JAMA. – 2012. – V. 307 (23). – P. 2526–2533.
10. Heterogeneous Phenotypes of Acute Respiratory Distress Syndrome after Major Trauma / J. P. Reilly, S. Bellamy, M. G. S. Shashaty [et al.]. <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1513/AnnalsATS.201308-280OC-aff2> // Annals of the American Thoracic Society. – 2014. – V. 11, Iss. 5. – P. 728–736.

11. An approach to transfusion and hemorrhage in trauma: current perspectives on restrictive transfusion strategies / H. Tien, B. Nascimento, J. Callum, S. Rizoli // *Canadian Journal of Surgery*. – 2007. – V. 50. – P. 202–209.
12. The role of vasoactive agents in the resuscitation of microvascular perfusion and tissue oxygenation in critically ill patients / E. Ch. Boerma, C. Ince // *Intensive Care Medicine*. – 2010. – V. 36 (12). – P. 2004–2018.
13. *Johansson P. I.* Current management of massive hemorrhage in trauma [Електронний ресурс] / Pär I. Johansson, J. Stensballe, S. R. Ostrowski // *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. – 2012. – V. 20 (47). – 10 p. – Режим доступу до журналу : <http://www.sjtre.com/content/20/1/47>.
14. *Chang R.* Optimal Fluid Therapy for Traumatic Hemorrhagic Shock / R. Chang, J. B. Holcomb // *Critical Care Clinics*. – 2017. – V. 33 (1). – P. 15–36.
15. Low Tissue Oxygen Saturation Is Associated with Requirements for Transfusion in the Rural Trauma Population / M. Khasawneh, M. Zielinski, D. Jenkins [et al.] // *World Journal of Surgery*. – 2014. – V. 38 (8). – P. 1892–1897.
16. Long-Term Outcomes of Patients Receiving Massive Transfusion After Trauma / B. Mitra, B. J. Gabbe, K.-M. Kaukonen [et al.] // *Shock*. – 2014. – V. 42 (4). – P. 307–312.
17. Хромов О. С. Корекція за допомогою ліпосом (ліпіну) порушень центральної гемодинаміки у щурів під час геморагічного шоку / О. С. Хромов, О. В. Стефанов // *Ліки*. – 1995. – № 4. – С. 54–60.
18. *Khromov A. S.* Correction of circulatory and metabolic disorders by phosphatidilcholine liposomes in rats with hemorrhagic shock / A. S. Khromov, A. V. Stefanov // *Hypoxia Medical*. – 2005. – V. 13, № 1–2. – P. 10–14.
19. Хромов О. С. Протигіпоксична та антиоксидантна дія різних фосфоліпідів у ліпосомальній формі / О. С. Хромов, О. В. Стефанов // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2010. – № 5 (18). – С. 24–32.
20. *Андріянова И. Г.* Результаты клинического применения препарата ЦИТОХРОМ С / И. Г. Андріянова, Н. Д. Сидорова, Е. А. Селиванов // *Поликлиника*. – 2011. – № 1. – С. 39–41.
21. Патент РФ № 2110990 (A61K9/127) Липосомальная везикула с цитохромом С / А. И. Шанская, Б. И. Криворучко, Е. В. Булушева [и др.]. – 20.05.1998.
22. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2006. – № 27. – С. 990, стаття 230. – (Бібліотека офіційних видань).
23. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/main?find=1&sp=i&user=c393&text=%F2%E2%E0%F0%E8%ED&x=10&y=5>.
24. *McGuill M. W.* Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques / M. W. McGill, A. N. Rowan // *ILAR J.* – 1989. – № 31 (4). – P. 5–20.
25. Experimental Trauma Models: An Update / M. Frink, H. Andruszkow, Ch. Zeckey [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2011. – 15 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2011/797383.pdf>.
26. Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review / A. Fülöp, Z. Turóczi, D. Garbaisz [et al.] // *European Surgical Research*. – 2013. – № 50. – P. 57–70.
27. *Hunt B. J.* Bleeding and coagulopathies in critical care / B. J. Hunt // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – V. 370. – P. 847–859.
28. *Баркаган З. С.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – Москва : Ньюдиамед, 2001. – 296 с.
29. *Peng N.* Progresses in understanding trauma-induced coagulopathy and the underlying mechanism / N. Peng, L. Su // *Chinese Journal of Traumatology*. – 2017. – V. 20 (3). – P. 133–136.
30. Updates in the management of severe coagulopathy in trauma patients / M. Lynn, I. Jeroukhimov, Y. Klein, U. Martinowitz // *Intensive Care Med*. – 2002. – № 28, Suppl 2. – P. S241–247.
31. *Mikhail J.* The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy / J. Mikhail // *AACN Clin Issues Crit Care Nurs*. – 1999. – № 10. – P. 85–94.
32. *Moore F. A.* The next generation in shock resuscitation / F. A. Moore, B. A. McKinley, E. E. Moore // *Lancet* 2004. – № 363. – P. 1988–1996.
33. *Martini W. Z.* The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine / W. Z. Martini // *Metabolism*. – 2007. – № 56. – P. 214–221.
34. Нужно ли усовершенствовать технологии кровезамещения? / В. П. Шано, И. В. Гуменюк, И. В. Струкова, Е. З. Губиева // *Острые и неотложные состояния в практике врача*. – 2012. – № 2–3. – С. 25–33.
35. *Лескова Г. Ф.* Изменения состава фосфолипидов плазматических мембран кардиомиоцитов при геморагическом шоке / Г. Ф. Лескова, Г. Н. Крыжановский // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2011. – Т. 151, № 3. – С. 255–258.
36. *Лескова Г. Ф.* Изменения состава мембранных фосфолипидов в патогенезе нарушений функций митохондрий головного мозга при геморагическом шоке у кошек / Г. Ф. Лескова // *Патогенез*. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 17–20.

37. Андреева Н. Н. Состояние липидного обмена жизненно важных органов в постреперфузионном периоде и его модификация антигипоксантами : автореф. дис. на соискание науч. степени доктора биол. наук : спец. ВАК РФ 03.00.13 «Физиология» / Н. Н. Андреева. – Нижний Новгород, 2007 – 36 с.
38. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins / K. Kugiyama, S. A. Kerns, J. D. Morrisett [et al.] // *Nature*. – 1990. – V. 344. – P. 160–162.
39. Kobayashi T. Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats / T. Kobayashi, T. Matsumoto, K. Kamata // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – V. 131. – P. 231–238.
40. Suenaga H. Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses in rat aorta via activation of tyrosine kinase / H. Suenaga, K. Kamata // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 35. – P. 789–799.
41. Colles S. M. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events / S. M. Colles, Guy M. Chisolm // *The Journal of Lipid Research*. – 2000. – V. 41. – P. 1188–1198.
42. DFMG reverses proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by co-culture with injured vascular endothelial cells via suppression of the TLR4-mediated signaling pathway / L. Cong, Y. Zhang, H. Huang [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – V. 17 (4). – P. 5692–5699.
43. Kume N. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells / N. Kume, M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Jr // *J. Clin. Invest.* – 1992. – V. 90. – P. 1138–1144.
44. Братусь В. В. Воспаление и проатерогенные нарушения обмена липопротеинов: взаимосвязь и причинно-следственная зависимость / В. В. Братусь // *Украинский ревматологический журнал*. – 2002. – Т. 7, № 1. – С. 13–22.
45. Проказова Н. В. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки / Н. В. Проказова, Н. Д. Звездина, А. А. Коротаева // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63, № 1. – С. 38–46.
46. Schneider R. The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins / R. Schneider, A. Toulmay // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 73, Iss. 6. – P. 1224–1232.
47. Protective effects of TES trioleate, an inhibitor of phospholipase A2, on reactive oxygen species and UVA-induced cell damage / S. N. Park, M. J. Kim, J. H. Ha [et al.] // *J. Photochem Photobiol B*. – 2016. – V. 164. – P. 30–35.
48. Лечебное воздействие липосом при геморрагическом шоке (экспериментальное исследование) / Г. Ф. Лескова, Г. Н. Крыжановский, В. И. Швец, Ю. М. Краснополянский // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2012. – № 4. – С. 88–93.
49. Addition and Correction to Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog / D. Alvarez-Paggi, L. Hannibal, M. A. Castro [et al.] // *Chem. Rev.* – 2017. – V. 117 (23). – P. 14014–14014.
50. Ващенко В. И. Цитохром С как лекарственное средство: прошлое, настоящее, будущее / В. И. Ващенко, К. П. Хансон, П. Д. Шабанов // *Обзор клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 27–37.
51. Транзиторные нарушения сердечно-сосудистой системы у новорожденных / А. В. Сукало, А. К. Ткаченко, Е. К. Хрусталева [и др.] // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2015. – № 3. – С. 5–11.
52. Зинченко В. А. Цитохром С в комплексной терапии больных с нарушением мозгового и коронарного кровообращения / В. А. Зинченко, Н. Д. Сидорова // *Клиническая мед.* – 1985. – Т. 63, № 9. – С. 49–51.
53. Туранов М. Ю. Цитохром С в терапии дыхательной недостаточности у больных хроническим бронхитом / М. Ю. Туранов // *Дыхательная недостаточность. Сборник научных трудов ММСИ*. – Москва, 1986. – С. 83–85.
54. Садфуранова Г. Ш. Эффективность железотерапии и комбинированного лечения больных железодефицитной анемией применением цитохрома С / Г. Ш. Садфуранова // *Анемия и анемические синдромы*. – 1991. – С. 92–98.
55. Бриккер В. Н. Применение цитохрома С для предупреждения фибрилляции желудочков при острой коронарной недостаточности в эксперименте и его влияние на дыхательную активность миокарда / В. Н. Бриккер, Е. И. Вольперт, И. Е. Ганелина // *Кардиология*. – 1970. – № 3. – С. 91–95.
56. Ramírez M. Multiple Organ Dysfunction Syndrome / M. Ramírez // *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. – 2013. – V. 43 (10). – P. 273–277.
57. Rendy L. Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) prediction score in multi-trauma patients / L. Rendy, H. B. Sapan, L. T. B. Kalesaran // *International Journal of Surgery Open*. – 2017. – V. 8. – P. 1–6.

Н. В. Добреля, Н. С. Гула, Т. А. Карацуба, О. С. Хромов

Перспективи використання ліпосомальної форми цитохрому С для поповнення гострої масивної крововтрати

Мета дослідження – вивчити вплив ліпосомальної форми цитохрому С (ліпохрому) на артеріальний тиск та гемостаз за умов гострої масивної крововтрати (ГМК).

Проведені дослідження показали, що ГМК з загальної сонної артерії в об'ємі 35 % від об'єму циркулюючої крові викликає розвиток декомпенсованого геморагічного шоку, що характеризується

вираженою гіповолемією та загибеллю тварин протягом $(49,7 \pm 4,4)$ хв. Розвиток шоку супроводжується різноспрямованими змінами коагуляційного гемостазу: у ранньому періоді спостерігаються ознаки гіпер-, а на пізніх етапах – гіпокоагуляції, що слід розцінювати як початок ДВЗ-синдрому. Спостерігався розвиток субкомпенсованого метаболічного ацидозу зі зменшенням напруги CO_2 та дефіцит буферних лугів в артеріальній крові.

Введення ліпосомальної форми цитохрому С в ізоволемічному об'ємі фізіологічного розчину через 5 хв після ГМК не викликало нормалізацію середнього артеріального тиску.

Введення ліпохрому через 30 хв після крововтрати призводило до 100 % виживання тварин упродовж всього періоду спостереження (60 хв), супроводжувалось вираженою стабілізацією гемодинаміки та значною мірою сприяло усуненню порушень гемостазу та запобігало розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу.

Доцільність використання ліпосомальної форми цитохрому С за гострої масивної крововтрати потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: гостра масивна крововтрата, ліпосомальна форма цитохрому С

A. C. Хромов, Н. В. Добреля, Н. С. Гула, Т. А. Карацуба
Перспективы использования липосомальной формы цитохрома С при восполнении острой массивной кровопотери

Цель исследования – изучить влияние липосомальной формы цитохрома С (липохрома) на артериальное давление и гемостаз при острой массивной кровопотере (ОМК).

Проведенные исследования показали, что ОМК из общей сонной артерии в объеме 35 % от объема циркулирующей крови вызывает развитие декомпенсированного геморрагического шока, характеризующегося выраженной гиповолемией и гибелью животных в течение $(49,7 \pm 4,4)$ мин. Развитие шока сопровождается разнонаправленными изменениями коагуляционного гемостазу: в раннем периоде наблюдаются признаки гипер-, а на поздних этапах – гипкоагуляции, что следует расценивать как начало ДВС-синдрома. Наблюдалось развитие субкомпенсированного метаболического ацидоза с уменьшением напряжения CO_2 и дефицитом буферных оснований в артериальной крови.

Введение липосомальной формы цитохрома С в изоволемическом объеме физиологического раствора через 5 мин после ОМК не вызвало нормализацию среднего артериального давления.

Введение липохрома через 30 мин после кровопотери приводило к 100 % выживаемости животных в течение всего периода наблюдения (60 мин), сопровождалось выраженной стабилизацией гемодинамики, способствовало устранению нарушений гемостазу и предотвращало развитие декомпенсированного метаболического ацидоза.

Целесообразность использования липосомальной формы цитохрома С при острой массивной кровопотере требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: острая массивная кровопотеря, липосомальная форма цитохрома С

N. V. Dobrelya, N. S. Gula, T. A. Karazuba, O. S. Khromov
Prospects of using the liposome encapsulated cytochrome C at replenishment of acute massive hemorrhage

This study was aimed to investigate a haemostatic activity and correction of hemodynamic disorders of the liposome encapsulated cytochrome C (Lipochrom) in acute massive blood loss.

The received data showed that acute massive exsanguination from the common carotid artery above 35 % of blood volume resulted to the development of decompensated hemorrhagic shock with lowering of blood pressure accompanied by death of the animals within 49 min. The shock development was accompanied with the multidirectional changes in coagulation haemostasis: hypercoagulation in the early period and hypocoagulation in the later stages, which should be regarded as the onset of disseminated intravascular coagulation (DIC). The subcompensated metabolic acidosis was developed with decrease in CO_2 tension and lack of buffer bases in the arterial blood.

Infusion of the liposome encapsulated cytochrome C in saline isovolumic volume 5 min after hemorrhage does not have significant hemodynamic effects.

Infusion of the lipochrom 30 min after hemorrhage led to 100 % survival of animals throughout the follow-up period (60 min), has essential hemodynamic effects and contributed significantly to the elimination of hemostasis disorders, and prevents the development of decompensated metabolic acidosis.

An expediency of use of the liposome encapsulated cytochrome C in acute massive hemorrhage requires further studies.

Key words: acute massive blood loss, liposome encapsulated cytochrome C

Надійшла: 7 березня 2018 р.

Контактна особа: Хромов Олександр Станіславович, науковий співробітник, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057.
Тел.: + 38 0 44 456 02 88. E-mail: askhromov@ukr.net

І. В. Іванова, М. І. Мельник, А. І. Соловійов

Розвиток експериментального цукрового діабету пригнічує загальну калієву провідність у гладеньком'язових клітинах аорти, але збільшує її в клітинах легеневої артерії щурів

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

Ключові слова: цукровий діабет, аорта, легенева артерія, плазматична мембрана гладеньком'язових клітин, Ca^{2+} -активовані K^{+} -канали великої провідності (BK_{Ca})

Відомо, що серед основних причин смертності та втрати працездатності населення України та всього світу найпоширенішими залишаються судинні ускладнення, що викликані цукровим діабетом (ЦД). ЦД здатен підвищувати ризик виникнення судинних порушень, що призводять до гострого інфаркту міокарда, атеросклерозу, артеріальної гіпертензії, інсульту, гангрені нижніх кінцівок, атеротромбозу та ін. Було показано, що ураження судин за ЦД обумовлено порушенням утилізації глюкози, оскільки її високі концентрації в плазмі крові сприяють підвищенню проникності судинної стінки для інтерстиціальної рідини та електролітів [1]. За умов ЦД в основному відзначається ураження артерій, у першу чергу, дрібного діаметра, так звані мікроангіопатії. За прогресування процесу метаболічні порушення в сукупності з додатковими факторами спричиняють ураження великих судин [2].

За результатами деяких досліджень є вагомі причини припускати, що ЦД може значною мірою впливати на легеневу мікроциркуляцію, збільшуючи товщину стінки легеневих судин, змінюючи їхній тонус та скоротливість і порушуючи газообмін у легенях, що призводить до помітної втрати легеневої функції та дихальної ефективності [3]. Крім того, в експериментах на тваринах було продемонстровано, що діабет відіграє одну з головних ролей у

розвитку легеневої гіпертензії через прямий вплив гіперглікемії на легеневі судини [4, 5].

Калієві канали відіграють важливу роль у формуванні потенціалу спокою гладеньком'язових клітин (ГМК) судин та регуляції їхнього скорочення. Пригнічення активності K^{+} -каналів у судинних ГМК зумовлює деполяризацію клітинної мембрани та підвищення зростання внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), викликаючи скорочення ГМК та, внаслідок цього, звуження кровоносних судин [6]. Серед чисельних типів K^{+} -каналів, що представлені в ГМК різних типів кровоносних судин, переважаючими для більшості артерій є Ca^{2+} -активовані K^{+} -канали великої провідності (BK_{Ca}), які здійснюють суттєвий вплив на регуляцію судинного тонусу через їхнє залучення до формування змін мембранного потенціалу ГМК [6–8]. BK_{Ca} -канали експресовані в усіх типах судинних ГМК, відіграючи основну роль у процесі гіперполяризації плазматичної мембрани ГМК з наступною вазодилатацією [7]. Існують дані, що активність BK_{Ca} -каналів може бути знижена за умов діабету [9]. Оскільки BK_{Ca} мають високу чутливість як до $[\text{Ca}^{2+}]_i$, так і до мембранного потенціалу, їхня дисфункція може відігравати важливу роль у патогенезі великої кількості судинних порушень, включаючи й судинні ускладнення за умов ЦД [8, 10–15].

Лікарські препарати, що застосовуються для лікування ЦД (β -блокатори, інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту, Ca^{2+} -блокатори, діуретики тощо), є симптоматичними, і питання

лікування судинних ускладнень цієї хвороби залишається досі відкритим. Тому встановлення механізмів розвитку дисфункції судин за умов розвитку ЦД і визначення основних мішеней впливу може відкрити перспективи для створення нових шляхів для її фармакологічної корекції.

Мета дослідження – встановити можливі зміни активності калієвих каналів плазматичної мембрани ГМК судин великого (аорти) та малого (основної легеневої артерії) кіл кровообігу за умов розвитку експериментального ЦД у щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили з використанням свіжо-ізолюваних ГМК аорти та основної легеневої артерії (ЛА) самців щурів лінії Wistar масою 170–220 г. Декапітацію тварин здійснювали після попередньої анестезії фенobarбіталом натрію (50 мг/кг). Усі досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції з захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях. У тварин видаляли судини, очищали їх від жирової та сполучної тканин, нарізали на сегменти розміром (1,5 × 3) мм, які поміщали в розчин, що містив (у ммоль/л): 120 NaCl; 6 KCl; 12 глюкози, 10 HEPES; а також 1 мг/мл папаїну (11,55 U/mg), 1 мг/мл dithiothreitol та 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну. Сегменти інкубувались у термостаті (+37 °C) протягом 22 хв, після чого їх переносили в розчин аналогічного складу, але який містив 1,5 мг/мл колагенази (тип IA) замість папаїну. Тканини інкубувались у термостаті (+ 37 °C) ще протягом 15 хв, після чого їх відмивали від ферментів у безкальцієвому розчині та виділяли клітини шляхом багаторазового піпетування. Аліквоти отриманих ізолюваних ГМК поміщали в розчин з нормальною концентрацією Ca^{2+} , що містив (у ммоль/л): 120 NaCl; 6 KCl; 1,2 MgCl_2 ; 2,5 CaCl_2 ; 10 HEPES; 12 глюкози; (pH = 7,4). Трансмембранні іонні струми досліджувались методом patch-clamp у конфігурації whole-cell. Фіксацію потенціалу та реєстрацію струмів здійснювали за допомогою підсилювача Axopatch 200B та аналого-цифрового перетворювача Digidata 1200B (“Axon

Instruments”, США). Результати аналізували за допомогою програми pCLAMP 9.0 та Origin 7.5. Складі електроди для вимірювання трансмембранного струму виготовляли із боросилікатних скляних капілярів. Електроди, що мали опір 2,5–5,0 МОм, заповнювали розчином наступного складу (в ммоль/л): 130 KCl; 1 Na_2ATP ; 1 MgATP ; 0,3 EGTA; 10 глюкоза, 10 HEPES; pH 7,3.

Діабет у щурів був індукований за загальноприйнятим методом одноразовою внутрішньоочеревинною ін’єкцією стрептозотоцину (STZ), який є селективно токсичним відносно до бета-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, у концентрації (60–65) мг/кг [16]. Визначення експериментального діабету проводили за наявністю гіперглікемії. Концентрацію глюкози в плазмі крові вимірювали через 30 діб після ін’єкції STZ і в день експерименту в досліджуваних тварин усіх груп. STZ розчиняли в цитратному буферному розчині, який містив 9 % NaCl та 10 ммоль/л цитрату (pH = 4,6). Концентрацію глюкози визначали за допомогою глюкометра Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

Отримані результати обробляли математично за методом варіаційної статистики за допомогою комп’ютерної програми Origin 7.5 зі знаходженням середнього арифметичного та стандартної помилки середнього значення ($M \pm m$). Порівняння вибірок проводили за критерієм t-Стюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

Результати та їх обговорення. Одноразове внутрішньоочеревинне введення щурам STZ (65 мг/кг) викликало хронічну гіперглікемію. Цей показник було використано для верифікації розвитку ЦД. До початку індукції ЦД рівень глюкози в крові щурів становив ($5,83 \pm 0,14$) ммоль/л, $n = 15$. На день експерименту (60–70 діб) у крові діабетичних тварин він складав ($27,3 \pm 3,6$) ммоль/л, $P < 0,001$ порівняно зі щурами контрольної групи: ($6,2 \pm 0,4$) ммоль/л, $n = 15$.

У відповідь на ступінчасту деполяризацію плазматичної мембрани ГМК від -100 до +70 мВ через кожні 3 с за під-

тримуваного потенціалу -60 мВ було зафіксовано сумарний вихідний струм. Отримані дані показали, що в плазматичних мембранах ГМК аорти щурів розвиток експериментального ЦД значно знижував амплітуду щільності струму. Як демонструють криві вольтамперних характеристик, вірогідне зниження величини струму в ГМК аорти тварин з STZ-індукованим ЦД спостерігали за більш позитивних потенціалів, ніж $+10\text{ мВ}$, а при максимальному рівні деполяризації мембрани ($+70\text{ мВ}$) його щільність становила $40,2\text{ пА/пФ} \pm 3,6\text{ пА/пФ}$ порівняно з контролем, який становив $(84,7 \pm 5,1)\text{ пА/пФ}$ ($n = 8$, $P < 0,001$; рис. 1 А).

У той самий час величина трансмембранних іонних струмів у ГМК ЛА тварин з STZ-індукованим ЦД, навпаки, значно зростала за потенціалів вище,

ніж -20 мВ та в разі $+70\text{ мВ}$ досягала $(234,4 \pm 17,6)\text{ пА/пФ}$ порівняно з контролем, що складав $(85,1 \pm 6,3)\text{ пА/пФ}$ ($n = 7$, $P < 0,001$; рис. 1 Б).

Дія на ГМК аорти селективного блокатора ВК_{Ca} -каналів паксиліну (ПК, $5 \cdot 10^{-7}\text{ моль/л}$) вірогідно зменшувала амплітуду сумарного вихідного струму в контролі за потенціалів вище, ніж $+10\text{ мВ}$, знижуючись за $+70\text{ мВ}$ до $(27,3 \pm 1,8)\text{ пА/пФ}$ ($n = 8$, $P < 0,001$; рис. 2 А). За умов ЦД вплив ПК, навпаки, змінював щільність сумарного вихідного струму в значно меншому ступені: його величина зменшувалась лише за максимальної деполяризації мембрани ($+70\text{ мВ}$) до $(29,5 \pm 3,3)\text{ пА/пФ}$ ($n = 8$, $P < 0,05$, рис. 2 Б). За дії ПК на ГМК ЛА як контрольних щурів, так і щурів з ЦД величина трансмембранного K^+ -струму за $+70\text{ мВ}$ достовірно зменшувалась до $(56,1 \pm 5,5)\text{ пА/пФ}$ та до $(166,9 \pm 14,8)\text{ пА/пФ}$ відповідно (рис. 3 А і рис. 3 Б).

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що ЦД викликає значне пригнічення амплітуди калієвих струмів через плазматичну мембрану ГМК аорти щурів, що проявляється зниженням провідності через її канали. Це може бути одним з факторів, що можуть призвести до зменшення вазодилаторного потенціалу та розвитку гіпертонусу стінки судин внаслідок розвитку ЦД.

Результати також показали, що найбільшою складовою частиною сумарного вихідного струму ГМК аорти здорових щурів є його паксилін-чутливий компонент, тобто струм через ВК_{Ca} -канали, величина якого була значно знижена за ЦД. Тобто, можна припустити, що пригнічення щільності загального вихідного струму за умов ЦД відбувається за рахунок різкого зменшення активності ВК_{Ca} -каналів. Зниження величини ВК_{Ca} -струму в ГМК діабетичних тварин було також показано й у деяких дослідженнях на інших типах судин: ГМК брижових артерій щурів, артеріол сітківки щурів і коронарних артерій мишей [15, 17–19]. Пригнічення амплітуди калієвих струмів у судинних ГМК за умов ЦД може бути наслідком зниження активності потенціал-

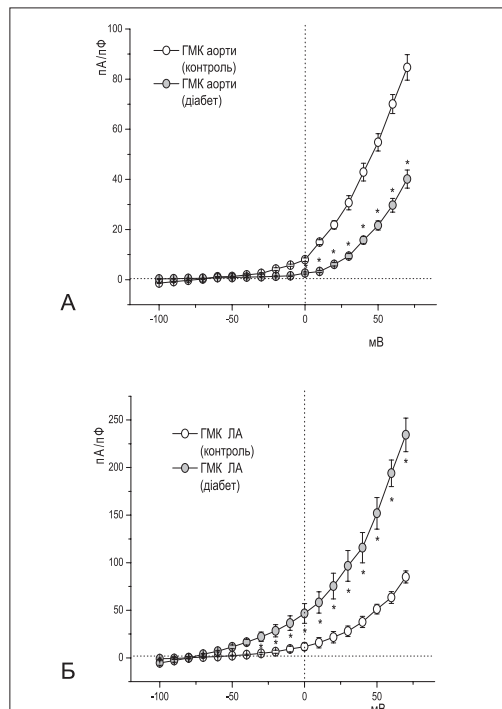
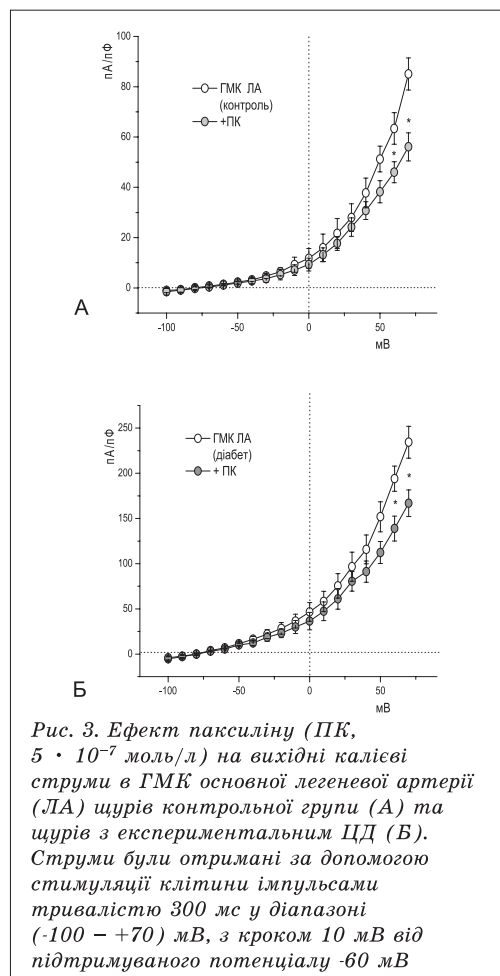
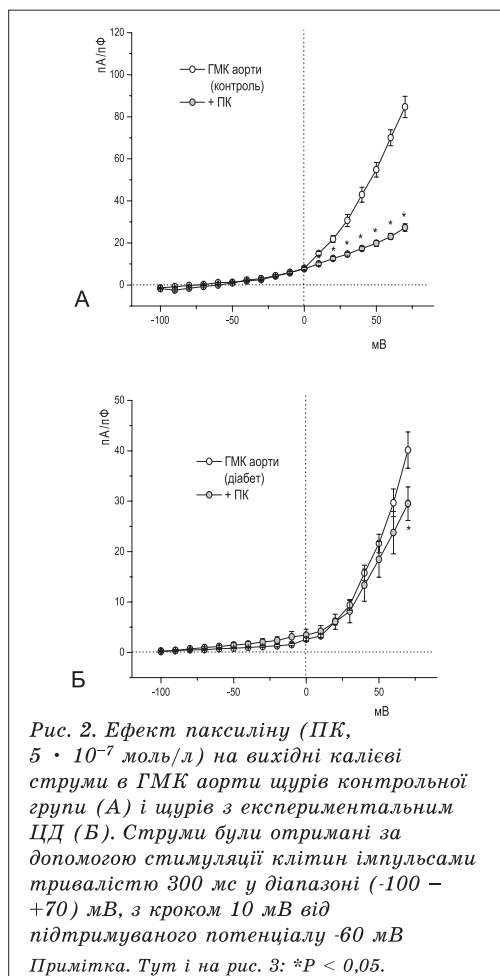


Рис. 1. Вольт-амперні характеристики сумарних вихідних струмів через плазматичну мембрану ГМК аорти (А) та основних легеневих артерій (Б) здорових щурів (контроль) і щурів з експериментальним ЦД (діабет). Струми були отримані за допомогою стимуляції клітин імпульсами тривалістю 300 мс у діапазоні від $(-100\text{ до }+70)\text{ мВ}$, з кроком 10 мВ від підтримуваного потенціалу -60 мВ . Примітка. * $P < 0,05$ порівняно з контролем.



залежних Ca^{2+} -каналів L-типу і, відповідно, вхідного Ca^{2+} -струму, який саме й обумовлює активацію BK_{Ca} -каналів [20].

Аналіз даних дослідження свідчить, що, на відміну ГМК аорти, у ГМК ЛА активність BK_{Ca} -каналів не змінювалась за умов діабету, незважаючи на те, що загальний K^{+} -струм значно зростає. Показано також, що трансмембранний струм через BK_{Ca} -канали в ГМК ЛА був виражений у значно меншому ступені порівняно з цим параметром аортальних ГМК, що може бути наслідком зниженої активності β_1 -субодиниці в BK_{Ca} -каналах ЛА [21].

Результати дослідження демонструють, що значне підвищення величини щільності K^{+} -струму не пов'язане з активацією BK_{Ca} -каналів, а отже, причиною цього феномена можуть бути зміни активності інших типів

K^{+} -каналів. Проблема впливу ЦД на ЛА сьогодні вивчена недостатньо, отже досить складно припустити, K^{+} -канали саме якого типу активуються. Відомо, що крім BK_{Ca} -каналів, у ГМК ЛА у достатній мірі експресовані потенціал-залежні K^{+} -канали (K_v), яким притаманне значне пригнічення своєї функціональної активності в ГМК ЛА за розвитку таких судинних порушень, як легенева гіпертензія та хронічна гіпоксія [22–25], у той час як BK_{Ca} -канали за цих умов характеризуються підвищенням експресії та провідності [26]. Проте існують дані, що за умов ЦД експресія K_v -каналів у ГМК ЛА не пригнічується [25], отже можуть бути доцільними подальші дослідження цього типу каналу щодо виявлення механізму зростання величини калієвого струму за ЦД. Разом з тим, враховуючи, що BK_{Ca} -канали виявили стійкість

до впливу ЦД, то, не зважаючи на те, що наші результати не показали зростання їхньої активності, подальші дослідження з використанням більш точних методів можуть все ж її виявити. Дослідження в цьому напрямі можуть бути найперспективнішими, оскільки саме в ГМК ЛА BK_{Ca} -канали проявляють стійкість та навіть підвищення рівня експресії за судинних розладів [26, 27].

Висновки

1. ЦД викликає значне пригнічення амплітуди калієвих струмів через плазматичну мембрану ГМК аорти щурів, що може призводити до зменшення вазодилататорного потенціалу та розвитку гіпертонусу стінки аорти.
2. Величина трансмембранних іонних струмів у ГМК ЛА тварин з ЦД різко

збільшувалася за потенціалів вище, ніж -20 мВ порівняно з контролем, що проявлялося зростанням провідності через її канали.

3. Дія на ГМК аорти селективного блокатора BK_{Ca} -каналів паксиліну (ПК, $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) вірогідно зменшувала амплітуду сумарного вихідного струму в контролі за потенціалів вище, ніж +10 мВ, у той час як за умов ЦД вплив ПК змінював щільність сумарного вихідного струму в значно меншому ступені, що свідчить про зниження активності саме BK_{Ca} -каналів.
4. За дії ПК на ГМК ЛА як контрольних щурів, так і щурів з ЦД величина трансмембранного K^{+} -струму зменшувалася за потенціалів вище, ніж +60 мВ, тобто активність BK_{Ca} -каналів за умов діабету не змінювалася порівняно з контролем.

1. Emerging risk factors collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies / N. Sarvar, P. Gaio, S. R. Seshasai [et al.] // *Lancet*. – 2010. – V. 375, № 9733. – P. 2215–2222.
2. Follow up report on the diagnosis of diabetes mellitus: The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (11 November.- 2003). *Diabetes Care*. – 2003. – V. 26, № 31. – P. 60–7.
3. Pulmonary complications in diabetes mellitus: the role of glycemic control / D. Ardigo, S. Valtuena, I. Zavaroni [et al.] // *Current drug targets-Inflammation & Allergy*. – 2004. – V. 3, № 4. – P. 455–458.
4. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation / G. Hansmann, R. A. Wagner, S. Schellong [et al.] // *Circulation*. – 2007. – V. 115 (10). – P. 1275–1284.
5. Insulin resistance in pulmonary arterial Hypertension / R. T. Zamanian, G. Hansmann, S. Snook [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – V. 33. – P. 318–324.
6. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997 / D. L. Preston, Y. Shimizu, D. A. Pierce [et al.] // *Radiation Research*. – 2003. – V. 160. – P. 381–407.
7. Nelson M. T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M. T. Nelson, J. M. Quayle // *American Journal of Physiology*. – 1995. – V. 268. – P. C799–C822.
8. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BK_{Ca} channels is attenuated in diabetic rats / A. Mori, S. Suzuki, K. Sakamoto [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2011. – V. 669, № 1–3. – P. 94–99.
9. Miller J. A. Relationship between diurnal blood pressure, renal hemodynamic function, and the renin-angiotensin system in type 1 diabetes. / J. A. Miller, J. R. Curtis, E. B. Sochett // *Diabetes*. – 2003. – V. 52, №7. – P. 1806–1811.
10. Ionizing non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in endothelial cells of coronary artery: possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation / S. Tishkin, V. Rekalov, I. Ivanova [et al.] // *International Journal of Radiation Biology*. – 2007. – V. 83. – P. 161–169.
11. Erdös B. Alterations in K_{ATP} and K_{Ca} channel function in cerebral arteries of insulin-resistant rats / B. Erdös, A. W. Miller, D. W. Busija // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – V. 283. – P. H2472–H2477.
12. Calcium-activated potassium channels contribute to human skeletal muscle microvascular endothelial dysfunction related to cardiopulmonary bypass / Y. Liu, E. W. Sellke, J. Feng [et al.] // *Surgery*. – 2008. – V. 144, № 2. – P. 239–244.
13. Soloviev A. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta BK_{Ca} channel function following ionizing irradiation / A. Soloviev, S. Tishkin, S. Kyrychenko // *Acta Physiologica Sinica*. – 2009. – V. 61, № 3. – P. 201–210.
14. Calcium-activated potassium channels contribute to human coronary microvascular dysfunction after cardioplegic arrest / J. Feng, Y. Liu, R. T. Clements [et al.] // *Circulation*. – 2008. – V. 118, Suppl. 14. – P. S46–S51.

15. Diabetes downregulates large-conductance Ca^{2+} -activated potassium β_1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle / M. K. McGahon, D. P. Dash, A. Arora [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – V. 100. – P. 703–711.
16. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats / I. V. Kizub, O. O. Pavlova, C. D. Johnson [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2010. – V. 159. – P. 1724–1731.
17. Burnham M. P. Reduced Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels from arteries of type 2 diabetic Zucker diabetic fatty rats / M. P. Burnham, I. T. Johnson, A. H. Weston // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. H1520–H1527.
18. Potassium (BK_{Ca}) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats / C. Dimitropoulou, G. Han, A.W. Miller, [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. H908–H917.
19. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone / J. Ledoux, M. E. Werner, J. E. Brayden [et al.] // *Physiology* – 2006. – V. 21, № 1. – P. 69–78.
20. Altered L-type Ca^{2+} channel currents in vascular smooth muscle cells from experimental diabetic rats / R. Wang, Y. Wu, G. Tang [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – V. 278. – P. H714–H722.
21. Distinct activity of BK channel β_1 -subunit in cerebral and pulmonary artery smooth muscle cells / Y-M. Zheng, S. W. Park, L. Stokes [et al.] // *Am J Physiol.* – 2013. – V. 304. – P. 780–789.
22. Dysfunctional voltage-gated K^+ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension / Yuan J. X-J., Aldinger A. M., Juhaszova M. [et al.] // *Circulation.* – 1998. – V. 98 (14). – P. 1400–1406.
23. Chronic hypoxia inhibits K_v channel gene expression in rat distal pulmonary artery / J. Wang, L. Weigand, W. Wang [et al.] // *Am J Physiol.* – 2005. – V. 288 (6). – P. 1049–1058.
24. Platoshyn O. Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells / O. Platoshyn, E. E. Brevnova, E. D. Burg // *Am J. Physiol* 2006. – V. 290 (3). – P. 907–916.
25. Moral-Sanz J. Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats / J. Moral-Sanz, J. G. Lopez-Lopez, C. Menendez // *Exp Physiol.* – 2012. – V. 97, № 5. – P. 676–86.
26. BK channels in rat and human pulmonary smooth muscle cells are $\text{BK}\alpha\text{-}\beta_1$ functional complexes lacking the oxygen-sensitive stress axis regulated exon insert / N. D. Detweiler, L. Song, S. J. McClenahan [et al.] // *Pulm Circ.* – 2016. – V. 6 (4). – P. 563–575.
27. Oxygen tension modulates the expression of pulmonary vascular BK_{Ca} channel α - and β -subunits / E. Resnik, J. Herron, R. Fu [et al.] // *Am J Physiol.* – 2005. – V. 290 (4). – P. 761–768.

І. В. Іванова, М. І. Мельник, А. І. Соловійов

Розвиток експериментального цукрового діабету пригнічує загальну калієву провідність у гладеньком'язових клітинах аорти, але збільшує її в клітинах легеневої артерії щурів

Цукровий діабет (ЦД) здатен спричиняти ураження різних типів кровоносних судин, призводячи до їхньої дисфункції. Важливу роль у регуляції тонусу та скорочення гладеньком'язових клітин (ГМК) судин відіграють Ca^{2+} -активовані K^+ -канали великої провідності (BK_{Ca}), які здійснюють суттєвий вплив на регуляцію судинного тонусу через їхнє залучення до формування змін мембранного потенціалу ГМК.

Мета дослідження – встановити можливі зміни активності калієвих каналів плазматичної мембрани ГМК аорти та основної легеневої артерії (ЛА) за умов розвитку стрептозототин-індукованого ЦД у щурів.

Дослідження проводили з використанням свіжо-ізольованих ГМК аорти та основної легеневої артерії (ЛА) самців щурів лінії Wistar. Трансмембранні іонні струми досліджувались методом patch-clamp у конфігурації whole-cell.

Встановлено, що ЦД викликає значне пригнічення амплітуди калієвих струмів через плазматичну мембрану ГМК аорти щурів. Величина вихідних калієвих струмів у ГМК ЛА тварин з ЦД, навпаки, різко збільшувалась при потенціалах вище, ніж -20 мВ.

Дія на ГМК аорти селективного блокатора BK_{Ca} -каналів паксиліну (ПК, $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) вірогідно зменшувала амплітуду сумарного вихідного струму в контролі при потенціалах вище, ніж $+10$ мВ, у той час як за умов ЦД вплив ПК змінював щільність сумарного вихідного струму в значно меншому ступені. За дії ПК на ГМК ЛА як контрольних щурів, так і щурів з ЦД величина трансмембранного K^+ -струму зменшувалась однаково, тобто активність BK_{Ca} -каналів за умов діабету не змінювалась, незважаючи на те, що загальний K^+ -струм за цих умов значно зростав.

Таким чином, ЦД викликав зниження величини трансмембранних K^+ -струмів у ГМК аорти щурів за рахунок пригнічення активності BK_{Ca} -каналів, у той час як суттєве зростання загальної калієвої провідності не було пов'язане з активністю BK_{Ca} -каналів.

Ключові слова: цукровий діабет, аорта, легенева артерія, плазматична мембрана гладеньком'язових клітин, Ca^{2+} -активовані K^+ -канали великої провідності (BK_{Ca})

И. В. Иванова, М. И. Мельник, А. И. Соловьев

Развитие экспериментального сахарного диабета подавляет общую калиевую проводимость в гладкомышечных клетках аорты, но увеличивает ее в клетках легочной артерии крыс

Сахарный диабет (СД) способен вызывать поражения различных типов кровеносных сосудов, приводя к их дисфункции. Важную роль в регуляции тонуса и сокращения гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов играют Ca^{2+} -активированные K^{+} -каналы большой проводимости (BK_{Ca}), которые оказывают существенное влияние на регуляцию сосудистого тонуса посредством формирования изменений мембранного потенциала ГМК.

Цель исследования – установить возможные изменения активности калиевых каналов плазматической мембраны ГМК сосудов аорты и основной легочной артерии (ЛА) в условиях развития стрептозотонин-индуцированного СД у крыс.

Исследования проводили с использованием свежеизолированных ГМК аорты и основной легочной артерии (ЛА) самцов крыс линии Wistar. Трансмембранные ионные токи исследовали методом patch-clamp в конфигурации whole-cell.

Установлено, что СД вызывает значительное угнетение амплитуды калиевых токов в ГМК аорты крыс. Величина выходящих калиевых токов в ГМК ЛА животных с СД, наоборот, резко увеличивалась при потенциалах выше, чем -20 мВ.

Воздействие на ГМК аорты блокатора BK_{Ca} -каналов паксиллина (ПК, $5 \cdot 10^{-7}$ моль) достоверно уменьшало амплитуду суммарного выходящего тока в контроле при потенциалах выше, чем $+10$ мВ, в то время как в условиях СД влияние ПК изменяло плотность суммарного выходящего тока в значительно меньшей степени. При действии ПК на ГМК ЛА как контрольных крыс, так и крыс с СД величина трансмембранного K^{+} -тока одинаково уменьшалась, то есть активность BK_{Ca} -каналов в условиях диабета не изменялась, несмотря на то, что общий K^{+} -ток при этом значительно возрос.

Таким образом, влияние СД вызывало снижение величины трансмембранных K^{+} -токов в ГМК аорты крыс за счет подавления активности BK_{Ca} -каналов, в то время как значительное возрастание общей калиевой проводимости не было связано с активностью BK_{Ca} -каналов.

Ключевые слова: сахарный диабет, аорта, легочная артерия, плазматическая мембрана гладкомышечных клеток, Ca^{2+} -активированные K^{+} -каналы большой проводимости (BK_{Ca})

I. V. Ivanova, M. I. Melnyk, A. I. Soloviev

Experimental diabetes mellitus inhibits the total potassium conduction in the rat aorta smooth muscle cells, but increases it in the rat pulmonary artery cells

Diabetes mellitus (DM) severely damages various types of blood vessels, leading to their dysfunction. Large conductance calcium-dependent K^{+} channels (BK_{Ca}) play an important role in vascular tone regulation and smooth muscle cells (SMCs) contractility. This type of ion channels has a significant role in the vascular tone regulation due to its involvement to the membrane potential regulation in the SMCs. The study purpose was to determine the possible changes of the potassium channels activity in the rat aorta SMCs comparatively to the rat main pulmonary artery (PA) SMCs in streptozotocine-induced DM.

The studies were conducted using freshly-isolated SMCs from aorta and main pulmonary artery (LA) of male Wistar rats. Trans-membrane ionic currents were studied using the patch-clamp method in the whole-cell configuration.

It has been established that DM causes a significant inhibition of the outward potassium currents amplitude in the aortic SMCs. Contrary, the total outward potassium currents amplitude in diabetic SMCs from rat PA sharply increased at potentials higher than -20 mV.

Selective BK_{Ca} -channels blocker, paxillin (Pax, $5 \cdot 10^{-7}$ M), reduced the total outward current amplitude in the control at potentials higher than $+10$ mV, while Pax decreased the total current density in the diabetic SMC in significantly lesser degree. Pax equally reduced K^{+} -currents in SMCs from PA in both control rats and rats with DM, indicating that the BK_{Ca} -channels activity did not change in diabetes despite the total K^{+} -current was significantly increased. Thus, the DM decreased the trans-membrane K^{+} -currents amplitude in the rat aorta SMCs mainly due to inhibiting of the BK_{Ca} -channels activity, while a significant increase in total potassium conductivity in SMC of PA was not associated with BK_{Ca} -channels activity.

Key words: diabetes mellitus, aorta, pulmonary artery, plasma membrane of smooth muscle cells, large conductance calcium-dependent K^{+} channels (BK_{Ca})

Надійшла: 12 березня 2018 р.

Контактна особа: Иванова Ирина Володимирівна, старший науковий співробітник, відділ фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 02 88.

Вплив метформіну на морфофункціональні характеристики сім'яників щурів за метаболічного синдрому, що розвинувся в ювенільному віці

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

Ключові слова: метаболічний синдром, щури, гонади, метформін

Сьогодні не викликає сумніву той факт, що корені метаболічних порушень лежать у дитячому та підлітковому віці [1, 2]. Стрімке розповсюдження ожиріння, особливо в розвинених країнах, призводить до суттєвого збільшення кількості дітей і підлітків, що мають ознаки інсулінорезистентності та ризик метаболічних порушень [3]. Зниження рівня тестостерону (андрогенний дефіцит) – новий суттєвий компонент патогенезу метаболічного синдрому (МС) у чоловіків, що визначає важливу з точки зору медицини, демографії та соціології проблему порушення статевої функції в чоловіків молодого та середнього віку, що страждають на МС та ожиріння [4, 5]. У попередніх дослідженнях нами показано, що МС в ювенільний період розвитку самців щурів призводить до суттєвих порушень морфофункціонального стану сім'яників уже в пубертатному віці [6]. Не зважаючи на те, що в основі лікування ожиріння є поєднання дієтотерапії та дозованих фізичних навантажень, на практиці використання лише таких методів часто є малоефективним, що спонукає вдаватись до фармакотерапії. До лікарських засобів першої лінії належить метформін – препарат класу бігуанідів, що активує чутливість до інсуліну, і, як правило, застосовується на початку лікування гіперглікемії в пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та надлишковою масою тіла [7]. Проте дані щодо впливу метформіну на репродуктивну функцію є досить неоднозначними [8, 9].

Мета дослідження – експериментальне вивчення впливу метформіну на стан гонад і репродуктивну функцію самців щурів за МС, що розвинувся в ювенільному віці.

Матеріали та методи. План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ «Інститут фармакології та лікарської токсикології НАМН України»; усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням з тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Для відтворення моделі МС у експериментах було використано фруктозу кристалічну харчову (виробник – Туреччина, постачальник – Голландія, серія LS2P00251506-247). У дослідженнях використовували самців щурят-відьомишів з початковою масою тіла (50–70) г, віком 3 тижні. Крім того, для парування з самцями використовували відгінних статевозрілих самоць масою тіла (160–180) г. Тварини були надані розплідником ПП «Біомодельсервіс». Щурів утримували в стандартних умовах віварію за температури 22–24 °C та відносної вологості 30–70 %, з вільним доступом до корму та води. Тварин було розподілено методом рандомізації на 3 групи по 10 щурят у кожній: 1 група – контроль – тварини, що отримували питну воду; 2 група – тварини, які замість питної води отримували 10 % розчин фруктози протягом 60 днів [10]; 3 група – тварини, які замість питної води отримували 10 % розчин фруктози, та внутрішньоблунково зондом вводили метформін у дозі 266 мг/кг маси тіла в 1% крохмальному гелі протягом останніх 30 днів експерименту. Зазначена доза (з урахуван-

ням коефіцієнта видової чутливості) застосовується в людини [11]. Через 42 дні від початку експерименту щурів парували з інтактними самицями у співвідношенні самець : самиця – 1 : 1 протягом 2–3 естральних циклів для визначення фертильності. Після закінчення терміну парування самців під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії дислокацією шийних хребців. Для морфологічних досліджень брали лівий сім'яник та епідидиміс. Підготовку препаратів для гістологічного аналізу проводили згідно з [12]. Гістологічні зрізи (6 мкм) фарбували гематоксиліном і еозином. Вивчали функціональний стан сперматозоїдів, використовуючи суспензію клітин придатка сім'яника, яку готували з дотриманням стандартних методичних вимог [13].

Вплив фруктози та метформіну на запліднювальну здатність самців-щурів визначали за формулою 1:

$$\frac{\text{число вагітних самиць}}{\text{число самиць, парованих зі самцями}} \times 100 \%. \quad (1)$$

Визначали вплив МС на процес сперматогенезу в звивистих каналцях сім'яників за такими показниками: середня кількість нормальних сперматогоній у 20 поперечних зрізах каналців; відносна кількість каналців у 12-й стадії сперматогенезу (аналізували 100 каналців); індекс сперматогенезу за формулою 2:

$$\text{Індекс сперматогенезу} = \frac{\sum A}{100}, \quad (2)$$

де А – число стадій у кожному каналці;

100 – число підрахованих каналців.

Крім того, звертали увагу на якісні зміни сперматогенного епітелію: відшарування епітелію від базальної мембрани, наявність ділянок у каналцях, позбавлених клітин («вікна»), деформація окремих сім'яних каналців, деструктивні зміни в сперматозоїдах.

Рівень загального тестостерону, фолікулостимулюючого, лютеїнізуючого гормонів у сироватці крові визначали, використовуючи набори Testosterone ELISA, LG ELISA та FSG ELISA виробництва DRG Instruments GmbH (Німеччина) методом твердофазного імуно-

ферментного аналізу згідно з інструкцією виробника. Вимірювання оптичної щільності калібраторів і зразків проводили на мікропланшетному ридері BioTek (США).

Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані наводили як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Репродуктивна функція підлітків є однією з найчутливіших в організмі, що тонко реагує на різні зовнішні впливи. Захворювання в дитячому та підлітковому віці є причиною майже половини випадків чоловічої інфертильності, оскільки саме в ці вікові періоди відбувається формування репродуктивної функції.

Беручи до уваги, що для МС характерним є порушення рівня статевих гормонів [15], нами було досліджено вміст тестостерону, лютеїнізуючого та фолікулостимулюючого гормонів у сироватці крові щурів, у тому числі й за введення метформіну. Під контролем фолікулостимулюючого гормону знаходиться розвиток сім'яників і сім'яних каналців, утворення глобулярного білка, а також запуск процесу сперматогенезу. Лютеїнізуючий гормон стимулює продукування тестостерону й відповідає за правильне дозрівання сперматозоїдів. Вони активно взаємодіють між собою, підтримуючи необхідну концентрацію один одного. Порушення їхнього співвідношення є важливим фактором розвитку гормональної патології [16]. Згідно з даними, наведеними в таблиці 1, у самців з МС на 28 % знижувався рівень вільного тестостерону в сироватці крові порівняно з контролем за одночасного дворазового збільшення вмісту лютеїнізуючого та фолікулостимулюючого гормонів.

Отримані результати можуть свідчити про порушення синтезу статевих гормонів, недостатність функцій статевих залоз і розвиток гіпогонадізму [15]. Уведення метформіну не виявило позитивного впливу на рівень тестостерону

Таблиця 1

Уміст статевих гормонів у сироватці крові щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці, та за умов введення метформіну ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Експериментальна група		
	контроль	метаболічний синдром	метаболічний синдром + метформін
Тестостерон, нмоль/л	$14,96 \pm 1,17$	$10,76 \pm 0,23^*$	$10,31 \pm 1,04^*$
Лютеїнізуючий гормон, нг/мл	$0,30 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,06^*$	$0,30 \pm 0,07^{\#}$
Фолікулостимулюючий гормон, нг/мл	$0,10 \pm 0,20$	$0,20 \pm 0,02^*$	$0,27 \pm 0,06^*$

та фолікулостимулюючого гормона, але нормалізувало вміст лютеїнізуючого гормона в сироватці крові. Хоча в цьому разі співвідношення останніх суттєво відрізнялось від контролю, що свідчить про збереження дисфункції чоловічих статевих гормонів у щурів.

За індукції МС в ювенільному віці не спостерігали зниження запліднювальної здатності щурів-самців порівняно з контролем. Одночасно кількість вагітних інтактних самиць, спарованих з самцями дослідної групи, що отримували метформін, виявилася найнижчою (табл. 2).

Дослідження стану гонад щурів, у яких МС розвинувся в ювенільному віці, виявило зниження маси придатків сім'яників на 9 % порівняно з контролем, що узгоджується з результатами мікроскопічного аналізу епідидимальної суспензії (табл. 3), згідно з якими кількість сперматозоїдів на 16 % менша порівняно з даними контролю. Уведення метформіну не сприяло корекції даних показників. Більше того, у тварин даної групи спостерігали певне зниження абсолютної маси та

збільшення відносної маси сім'яників порівняно з контролем (табл. 3).

У регуляції забезпечення належного розвитку та дозрівання сперматозоїдів і надбання ними критичних функціональних характеристик – поступального руху та запліднювального потенціалу – значну роль відіграє біохімічне оточення яєчок і епідидимісів. За умов МС можливе порушення метаболічних процесів, внаслідок чого змінюватимуться енергетичні властивості сперматозоїдів та їхня рухливість. Ряд досліджень вказує, що суттєве зниження рухливості сперматозоїдів асоціюється з безпліддям, навіть у разі незмінного відсотка рухливих сперматозоїдів [17]. Показники, що опосередковано свідчать про енергетичні можливості сперматозоїдів (характер рухової активності, тривалість руху) та їхню стійкість до змін оточуючого середовища (осморезистентність), що наведені в таблиці 4, вказують на відсутність нормалізуючого впливу метформіну на функціональний стан сперматозоїдів щурів самців з МС, що розвинувся в ювенільному віці.

Таблиця 2

Індекс запліднювальної здатності щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці, та за умов введення метформіну самицям

Група самців	Кількість парованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності, %
Контроль	50	44	88
Метаболічний синдром	50	49	98
Метаболічний синдром + метформін	10	8	80

Таблиця 3

Деякі показники стану гонад щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці, та за умов уведення метформіну ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Експериментальна група		
	контроль	метаболічний синдром	метаболічний синдром + метформін
Маса сім'яників, г	$3,49 \pm 0,08$	$3,20 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,05^*$
Відносна маса сім'яників, г/100 г маси тіла	$1,17 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,03^*$
Об'єм сім'яників, см ³	$2,94 \pm 0,14$	$2,69 \pm 0,05$	$2,67 \pm 0,10$
Маса епідидимісів, г	$0,97 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,03^*$	$0,85 \pm 0,02^*$
Відносна маса епідидимісів, г/100 г маси тіла	$0,33 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$	$0,340 \pm 0,007$
Кількість сперматозоїдів, млн/мл	$70,26 \pm 6,96$	$52,57 \pm 3,19^*$	$58,71 \pm 4,58$

Примітка. Тут і в табл. 5: * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Таблиця 4

Функціональний стан сперматозоїдів щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці, та за умов введення метформіну ($M \pm m$, $n = 10$)

Експериментальна група	Показник	
	час рухливості, хв	осмореізистентність, % NaCl
Контроль	$368,86 \pm 21,92$	$2,43 \pm 0,17$
Метаболічний синдром	$305,78 \pm 33,88$	$2,17 \pm 0,27$
Метаболічний синдром + метформін	$296,22 \pm 33,23$	$2,11 \pm 0,07$

Гістологічна картина гонад контрольних щурів показала, що сім'яники зовні були покриті білковою оболонкою з щільної колагенової тканини з прошарками еластичних волокон. Білкова оболонка утворювала перегородки – септи, що поділяють сім'яник на часточки. Основою кожної з часточок була пухка сполучна тканина, у масі якої розташовані елементи паренхіми, утворені звивистими сім'яними каналцями. На поперечних зрізах гонад звивисті сім'яні каналці округлої чи еліпсоподібної форми, у них спостерігався активний сперматогенез. Канальці мали нормальну будову, статеві клітини різних стадій диференціювання розміщувались у них концентричними шарами. На власній оболонці каналців розміщувалась значна кількість сперматогоній: дрібних клітин з інтенсивно базофільними ядрами. Серед сперматогоній часто зустріча-

лись мітози. Глибше в просвіті каналця розташовані сперматоцити I і II порядку, вони були більших розмірів з кулястими ядрами, заповнені глибками хроматину. Далі виявлялись сперматиди та спермії. В інтерстиціальній тканині власної оболонки звивистих каналців не спостерігали збільшення сполучнотканинних волокон і клітинних елементів. В органі не відмічали дистрофічні зміни, гемодинамічні порушення та запальну реакцію (рис. 1). Слід відмітити, що в окремих тварин у поодиноких сім'яних каналцях зустрічались злучені епітеліальні клітини.

Мікроскопічний аналіз сім'яників тварин, що споживали 10 % розчин фруктози, показав, що більшість каналців була патологічно не змінена. Але в деяких з них гермінативний епітеліальний шар – потоншений, виявлено менше сперматогоній та сперматоцитів

I і II порядку (рис. 2). В окремих каналцях сперматогонії та сперматоцити I порядку були дистрофічно змінені.

Нерідко зустрічали каналці з десквамованим епітелієм, серед них виявляли дистрофічно змінені сперматогонії, сперматоцити I порядку, сперматозоїди (рис. 3).

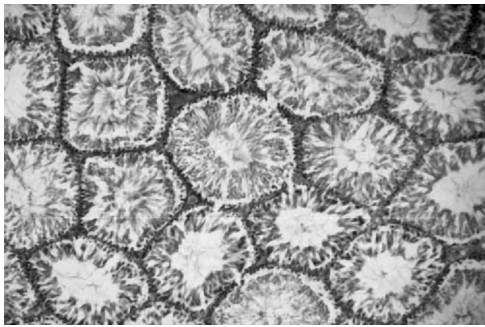


Рис. 1. Сім'яні каналці з незміненим епітелієм в щура контрольної групи. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 100$

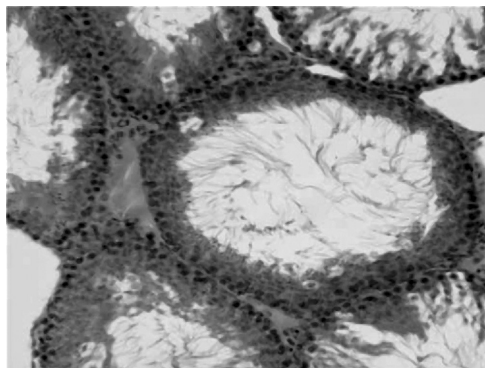


Рис. 2. Зменшення товщини сім'яродного епітелію та його розпушення в щура з метаболічним синдромом. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 200$

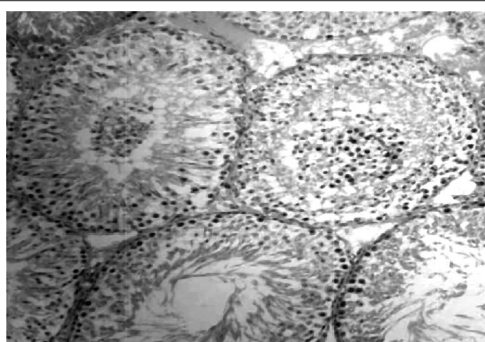


Рис. 3. Десквамований епітелій в сім'яних каналцях щура з метаболічним синдромом. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 200$

За мікроскопічного дослідження сім'яників тварин за умов введення метформіну на тлі МС виявлено аналогічні патоморфологічні зміни, характерні для таких у сім'яниках тварин без лікування. Зокрема, зустрічали каналці з потоншеними шарами сперматоцитів I і II порядку (рис. 4).

Осередковано, в окремих сім'яних каналцях виявлено дистрофічні зміни в сперматогоніях і сперматоцитах I порядку (рис. 5).

Слід також відмітити, що в чотирьох з шести тварин цієї групи спостерігалось повнокров'я судин, а в одного щура – значне повнокров'я та набряк міжканальцевої сполучної тканини (рис. 6).

Згідно з даними таблиці 5, індекс сперматогенезу, що відтворює стан збереження різних типів клітин спермато-

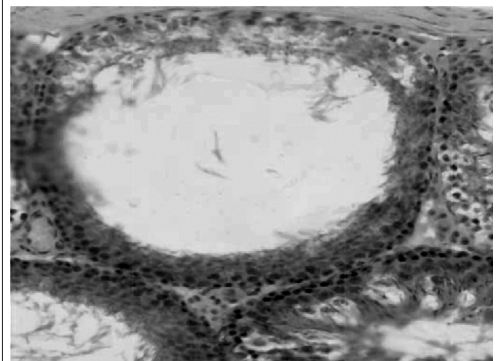


Рис. 4. Потоншений шар сперматогенного епітелію в каналці сім'яника тварини, якій на тлі метаболічного синдрому вводили метформін. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 200$

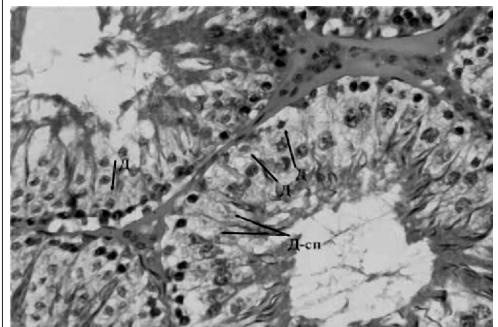


Рис. 5. Дистрофічні зміни в сперматогоніях (Д) і сперматоцитах I порядку (Д-сп) у щура, якому на тлі метаболічного синдрому вводили метформін. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 400$

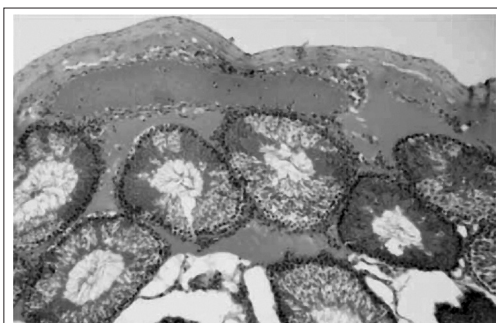


Рис. 6. Виражене розширення, повнокров'я судини та набряк міжканальцевої сполучної тканини в щура, якому на тлі метаболічного синдрому вводили метформін. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 100$

генного епітелію в сім'яниках щурів з МС, індукованим у ювенільному віці, вірогідно знижувався порівняно з контрольною групою, також на 21 % зменшувалося число сперматогоній, спостерігали виражену тенденцію до збільшення кількості каналців зі злущеним епітелієм. Описані зміни є ознаками дистрофічного процесу в гонадах і свідчать про погіршення процесу сперматогенезу.

Уведення метформіну, загалом, не справляло коригуючого впливу на кількісні показники сперматогенного епітелію (табл. 5).

Мікроскопії придатків сім'яників контрольних тварин виявляла каналці різних розмірів і форми, розділені між собою прошарками пухкої сполучної тканини з помірно повнокровними судинами. Стінка каналців придатка була вистелена незміненим двоярдним епітелієм, представленим високими

призматичними, частково кубічними клітинами. В епітеліоцитах розміщувалися круглі ядра, заповнені дрібними гранулами хроматину. В ядрах містилося по одному ядерцю, які інтенсивно фарбувались гематоксиліном. Епітеліальний шар епідидимальних каналців був оточений волокнистою оболонкою. Просвіт каналців – широкий, заповнений значною кількістю сперматозоїдів (рис. 7).

У тварин з МС мікроскопічне дослідження придатків сім'яників виявило поодинокі дистрофічно змінені епітеліальні клітини, які характеризувались вакуолізацією цитоплазми та пікнозом ядер. У п'яти з шести дослідних тварин осередковано в каналцях сім'явиносних протоків епідидимісів спостерігався застій сперми (рис. 8).

Суттєвої різниці в морфологічній картині епідидимісів тварин, яким на тлі МС вводили метморфін, порівняно з нелікованими щурами не спостерігали (рис. 9).

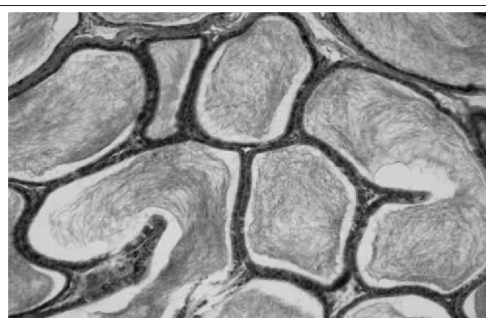


Рис. 7. Структурні елементи каналців придатку сім'яника контрольних тварин не змінені. Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 100$

Таблиця 5

Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію в щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці, та за умов введення метформіну ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Експериментальна група		
	контроль	метаболічний синдром	метаболічний синдром + метформін
Індекс сперматогенезу	$3,44 \pm 0,01$	$3,36 \pm 0,02^*$	$3,41 \pm 0,01$
Число сперматогоній	$76,92 \pm 0,36$	$61,0 \pm 1,21^*$	$62,880 \pm 1,075^*$
Кількість каналців з 12-ю стадією циклу сперматогенного епітелію, %	$3,17 \pm 0,31$	$2,50 \pm 0,20$	$1,18 \pm 0,54$
Злущений епітелій, %	$1,33 \pm 0,21$	$2,0 \pm 0,20$	$1,0 \pm 0,37$



Рис. 8. Осередкований застій сперми в окремих канальцях протоків епідидиміса щура з метаболічним синдромом. Фарбування гематоксилином і еозином. $\times 100$

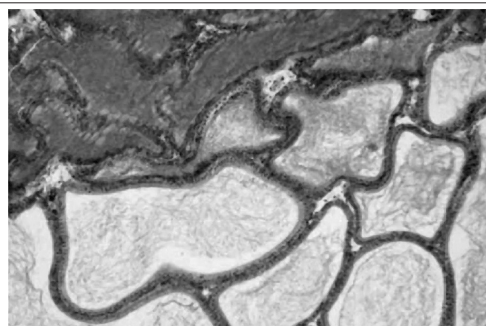


Рис. 9. Застій сперми в деяких канальцях протоків епідидиміса в щура, якому на тлі метаболічного синдрому вводили метформін. Фарбування гематоксилином і еозином. $\times 100$

Отже, проведене патоморфологічне дослідження статевих органів (сім'яників, епідидимісів) білих щурів показало, що застосування метформіну на тлі МС не чинило коригуючого впливу на розвиток патологічних процесів у репродуктивних органах самців.

Висновки

1. У самців щурів пубертатного віку за експериментального МС протягом ювенільного періоду розвитку зареєстровано порушення синтезу статевих гормонів і розвиток гіпогонадізму. Уведення метформіну не виявило позитивного впливу на рівень тестостерону та не призводило до нормалізації співвідношення фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів.
2. Уведення метформіну самцям щурів з МС, що розвинувся в ювенільному віці, не сприяло корекції таких порушень морфофункціональних показників стану гонад, як зменшення маси придатків сім'яників, кількості сперматозоїдів, часу рухливості, числа

сперматогоній, кількості канальців з 12-ю стадією циклу сперматогенного епітелію.

3. За даними гістологічного аналізу застосування метформіну на тлі МС не чинило коригуючого впливу на гістологічну картину сім'яників та епідидимісів. У щурів даної групи порівняно з контролем спостерігали зменшення товщини шару сперматогенного епітелію в канальцях сім'яника, дистрофічні зміни в сперматогоніях і сперматоцитах I порядку, повнокров'я судин, набряк міжканальцевої сполучної тканини, застій сперми в деяких канальцях протоків епідидиміса.
4. Отже, введення самцям щурів цукрознижуючого лікарського засобу класу бігуанідів, метформіну, не сприяло корекції порушень морфофункціонального стану гонад, що виникли внаслідок МС в ювенільному віці. Це свідчить про доцільність додаткового застосування метаболічних препаратів з гонадопротекторною дією за фармакотерапії МС.

1. Validation of metabolic syndrome score by confirmatory factor analysis in children and adults and prediction of cardiometabolic outcomes in adults / A. Viitasalo, T. A. Lakka, D. E. Laaksonen [et al.] // Diabetologia. – 2014. – V. 57, № 5. – P. 940–949.
2. Russ K. Developmental Exposure to Environmental Chemicals and Metabolic Changes in Children / K. Russ, S. Howard // Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care. – 2016. – pii: S1538-5442(16)30036-0. doi: 10.1016/j.cppeds.2016.06.001.
3. Landgraf K. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children / K. Landgraf, D. Rockstroh, I. V. Wagner // Diabetes. – 2015. – V. 64, № 4. – P. 1249–1261.
4. Kasturi S. S. The metabolic syndrome and male infertility / S. S. Kasturi, J. Tannir, R. E. Brannigan // J. Androl. – 2008. – V. 29, № 3 – P. 251–259.
5. Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden / E. Ventimiglia, P. Capogrosso, M. Colicchia [et al.] // Andrology. – 2016. – V. 4, № 5. – P. 944–951.

6. Ткаченко О. Є. Морфологічні порушення у сім'яниках і епідидимісах щурів з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці / О. Є. Ткаченко, А. В. Матвієнко, В. М. Коваленко // Досягнення біології та медицини. – 2017. – № 2. – С. 14–17.
7. Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism / M. G. Alves, A. D. Martins, C. V. Vaz [et al.] // Br. J. Pharmacol. // 2014. – V. 171, № 4. – P.1033–1042.
8. Impact of Metformin on Male Reproduction / C. Ferreira, M. Sousa, A. Rabaç [et al.] // Current Pharmaceutical Design. – 2015. – V. 21. – P. 3 621–363.
9. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa / M. J. Bertoldo, M. Faure, Dupont, P. Froment // Criobiology. – 2014. – V. 68, № 2. – P. 262–268.
10. (-)-Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress / A. Bettaieb, M. A. Vazquez Prieto, C. Rodriguez Lanzi [et al.] // Free radical. biology & medicine. – 2014. – V. 72. – P. 247–256.
11. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers US. Of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER (Вусуьук 2002) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
12. Creasy Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid / J. R. Latendresse, A. R. Warbritton, H. Jonassen, D. M. Creasy // Toxicologic Pathology. – 2002. – V. 30, № 4. – P. 524–533.
13. Male reproductive toxicology (Chapter 16). In: Maines MD (Ed.), Current Protocols in Toxicology. - John Wiley & Sons Inc.: New York, 2005. – 2058 p.
14. Курашова Н. А. Оценка репродуктивного потенциала мужского населения / Н. А. Курашова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – V. 2, № 96. – С. 104–108.
15. Hammond G. L. Sex Hormone-Binding Globulin and the Metabolic Syndrome / G. L. Hammond // Male Hypogonadism. – Springer International Publishing. – 2017. – P. 305–324.
16. Роживанов Р. В. Синдром гипогонадизма у мужчин / Р. В. Роживанов // Ожирение и метаболизм. – 2014. – № 2. – С. 30–34.
17. Principles and Methods of Toxicology: 4 thissue ed. [Ed. A. Wallace Hayes]. – New York : Taylor & Francis, 2001. – 1887 p.

В. М. Коваленко, О. Є. Ткаченко, Г. М. Шаяхметова, А. В. Матвієнко
Вплив метформіну на морфофункціональні характеристики сім'яників щурів
за метаболічного синдрому, що розвинувся в ювенільному віці

Мета дослідження – експериментальне вивчення впливу метформіну на стан гонад і репродуктивну функцію самців щурів за метаболічного синдрому (МС), що розвинувся в ювенільному віці.

Визначали рівень загального тестостерону, фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів у сироватці крові, запліднювальну здатність самців-щурів, функціональний стан сперматозоїдів, морфометричні показники сперматогенезу в сім'яниках, структуру сперматогенного епітелію, проводили гістологічний аналіз гонад та придатків сім'яників. Статистичний аналіз результатів здійснювали за t-критерієм Стюдента. Різницю вважали статистично вірогідною за $p < 0,05$.

У щурів пубертатного віку за експериментального МС протягом ювенільного періоду розвитку зареєстровано порушення синтезу статевих гормонів і розвиток гіпогонадизму. Уведення метформіну не виявило позитивного впливу на рівень тестостерону та не призводило до нормалізації співвідношення фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів. У результаті проведених досліджень встановлено, що введення метформіну самцям щурів з МС, що розвинувся в ювенільному віці, не сприяло корекції морфофункціональних показників стану гонад, не виявило ефективності щодо покращання гістологічної картини сім'яників та епідидимісів.

Отже, метформін не здатен попереджати відтермінований негативний вплив на структурно-функціональні показники гонад самців щурів за метаболічного синдрому, що мав місце в ювенільному віці. Це свідчить про доцільність додаткового застосування метаболічних препаратів з гонадопротекторною дією за фармакотерапії МС.

Ключові слова: метаболічний синдром, щури, гонади, метформін

В. Н. Коваленко, А. Е. Ткаченко, А. М. Шаяхметова, А. В. Матвієнко
Влияние метформина на морфофункциональные характеристики семенников
крыс с метаболическим синдромом, развившемся в ювенильном возрасте

Цель исследования – изучение влияния метформина на состояние гонад и репродуктивную функцию самцов крыс при метаболическом синдроме (МС), развившемся в ювенильном возрасте.

Определяли уровень тестостерона, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов в сыворотке крови, исследовали оплодотворяющую способность, функциональное состояние сперматозоидов, морфометрические показатели сперматогенеза, проводили гистологический анализ гонад и придатков семенников. Статистический анализ результатов проводили с использованием t-критерия Стюдента. Разницу между показателями считали статистически достоверной при значении $p < 0,05$.

У крыс пубертатного возраста в результате МС в ювенильном периоде развития выявлено нарушение синтеза половых гормонов. Введение метформина не выявило положительного влияния на уровень тестостерона и нормализацию соотношения фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Применение метформина у самцов крыс с МС, развившемся в ювенильном возрасте, не способствовало коррекции морфофункциональных показателей состояния гонад и улучшению гистологической картины семенников и эпидидимисов.

Следовательно, метформин не способен предупреждать негативное влияние МС в ювенильном возрасте на структурно-функциональные показатели гонад самцов крыс. Это свидетельствует о целесообразности применения при фармакотерапии МС дополнительно метаболитных препаратов с гонадопротекторным действием.

Ключевые слова: метаболический синдром, крысы, гонады, метформин

V. N. Kovalenko, A. E. Tkachenko, A. M. Shayakhmetova, A. V. Matvienko
Impact of metformin on testis morpho-functional characteristics in male rats induced by metabolic syndrome developed at the juvenile age

Purpose of the study was to test effect of metformin on the gonad state and the reproductive function of male rats at the metabolic syndrome (MS) that developed at the juvenile age.

The levels of total testosterone, follicle-stimulating and luteinizing hormones in the blood serum were determined, fertility, functional state of the spermatozoa, morphometric parameters of spermatogenesis in the testes, the spermatogenic epithelium structure, histological analysis of the gonads and epididymis were studied. Statistical analysis of the results was carried out according to Student's t-test. The difference between the parameters was considered statistically significant at $p < 0,05$.

In rats puberty age due to MS in the juvenile period, there was a disturbance of sex hormones synthesis. The metformin administration did not reveal a positive effect on testosterone levels and the follicle-stimulating / luteinizing hormones ratio normalization. Using of metformin in male rats with MS, developed at the juvenile age, did not insure to the correction of morpho-functional indicators of the gonad condition, it did not reveal any efficacy in improving the histological picture of the testes and epididymis.

Thus, metformin is not able to prevent a negative effect of MS, which occurred in the juvenile age, on the structural and functional parameters of rat male gonads. This indicates the advisability of additional use of metabolic drugs with gonadoprotective action in the pharmacotherapy of MS.

Key words: metabolic syndrome, rats, gonads, metformin

Надійшла: 24 лютого 2018 р.

Контактна особа: Коваленко Валентина Миколаївна, доктор біологічних наук, професор, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 93 253 88 84. Електронна пошта: Kovalenko_toxy@yahoo.com

О. В. Кудіна¹, С. Ю. Штриголь¹, О. О. Колобов²

Доклінічне дослідження стреспротекторних властивостей олігопептидів – гомологів фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ на моделі гострого холодового стресу

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²ФДУП «Державний науково-дослідний інститут особливо чистих біопрепаратів»
ФМБА Росії, Санкт-Петербург, Російська Федерація

Ключові слова: стреспротектори, олігопептиди, холодовий стрес

У сучасному світі проблема стресу та його наслідків набуває особливого значення, що пов'язано з впливом на людину великої кількості негативних факторів довкілля. Несприятливі кліматичні умови, війни, соціальні, політичні, економічні та техногенні впливи, робота в умовах надзвичайних ситуацій є основними стресогенними чинниками для сучасної людини [1–3]. В основі патогенезу багатьох захворювань одне з головних місць посідає стрес, тривала дія якого призводить до зниження захисних можливостей організму та розвитку хвороби адаптації [4–5]. Серед актуальних стресогенних факторів велике значення має ураження організму низькими температурами, адже мешканці більшості країн світу та кліматичних поясів можуть зазнавати несприятливого впливу гіпотермії [6–7]. Патогенез ураження організму низькими температурами охоплює серцево-судинну, ендокринну, центральну нервову, імунну, респіраторну та ін. системи. Така поліорганність обумовлює надзвичайну складність терапії цього виду стресу. Арсенал лікарських засобів, що здатні підвищити резистентність організму до гіпотермії (фригопротекторів), досить вузький. До того ж більшість з них впливає лише на одну з ланок патогенезу холодової травми. Тому актуальним є пошук нових безпечних та ефективних речовин для лікування та профілактики холодового стресу.

Важливою ланкою патогенезу стрес-реакції організму є порушення функціонування пептидергічної системи та її взаємодії з іншими нейрогуморальними регуляторними механізмами [8]. Важливого значення в цьому аспекті набувають нейропептидні препарати, яким притаманна поліфункціональність і здатність усувати дезінтеграцію молекулярно-біохімічних механізмів. Головна роль у регуляції стрес-реалізуючих систем організму належить осі гіпоталамус-гіпофіз-наднирники [9]. Будь-який стресовий вплив індукує секрецію адренокортикотропного гормону (АКТГ), який у свою чергу стимулює вихід глюкокортикоїдів з надниркових залоз. Тому особливу увагу як перспективні стреспротектори привертають олігопептиди – гомологи АКТГ₁₅₋₁₈. У наших попередніх дослідженнях [10] встановлено вплив пептидів на різні ланки стрес-реакції за умов гострого іммобілізаційного стресу в щурів. Доцільним є дослідження стреспротекторної дії олігопептидів – гомологів АКТГ₁₅₋₁₈ на моделі холодового стресу.

Мета дослідження – встановити вплив олігопептидів – гомологів АКТГ₁₅₋₁₈ на поведінкові реакції, фізичну витривалість і тривожність щурів на моделі гострого холодового стресу.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження виконані відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.) та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експеримен-

тальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.).

Дослідження проводили на 36 самцях статевозрілих білих лабораторних щурів масою 200–220 г, вирощених у віварії Національного фармацевтичного університету. Тварин утримували на стандартному раціоні без обмеження доступу до води.

Пептидні гомологи фрагмента АКТГ¹⁵⁻¹⁸ (Lys-Lys-Arg-Arg) під шифрами КК-1 і КК-5 (табл. 1) синтезовано в ФДУП «Державному науково-дослідному інституті особливо чистих біопрепаратів» ФМБА Росії (Санкт-Петербург, Російська Федерація). Пептиди отримано методом твердофазного синтезу з використанням Вос-технології та очищено за допомогою препаративної обернено-фазової хроматографії, їхня чистота складає не менше 98 %. У цих сполуках одна (КК-1) або дві (КК-5) природні амінокислоти змінено на відповідний D-стереомер. Зазначені сполуки мають підвищену стійкість до протеаз сироватки крові людини, належать до практично нетоксичних речовин [12]. Вибір саме цих пептидів з поміж 9 близької хімічної структури зумовлений тим, що вони стали лідерами скринінгу на моделі іммобілізаційного стресу [13].

Модель гострого холодового стресу відтворювали шляхом вміщення тварин до морозильної камери «NordInter-300» за температури –18 °С на 2 год, де вони знаходилися в індивідуальних пластикових пеналах (без обмеження надходження повітря) [11]. Олігопептиди вводили інтраназально (розчин) у дозі 20 мкг/кг за 30 хв до та після холодового стресу. Препарат порівняння «Семакс» (ЗАО «Інноваційний НПЦ «Пептоген», РФ) вводили в дозі 20 мкг/кг (назальні краплі) в аналогічному режимі. Вибір референс-препарату зумовлений його олігопептидною структурою (синтетичний аналог АКТГ, позбавлений гормональної активності) і показанням до застосування для підвищен-

ня адаптаційних можливостей організму в разі стресу. Ректальну температуру в тварин вимірювали термометром WSD-10 перед охолодженням та через 10 хв після гострого холодового стресу.

Вплив пептидів на стан центральної нервової системи (ЦНС) оцінювали через 30 хв після впливу холоду за поведінковими реакціями в тесті «відкрите поле» [14]. Визначали рухову активність, орієнтовно-дослідницьку діяльність і вегетативні реакції. За тестом «піднесений хрестоподібний лабіринт» оцінювали тривожність тварин за такими критеріями: латентний період входу до темної камери, час перебування в освітлених та темних рукавах, кількість відвідувань закритих і відкритих рукавів, перетинів центрального майданчика. Також реєстрували кількість фекальних болюсів та уринацій [15]. Фізичну витривалість стресованих тварин вивчали на моделі примусового плавання з навантаженням (вантаж 7,5 % від маси тіла на корені хвоста). Критерієм повного виснаження вважали 10-секундне перебування тварин під водою з неможливістю спливати для вдиху [16].

Результати обробляли статистично за допомогою програми «Statistica–5.0» з розрахунком середньої величини та її стандартної похибки, значущості відмінностей за критерієм Стьюдента (t) за нормального розподілу, за непараметричними критеріями однофакторного дисперсійного аналізу, критерієм Ньюмена-Кейлса, Краскела-Уолліса, Манна-Уїтні за його відсутності. Розбіжності вважали вірогідними в разі $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Аналіз показників ректальної температури в щурів через 2 год після гострого холодового стресу свідчить про розвиток гіпотермії (у групі тварин контрольної патології відбулося зниження ректальної температури на 8 %). Пептиди КК-1, КК-5 та Семакс гальмували зниження температури тіла на 6 %, 5,5 % та 7 % відповідно (табл. 2).

Таблиця 1

Структура пептидів – гомологів фрагмента АКТГ¹⁵⁻¹⁸

Лабораторний шифр	Структура
Пептид КК-1	Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide
Пептид КК-5	Acetyl-(D-Lys)-Lys-(D-Arg)-Arg-amide

Таблиця 2

Показники ректальної температури в щурів до та після холодового стресу під впливом пептидів та референс-препарату, t °C (M ± m, n = 6)

Період спостереження	Група тварин				
	інтактний контроль	контрольна патологія	пептид КК-1	пептид КК-5	Семакс
До переохолодження	36,80 ± 0,21	37,40 ± 0,38	37,50 ± 0,50	36,60 ± 0,35	37,10 ± 0,45
Через 10 хв після охолодження	-	34,40 ± 0,21*	36,50 ± 0,40 [#]	36,30 ± 0,40 [#]	36,70 ± 0,57 [#]

Також показники тварин, що отримували досліджувані олігопептиди, статистично не відрізнялись від показника інтактного контролю, що свідчить про здатність речовин попереджати розвиток гіпотермії та подальші патофізіологічні прояви гіпотермії. Підтвердженням цього є результати наступного етапу досліджень з вивчення впливу пептидів на стан нервової системи.

Вплив гострого холодового стресу на стан ЦНС щурів характеризувався зміною показників поведінкових реакцій щурів за тестом відкритого поля (табл. 3), що виявилось підвищенням локомоторної активності на

53 % та суми всіх видів активності на 42 % порівняно з інтактним контролем.

Такий характер змін може свідчити про посилення тривожності тварин на фоні холодового стресу. Підвищення рухової активності може також свідчити про необхідність збільшити теплопродукцію, знижену внаслідок гіпотермії, що корелює з даними визначення ректальної температури. Введення олігопептидів вірогідно підвищувало стресостійкість щурів, що підтверджується зменшенням всіх видів активності на 59 % під впливом пептиду КК-1 і 29 % у тварин, які отримували пептид КК-5. Пептид КК-1 зменшував локомоторну

Таблиця 3

Показники поведінкових та емоційних реакцій у тесті «відкрите поле» у щурів на фоні гострого холодового стресу та впливу пептидів і референс-препарату (M ± m, n = 6)

Показник (за 3 хв)	Інтактний контроль	Стрес			
		контрольна патологія	пептид КК-1	пептид КК-5	Семакс
Локомоторна активність					
Перетнуті квадрати	16,0 ± 2,21	24,50 ± 1,41 *	7,50 ± 2,53*#	17,50 ± 5,60	19,50 ± 4,77
Орієнтовно-дослідницька активність					
Отвори	3,33 ± 0,72	3,67 ± 1,54	1,0 ± 0,52*	2,0 ± 0,52	1,83 ± 0,40
Стійки	5,0 ± 0,73	6,67 ± 1,38	3,0 ± 1,13	4,33 ± 1,52	4,83 ± 0,83
Сума	8,33 ± 1,09	10,67 ± 2,99	4,0 ± 1,59	6,33 ± 1,94	7,67 ± 0,76
Вегетативний супровід емоційних реакцій					
Болюси	0,83 ± 0,40	0 ± 0	1,33 ± 0,49#	0,83 ± 0,40	0,67 ± 0,49
Уринації	0,33 ± 0,21	0,67 ± 0,21	0,33 ± 0,21	0,17 ± 0,17	0,83 ± 0,31
Грумінг	1,0 ± 0,26	1,67 ± 0,56	2,33 ± 0,67	1,67 ± 0,72	1,83 ± 0,91
Сума	2,17 ± 0,54	2,33 ± 0,67	4,0 ± 0,78	2,67 ± 0,84	3,33 ± 1,15
Сума активностей	26,50 ± 3,01	37,50 ± 0,35*	15,50 ± 4,10#	26,50 ± 3,24#	30,50 ± 5,98

Примітки. *Відмінності, статистично значущі проти інтактного контролю ($p < 0,05$), [#]відмінності, статистично значущі проти контрольної патології ($p < 0,05$), n – кількість тварин у групі.

активність на 69 % порівняно з контрольною патологією та на 53 % порівняно з інтактним контролем, а також орієнтовно-дослідницьку активність (отвори) на 23 %, що свідчить про його седативну дію та співпадає з результатами дослідження психотропних властивостей пептидів [16]. Референс-препарат проявив лише тенденцію до нормалізації зазначених показників. Вегетативний супровід емоційних реакцій не змінився в жодній групі тварин, за винятком підвищення кількості дефекацій під дією пептиду КК-1 порівняно з контрольною патологією, що за даними літератури [15, 17] є проявом збільшення емоційної лабільності щурів за умов стресу або активації вегетативної нервової системи.

Аналіз результатів тесту «піднесений хрестоподібний лабіринт» свідчить про значне підвищення тривожності щурів на фоні гострого холодового стресу (табл. 4). У тварини групи контрольної

патології спостерігали скорочення латентного періоду входу до темної камери в 8,9 разу, зменшення часу знаходження в освітлених рукавах у 11,6 і збільшення часу перебування в темних рукавах у 1,1 разу (усі без винятку щури відразу втікали в темний рукав та не виходили з нього протягом усього часу дослідження). Пептиди КК-1, КК-5 та Семакс чинили виразну анксиолітичну дію, вірогідно відновлюючи основні маркери тривожності в тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту: збільшувався латентний період входу до темної камери під впливом пептиду КК-1 у 25,6 разу, пептиду КК-5 – у 22,9 разу, Семаксу – в 27 разів, значно подовжувався час перебування в освітлених рукавах в 40, 31 та 27 разів та зменшувався час знаходження в темних рукавах в 1,4; 1,3 та 1,2 разу відповідно. Такий характер змін зазначених показників є результатом підвищення поведінкової адаптації щурів

Таблиця 4

Показники поведінки щурів у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту за умов холодового стресу та впливу пептидів ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник (за 5 хв)	Група тварин				
	інтактний контроль	контроль-на патологія	пептид КК-1	пептид КК-5	Семакс
Латентний період входу до темної камери, с	19,40 ± 10,53	2,17 ± 0,98*	55,50 ± 36,08#	49,67 ± 26,17#	58,67 ± 30,21#
Час перебування в освітлених рукавах, с	25,20 ± 14,39	2,17 ± 0,98*	87,83 ± 45,89#	67,33 ± 25,56#	58,67 ± 30,21#
Час перебування в темних рукавах, с	274,80 ± 4,39	297,83 ± 0,98*	212,17 ± 45,89#	232,67 ± 25,56#	241,33 ± 30,21#
Кількість відвідувань освітлених рукавів	0,40 ± 0,24	0 ± 0	0,67 ± 0,33	0,83 ± 0,31#	0,50 ± 0,22
Кількість відвідувань темних рукавів	1,20 ± 0,20	1,0 ± 0	1,33 ± 0,21	1,83 ± 0,65	1,0 ± 0
Кількість відвідувань центрального майданчика	0,40 ± 0,24	0 ± 0	0,67 ± 0,33	0,67 ± 0,67	0 ± 0
Вегетативний супровід емоційних реакцій:					
болюси,	0 ± 0	0 ± 0	0,33 ± 0,21	0 ± 0	0,33 ± 0,33
уринації,	0,60 ± 0,24	0,50 ± 0,22	0,17 ± 0,17	0,17 ± 0,17	0 ± 0*
сума	0,60 ± 0,24	0,50 ± 0,22	0,50 ± 0,34	0,17 ± 0,17	0,33 ± 0,33

Примітка. *Відмінності, статистично значущі проти інтактного контролю ($p < 0,05$), #відмінності, статистично значущі проти контрольної патології ($p < 0,05$), n – кількість тварин у групі.

**Фізична витривалість щурів на моделі примусового плавання
з навантаженням і впливом пептидів після гострого холодового стресу
та впливу пептидів ($M \pm m$, $n = 6$)**

Група тварин	Час настання повного стомлення, хв
Інтактний контроль	$2,26 \pm 11,27$
Контрольна патологія	$1,27 \pm 0,101^*$
Пептид КК-1	$2,26 \pm 0,268^{\#}$
Пептид КК-5	$3,620 \pm 0,478^{*/\#/@}$
Семакс	$2,550 \pm 0,206^{\#}$

Примітка. *Відмінності, статистично значущі проти інтактного контролю ($p < 0,05$), $^{\#}$ відмінності, статистично значущі проти контрольної патології ($p < 0,05$), $^@$ відмінності, статистично значущі проти групи тварин, яка отримувала пептид КК-1, n – кількість тварин у групі.

після гострого стресу та проявом протитривожного ефекту речовин, що його виявлено в тварин інтактного контролю [17]. Пептид КК-5 також збільшував кількість відвідувань освітлених рукавів, що свідчить про активізацію дослідницької діяльності та прояв анксиолітичної дії. За протитривожними властивостями пептиди не поступаються препарату порівняння.

Гострий холодовий стрес знижував фізичну витривалість щурів у 1,8 разу за примусового плавання з навантаженням (табл. 5). Олігопептиди та Семакс чинили позитивний вплив на цей показник. Пептид КК-1 збільшував термін настання втоми в 1,8 разу, пептид КК-5 – у 2,9 разу, референс-препарат – у 2,0 разу. За позитивним впливом на цей показник пептиди не поступаються препарату порівняння. Однак актопротекторні властивості пептиду КК-5 вірогідно вищі порівняно як з пептидом КК-1, так і з інтактним контролем.

Таким чином, результати дослідження впливу пептидів на показник ректальної температури, поведінкові тести, тривожність і фізичну витривалість на тлі гострого холодового стресу свідчать про їхні високі стреспротекторні та фригопротекторні властивості. Попередження розвитку гіпотермії (відновлення ректальної температури) запобігає подальшим порушенням з боку нервової системи. Так, пептиди КК-1 і КК-5 нормалізують поведінкові реакції в тесті відкритого поля, що корелює з виразними анксиолітичними властивостями за тестом піднесеного хрестоподібного лабіринту. На тлі гострої гіпотермії пептидам притаманні виразні актопротек-

торні властивості за примусового плавання з навантаженням. Враховуючи результати попередніх досліджень [13, 17, 18], а також встановлену стреспротекторну та фригопротекторну дії на моделі гострого холодового стресу, доцільним є подальше поглиблене доклінічне вивчення пептидів КК-1 і КК-5 як перспективних стреспротекторів.

Висновки

1. Пептиди – гомологи фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ під шифрами КК-1 і КК-5 на фоні гострого холодового стресу – попереджають зниження ректальної температури щурів, не поступаючись Семаксу.
2. Пептиди КК-1 і КК-5 на фоні гострого холодового стресу нормалізують поведінкові та емоційні реакції щурів за результатами тесту «відкритого поля», перевершуючи ефект Семаксу, який лише виявив тенденцію до відновлення зазначених показників.
3. Пептиди КК-1 і КК-5 за тестом «піднесеного хрестоподібного лабіринту» виявляють виразний протитривожний ефект на рівні референс-препарату після гострого холодового стресу.
4. На моделі примусового плавання з навантаженням пептиди КК-1 і КК-5 підвищують фізичну витривалість щурів на рівні Семаксу. Пептид КК-5 за збільшенням часу настання повного стомлення перевершував пептид КК-1.
5. Результати проведених досліджень свідчать про потужні стреспротекторні та фригопротекторні властивості пептидів КК-1 і КК-5.

1. Киричек Л. Т. Лекарственный антистресс в эксперименте (иммобилизация, травма, воспаление) / Л. Т. Киричек, А. В. Перепилица, Р. О. Кальчук. – Харьков : ИПП «Контраст», 2016. – 104 с.
2. Киричек Л. Т. Стресспротекторы в эксперименте и в клинике / Л. Т. Киричек. – Харьков : ИПП «Контраст», 2008. – 304 с.
3. Воронина Т. А. Оксидативный стресс и антиоксиданты при экстремальных состояниях, сопровождающихся нейродегенерацией / Т. А. Воронина // Фармакология регуляторных нейропептидов. Российская научная конференция, посвященная 125-летию академика С. В. Аничкова : матер. конф. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Спецвыпуск 2, Т. 15. – С. 13–14.
4. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме / Г. Селье. – Москва : Медгиз, 1960. – 256 с.
5. Експериментальне вивчення нових адаптогенних засобів: методичні рекомендації / Л. В. Яковлева, О. Я. Міщенко, Ю. Б. Лар'яновська [та ін.]. – Київ, 2009. – 35 с.
6. Дмитриев А. Холодовые и тепловые травмы / А. Дмитриев // Гражданская защита. – 2012. – № 3. – С. 56–58.
7. Шигеев В. Б. Холодовая смерть / В. Б. Шигеев, С. В. Шигеев, Е. М. Колударова. – Москва : Новости, 2004. – 184 с.
8. Шабанов П. Д. Кортиколибериновые механизмы расширенной миндалины и гипоталамуса: участие в формировании стресса, подкрепления и действия наркогенов / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев // III Съезд фармакологов России : матер. съезда. Журнал психофармакологии и биологической наркологии. – 2007 – Спец. вып. (сент.), Ч. 2. – С. 2011.
9. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B / M. F. Dallman, S. F. Akana, C. S. Cascio [et al.] // Recent. Prog. Horm. Res. – 1987. – V. 43. – P. 113–173.
10. Стресспротекторные свойства олигопептидов-гомологов фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ / О. В. Кудина, С. Ю. Штрыголь, Ю. Б. Ларьяновская [и др.] // Фармакология регуляторных нейропептидов. Российская научная конференция, посвященная 125-летию академика С. В. Аничкова : матер. конф. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Спецвыпуск 2, Т. 15. – С. 39.
11. Бондарев Е. В. Влияние глюкозамина гидрохлорида на показатели углеводного обмена при острой холодовой травме у крыс / Е. В. Бондарев // Теоретическая и экспериментальная медицина, общественное здравоохранение, профилактика здорового образа жизни. – 2015. – № 1 (70). – С. 22–27.
12. Стресспротекторная активность синтетического пептида CH₃CO-Lys-Lys-Arg-Arg-NH₂ (протектина) / Ю. А. Ковалицкая, В. Б. Садовников, Ю. А. Золотарев [и др.] // Биоорганическая химия. – 2009. – № 4. – С. 493–500.
13. Кудіна О. В. Фармакологічне дослідження антиоксидантних властивостей нових олігопептидів – аналогів фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ на моделі гострого іммобілізаційного стресу / О. В. Кудіна, С. Ю. Штриголь, О. О. Колобов // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів. VI Науково-практична конференція з міжнародною участю: матер. конф. – 2016. – Тернопіль, 2016. – С. 334–335.
14. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекоменд.; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 527 с.
15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств; под ред. А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
16. Фармакологическая коррекция утомления / Ю. Г. Бобков, В. М. Виноградов, В. Ф. Катков [и др.]. – Москва : Медицина, 1984. – 207 с.
17. Дослідження психотропних властивостей та взаємодії з речовинами пригнічувальної дії нових олігопептидів, гомологічних первинній амінокислотній послідовності ділянки АКГГ₁₅₋₁₈ / Р. Д. Дейко, С. Ю. Штриголь, А. Н. Прусаков, О. О. Колобов // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 1 (36). – С. 14–20.
18. The screening study of stressprotective effect of new oligopeptides / O. V. Kudina, S. Yu. Shtrygol', V. V. Tsyvunin [et al.] // Topical issues of new drugs development. International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Students : abstracts. – Kharkiv, 2015. – P. 323.

О. В. Кудіна, С. Ю. Штриголь, О. О. Колобов

Доклінічне дослідження стресспротекторних властивостей олігопептидів – гомологів фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ на моделі гострого холодового стресу

Проведено вивчення впливу олігопептидів – гомологів фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ (лабораторні шифри КК-1, КК-5) на показники ректальної температури, поведінкові реакції, фізичну витривалість і тривожність за умов гострого холодового стресу в щурів (тварин розміщували в морозильній камері за температури -18 °C на 2 год).

Вплив пептидів на розвиток гіпотермії визначали за відновленням ректальної температури. Стреспротекторні властивості оцінювали за впливом на поведінкові реакції у тесті «відкрите поле» та тривожність тварин у тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт». Також вивчали вплив пептидів на фізичну витривалість на моделі примусового плавання з навантаженням (вантаж 7,5 % від маси тіла).

Олігопептиди – гомологи фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ і препарат порівняння «Семакс» попереджували розвиток гіпотермії, відновлюючи ректальну температуру.

У тесті «відкрите поле» олігопептиди вірогідно підвищували стресостійкість тварин, нормалізуючи поведінкові та емоційні реакції порівняно з тваринами групи контрольної патології. Результати цього тесту свідчать про виразні стреспротекторні властивості пептидів, на відміну від Семаксу, який викликав лише тенденцію до нормалізації стану центральної нервової системи тварин.

У тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт» встановлено стресогенний вплив гострого холодового стресу, про що свідчить скорочення латентного періоду входу до темної камери, зменшення часу знаходження в освітлених рукавах та збільшення часу перебування в темних рукавах. Пептиди КК-1, КК-5 і Семакс чинили виразну анксиолітичну дію, вірогідно відновлюючи основні маркери тривожності в тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт».

Стреспротекторні властивості пептидів і препарату порівняння підтверджуються вірогідним підвищенням адаптаційних можливостей щурів за примусового плавання з навантаженням.

Таким чином, олігопептиди – гомологи фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ під шифрами КК-1 і КК-5 виявляють виразні фригопротекторні та стреспротекторні властивості за умов гострого холодового стресу.

Ключові слова: стреспротектори, олігопептиди, холодовий стрес

О. В. Кудина, С. Ю. Штрыголь, А. А. Колобов

Доклиническое изучение стресспротекторных свойств олигопептидов – гомологов фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ на модели острого холодового стресса

Проведено изучение влияния олигопептидов – гомологов фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ (лабораторные шифры КК-1, КК-5) на показатели ректальной температуры, поведенческие реакции, физическую выносливость и тревожность крыс в условиях острого холодового стресса (животных помещали в морозильную камеру при температуре -18 °C на 2 ч).

Влияние пептидов на развитие гипотермии определяли по восстановлению ректальной температуры. Стресспротекторные свойства оценивали по влиянию на поведенческие реакции в тесте «открытое поле» и тревожность животных – в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Также изучали влияние пептидов на физическую выносливость на модели принудительного плавания с нагрузкой (груз 7,5 % от массы тела).

Олигопептиды – гомологи фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ и препарат сравнения «Семакс» предупреждали развитие гипотермии, восстанавливая ректальную температуру.

В тесте «открытое поле» олигопептиды достоверно повышали стрессостойкость животных, нормализуя поведенческие и эмоциональные реакции в сравнении с животными группы контрольной патологии. Результаты этого теста свидетельствуют о выраженных стресспротекторных свойствах пептидов в отличие от референс-препарата Семакса, который выявил лишь тенденцию к нормализации состояния центральной нервной системы животных.

По тесту «приподнятый крестообразный лабиринт» установлено стрессогенное влияние острого холодового стресса, о чем свидетельствует сокращение латентного периода входа в темную камеру, уменьшение времени нахождения в освещенных рукавах и увеличение времени пребывания в темных отсеках. Пептиды КК-1, КК-5 и Семакс оказывали выраженное анксиолитическое действие, достоверно восстанавливая маркеры тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Стресспротекторные свойства пептидов и препарата сравнения подтверждаются достоверным повышением адаптационных возможностей крыс в условиях принудительного плавания с нагрузкой.

Таким образом, олигопептиды – гомологи фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ под шифрами КК-1 и КК-5 проявляют фригопротекторные и стресспротекторные свойства в условиях острого холодового стресса.

Ключевые слова: стресспротекторы, олигопептиды, холодовый стресс

O. V. Kudina, S. Yu. Shtrygol', A. A. Kolobov

Preclinical investigation of stress-protective properties of oligopeptides – homologs of the ACTH₁₅₋₁₈ fragment on the model of acute cold stress

The influence of oligopeptides – homologues of the ACTH₁₅₋₁₈ fragment (laboratory ciphers КК-1, КК-5) on the rectal temperature, behavioral responses, physical endurance and anxiety of the rats under the influence of acute cold stress (animals were placed in a freezer at -18 °C for 2 h).

The effect of the peptides on the development of hypothermia was determined by restoring rectal temperature. Stress-protective properties were evaluated by the effect on behavioral responses in the «open field» test and anxiety of animals in the «elevated cross-shaped labyrinth» test. The effect of peptides on physical endurance on the forced-swim model with a load (weight 7,5 % of body weight) was studied also.

Oligopeptides – homologues of the ACTH₁₅₋₁₈ fragment and Semax prevented the development of hypothermia, restoring the rectal temperature.

Oligopeptides significantly increased the stress resistance of the animals, marked normalizing behavioral and emotional responses in the comparison with the control pathology group in the «open field» test. The results of this test indicate marked stress-protective properties of peptides, in contrast to the reference preparation Semax, which showed only a tendency to the normalization the state of the central nervous system of the animals.

According to the test of the «elevated cross-shaped labyrinth», a stressful influence of acute cold stress was established, as evidenced by a reduction in the latent period of entry into the dark chamber, a decrease in the time spent in clarified arms and an increase in the time spent in dark compartments. Peptides KK-1, KK-5 and Semax exerted a marked anxiolytic effect, reliably restoring the anxiety markers in the test of an «elevated cross-shaped labyrinth».

The stress-protective properties of peptides and the reference preparation are confirmed by a significant increase in the adaptive capacity of rats when the forced swimming with a load.

Thus, the oligopeptides – homologs of the ACTH₁₅₋₁₈ fragment under the codes KK-1 and KK-5 exhibit frigoprotective and stress-protective properties on the model of acute cold stress.

Key words: stressprotectors, oligopeptides, cold stress

Надійшла: 21 лютого 2018 р.

Контактна особа: Кудіна О. В., Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 35 81.

Н. М. Серединська, М. А. Мохорт, Л. М. Киричок,
В. С. Хоменко, Т. А. Бершова, О. С. Суворова

Протибольова активність лефлуноміду за комбінованого застосування з целекоксибом та амлодипіном на тлі експериментального ревматоїдного артриту, асоційованого з артеріальною гіпертензією

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

*Ключові слова: лефлуномід, амлодипін,
целекоксиб, протибольова активність,
ревматоїдний артрит, артеріальна
гіпертензія*

Однією з найактуальніших проблем сучасної медицини є регуляція запальних процесів, серед яких ревматоїдний артрит (РА), що відноситься до хронічного запального захворювання, зумовленого активацією та проліферацією імунокомпетентних клітин (макрофагів, Т- та В-лімфоцитів) з виділенням клітинних медіаторів – цитокінів. Запальний процес призводить до проліферації клітин синовіальної рідини, ангіогенезу, агресивного («псевдопухлинного») розростання сполучної тканини, що, у свою чергу, викликає деструкцію нормальних тканин і виникнення деформацій суглобового хряща та кістки, та супроводжується системними запальними реакціями. Зазначені патогенетичні аспекти РА обґрунтовують основи патогенетичної фармакотерапії.

Для фармакологічної корекції РА використовуються як базисні препарати (їх називають хворобомодифікуючими), серед яких амінохінолінові препарати, цитостатичні імуносупресанти, препарати золота, антибіотики, сульфаніламід, препарати біологічного походження, так і протизапальні (їх відносять до симптоматичних, на наш погляд – умовно) – нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) та глюкокортикоїди [1, 2]. Базисні препарати різних класів хіміч-

них сполук широко та тривалий час застосовуються клініцистами, але недостатня їхня ефективність, низка побічних ефектів, індивідуальна непереносимість, відсутність у багатьох випадках клінічної відповіді в пацієнтів змушують науковців на основі вивчення механізмів розвитку РА створювати нові ліки.

Позитивні зміни в терапії РА відбулися за впровадження в практику генно-інженерних імуносупресорів – препаратів біологічного походження. Вони здійснюють спрямоване блокування ключових ланок запалення за допомогою антитіл або розчинних рецепторів цитокінів, а також інших біологічно активних речовин [3, 4].

Водночас не всі відомі сьогодні медицині біологічні препарати зареєстровані в Україні. Не в усіх пацієнтів спостерігається належна клінічна відповідь на введення цих препаратів, і нерідко вони потребують відміни через побічну дію, індивідуальну чутливість тощо. Крім того, лікування цими препаратами є вельми вартісним для пацієнтів України. Усе це зумовлює необхідність застосування імуносупресорів синтетичного походження, зокрема, препарату, що був синтезований і впроваджений саме для лікування РА, лефлуноміду (ЛФ) [5–8]. Антипроліферативна дія цього препарату досягається, зокрема, блокадою синтезу піримідинового шляхом інгібіції дигідрооротатдегідрогенази. Цей імуносупресор застосовується самостійно та з іншими хворобомодифікуючими та/або протизапальними засобами (наприклад,

метотрексатом, НПЗП), що сприяє взаємопосиленню ефективності зазначених комбінацій за відсутності фармакокінетичної взаємодії, зокрема, між ЛФ і метотрексатом [9]. Посилюються проліферативна та протизапальна дії ЛФ у разі застосування з біологічними препаратами [11]. *In vivo* продемонстровано взаємодію між ЛФ і контрацептивами. Відомо щодо підвищення протромбінового часу за використання цього імуносупресора з варфарином. Водночас немає достатньо доказових даних щодо використання ЛФ з протималярійними засобами, сульфаніламидами, препаратами золота, азатіоприном й іншими базисними препаратами для лікування РА.

Отримання інформації щодо взаємодії ЛФ з препаратами різних фармакотерапевтичних груп є вельми актуальним для клініцистів і пацієнтів через те, що власне РА у більшості випадків супроводжується низкою асоційованих захворювань, зокрема, серцево-судинної системи [11–13].

Враховуючи те, що за коморбідних станів реєструється висока смертність, і саме кардіоваскулярні захворювання, що нерідко спричинені запальним процесом, є основною причиною летальності, необхідно адекватно та своєчасно коригувати фактори ризику – артеріальну гіпертензію (АГ), дисліпідемію, атеросклероз, цукровий діабет тощо [13, 14]. Особливої уваги потребує терапія не лише власне клінічних проявів РА в пацієнтів з серцево-судинною патологією, а й фармакологічна корекція, зокрема, АГ, що реєструється в понад 65 % хворих на РА [15, 16]. Однак дані щодо характеру взаємодії ЛФ з гіпотензивними препаратами фактично відсутні.

Особливого значення набувають питання щодо збереження та ступеня прояву протизапальної дії імуносупресорів (ЛФ) за комбінованого застосування з блокаторами кальцієвих каналів дигідропіридинового ряду, ефективність (гіпотензивна дія, зокрема) та відносна безпечність яких доведена клінічним досвідом. Найширше застосування серед гіпотензивних препаратів цього хімічного ряду має амлодипін

(АМ). Використання АМ як антигіпертензивного засобу є найдоказовішим сьогодні та рекомендовано Європейським товариством кардіологів//Європейським товариством гіпертензії (ESC/ESH), Об'єднаним національним комітетом 8 (США) (JNCA8) й Американським товариством гіпертензії / Міжнародним товариством гіпертензії (ASH/ISH) як засобу монотерапії, так і в складі комбінацій [17]. Популярність АМ обумовлена доказовою базою щодо його ефективності в попередженні кардіоваскулярних катастроф. Діапазон показань для застосування АМ ширший за інші антагоністи кальцію дигідропіридинового ряду. Важливо, що АМ має великий період виведення за АГ (до 64 год), що забезпечує його тривалий ефект. Даний препарат не метаболізується в печінці, має високу біодоступність, що також може бути позитивним моментом за умов його комбінованого застосування з імуносупресорами, що можуть спричинювати гепатотоксичний ефект [18]. До речі, АМ рекомендують для включення в комбіновані препарати, що в клінічних умовах застосовують для досягнення пацієнтами цільового рівня артеріального тиску [19].

Результати попередніх досліджень засвідчили, що АМ змінює (посилює) знеболювальну та протинабрякову дії НПЗП [17], а власне клінічні симптоми РА (зокрема, біль, набряк) обґрунтовують необхідність їхнього як самостійного застосування, так і разом з ЛФ. Невідомо, як впливатиме АМ на здатність імуносупресорів і НПЗП пригнічувати запалення та спричинювати знеболювальний ефект. Ефективність специфічних інгібіторів ЦОГ-2 за РА, зокрема, целекоксибу (ЦК), що підтверджена в чисельних клінічних дослідженнях з високим ступенем доказовості, відносна кардіобезпечність [20] зумовлюють можливість застосування, у тому числі за коморбідних станів. Водночас немає достатньої інформації щодо ефективності та безпечності за комбінованого використання ЛФ, ЦК та АМ на тлі РА, поєднаного з АГ. Особливого значення набувають питання взаємодії цих препаратів

за умов тривалої терапії, чого вимагає зазначений коморбідний стан [21, 22].

Мета дослідження – вивчити знеболюючу активність ЛФ, ЦК та АМ за умов їхнього комбінованого застосування на моделі експериментального РА, поєднаного з АГ.

Матеріали та методи. Досліди проведено на статевозрілих нелінійних білих щурах обох статей з вихідною масою ($201,56 \pm 2,42$) г, яких утримували на стандартному раціоні харчування у віварії за умов вільного доступу до їжі та води.

Після акліматизації тварин (14 дів) у лабораторному приміщенні методом випадкової вибірки відібрано 10 щурів (по 5 особин кожної статі), які знаходилися в однакових умовах з тваринами інших груп – щури першої (інтактної) групи. До другої групи віднесено 15 білих щурів, яким було введено підшкірно в підшовну частину задньої кінцівки (лівої) повний ад'ювант Фрейнда (АФ) з метою моделювання ад'ювантного артриту (АА), що, за даними літератури, є одним з найадекватніших агентів, здатних відтворювати згаданий патологічний стан [23, 24]. Тварини цієї групи не підлягали сольовому навантаженню.

В інших тварин сфігмоманометричним методом встановлені вихідні значення артеріального тиску, після чого в них шляхом сольового навантаження (сольове пиття з вільним доступом до нього впродовж 21 доби) викликали АГ [25, 26]. Через 21 добу за умов реєстрації артеріального тиску визначено тварин, у яких спостерігалася АГ. Тварини, в яких не реєстрували підвищення артеріального тиску через 21 добу після початку сольового навантаження, до розподілу за групами не входили та були вилучені з дослідів.

Білі щури з АГ розподілені за групами, кожна з яких включала майже однакове число щурів кожної статі. До третьої групи віднесено 15 щурів з АГ, яким продовжували сольове навантаження та не застосовували будь-які лікувальні заходи (контроль на АГ). До четвертої групи входили тварини (15 особин), яким на тлі АГ (через 21 добу після початку формування моделі АГ)

одноразово вводили повний АФ, формуючи таким чином коморбідний стан – АГ + АА.

До п'ятої, шостої, сьомої та восьмої груп входили тварини (по 15 щурів у кожній групі), яким на тлі розвитку коморбідного стану вводили ЛФ (Лефно, «Кусум фарма»), ЛФ з АМ (ЛФ+АМ), ЛФ з ЦК (ЛФ+ЦК) та ЛФ з ЦК і з АМ (ЛФ+ЦК+АМ) відповідно. До дев'ятої групи віднесено 15 щурів, яким на тлі монопатології (АА, тобто тварини без АГ) вводили ЛФ.

Застосування ЛФ відбувалося наступним чином: перші три дні – у дозі 15 мг/кг (ударна доза), а далі – щоденно в дозі 1,5 мг/кг (терапевтична доза). Лікарські засоби ЦК і АМ застосовувалися щоденно в терапевтичних дозах у перерахунку на тварин – для ЦК – 15 мг/кг, для АМ – 1,5 мг/кг маси тіла тварини.

Усі лікарські засоби вводили через спеціальний металевий зонд у шлунок у 1 % крохмальному завісі 1 раз на 1 добу (з 10 до 11 год). Лікування тварин усіма препаратами розпочинали через 7 дів після введення АФ (гострий період АА).

За умов комбінованої терапії з використанням препаратів різних фармако-терапевтичних груп (ЛФ з АМ, або ЛФ з ЦК, або ЛФ з ЦК та АМ) лікарські засоби вводили також щоденно, 1 раз на добу (з 10 до 11 год), але по черзі, один за одним з інтервалом у 40 хв.

Знеболювальну активність лікарських засобів досліджували за тестом «tail flick» й оцінювали за показником порога больової чутливості (ПБЧ, с) на анальгезиметрії Ugo Basil (Італія) з визначенням вихідного ПБЧ у всіх тварин та подальшим формуванням груп лише з тих тварин, у яких реєстрували вихідне значення ПБЧ від 4 до 16 с.

Тривалість спостереження за тваринами та реєстрації ПБЧ складала 12 тижнів від початку моделювання АГ, з них – 21 доба (3 тижні) для формування АГ, далі – 9 тижнів після введення АФ на тлі сформованої АГ (у тому числі 8 тижнів лікування, яке розпочали через 7 дів після введення АФ).

Реєстрацію ПБЧ здійснювали в тварин усіх груп (вихідні дані), через

21 добу (3 тижні) від початку сольового навантаження (у щурів зі сформованою АГ), а також через 1, 2, 4, 6, 8, 9 тижнів після введення АФ (цей тест-зразок вводили одноразово на 21 добу після початку сольового навантаження, тобто – на тлі сформованої АГ). Тривалість застосування ЛФ (щоденно впродовж 8 тижнів) зумовлені тим, що перший клінічний ефект від застосування цього препарату, як зазначається в літературі, слід очікувати через 2–4 тижні, а виразний ефект – через 6–8 тижнів. Тривалість і спосіб застосування досліджуваних лікарських засобів зумовлена також фазністю патологічного процесу (АА). Саме максимум розвитку місцевої реакції на введення АФ спостерігається на 7–14 добу в гострий період ревматичного процесу. Період 14–35–49 доби є термінами, коли відбувається генералізація експериментального РА, а період 49–60 доби після введення повного АФ характеризується як згасання патологічного процесу, що виник за умов одноразового введення патогенного фактора.

Статистичну обробку даних здійснювали з визначенням нормальності розподілу, що оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk (W). Отримані значення ПБЧ характеризувалися нормальним розподілом і представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Вірогідність між середніми значеннями в двох вибірках

визначали за критерієм Стьюдента за нормального розподілу. Статистично значущими вважали відмінності за рівня значущості не менше ніж 0,05.

Результати та їх обговорення. В інтактних тварин спостерігалися незакономірні та статистично незначимі зміни ПБЧ (табл.1). Вплив патогенного агента – АФ, що спричинював розвиток експериментального РА, характеризувався зниженням ПБЧ у щурів, починаючи з перших днів після ураження; цей показник у гострий період АА – 7–14 доба – знижувався на 39,7–62,6 % порівняно з вихідними значеннями та показниками інтактних тварин.

За розвитку АГ (упродовж 21 доби) спостерігалось підвищення ПБЧ у щурів на 26–30 % відносно вихідних даних, що є свідченням зниження больового відчуття в тварин. Зазначена зміна ПБЧ була статистично достовірною порівняно з даними в інтактних тварин на 21 добу спостереження та тварин з АА.

Упродовж наступного терміну спостереження (з 22-ї до 81-ї доби) ПБЧ інтактних тварин та щурів з АГ, які продовжували знаходитися в умовах сольового навантаження ще 60 днів (загальний термін сольового навантаження складав 81 добу), не реєструвалось достовірних змін ПБЧ (табл. 2; вихідні значення ПБЧ у цій таблиці відповідають тим, що зареєстровані на 21 добу – завершення формування АГ, за винятком групи тварин з АА без АГ).

Таблиця 1

Динаміка порога больової чутливості в щурів за ад'ювантного артриту та за формування артеріальної гіпертензії шляхом сольового навантаження впродовж 21 доби, с ($M \pm m$)

Група, кількість тварин (n), %	Термін спостереження, доба			
	вихідні дані	7	14	21
Інтактні, n % (до вихідних даних)	9,39 ± 0,3 10	9,7 ± 1,1 10 3,3	9,8 ± 1,1 10 4,3	9,4 ± 0,2 10 0,1
Ад'ювантний артрит, n %	9,07 ± 0,02 15	3,39 ± 0,5 15 -62,6	5,47 ± 0,70* 15 -39,7	5,7 ± 0,5* 15 -37,2
Артеріальна гіпертензія, n % змін (до вихідних даних)	9,07 ± 0,02 15	11,60 ± 0,02* ^Δ 15 27,9	11,50 ± 0,02* ^Δ 15 26,8	11,8 ± 0,3* ^{#Δ} 15 30,1

Примітка. * $p \leq 0,05$ відносно вихідних значень у тварин даної групи, * $p \leq 0,05$ відносно значень у інтактних тварин на відповідний термін спостереження, ^Δ $p \leq 0,05$ відносно даних у тварин з АА.

Суттєве зниження ПБЧ спостерігалось впродовж маніфестації АА: він був на 27–37 % нижчим за вихідні значення, що свідчить про зростання больової чутливості в білих щурів на тлі АА. Відновлення цього показника відбулося в період згасання АА – на 60 добу після введення АФ.

У білих щурів на тлі коморбідної патології ПБЧ зростав у всі терміни спостереження, а найсуттєвішими ці зміни були в період маніфестації власне АА на тлі АГ, коли цей показник збільшувався на 22,3 % (табл. 2 – 42 доба після введення АФ), що свідчить про значне зниження больової чутливості в щурів на тлі поєднаної патології.

Таким чином, як у щурів з АГ, так і в тварин з поєднаною патологією (АГ з АА) зростав ПБЧ, що свідчить про зниження больової чутливості. Вочевидь,

власне АГ призводить до зниження больового відчуття в щурів, тому що лише в щурів з АГ знижувалася больова чутливість. Механізм цього явища невідомий і потребує спеціального дослідження. Можливо, він зумовлений набряком кінцівок унаслідок затримки рідини за АГ та зниженням чутливості ноцицепторів.

Імуносупресор ЛФ суттєво підвищував ПБЧ у білих щурів як на тлі лише АА, так і за умов асоційованої патології. У гострий період розвитку АА на тлі АГ (14 доба) ЦК, а в період генералізації АА – АМ сприяли підвищенню ПБЧ (посиленню дії ЛФ) порівняно до значень у тварин, які отримували лише ЛФ.

Комбіноване застосування трьох препаратів не призводило до суттєвого зростання ПБЧ у щурів порівняно з даним показником, коли застосовувався лише

Таблиця 2

Динаміка порога больової чутливості в щурів з експериментальним ревматоїдним артритом, поєднаним з артеріальною гіпертензією, за умов лікування лефлуномідом, целекоксибом та амлодипіном, с ($M \pm m$)

Група	Термін спостереження, доба ^а				
	Вихідні дані (21 доба АГ)	14 (21 + 14)	28 (21 + 28)	42 (21 + 42)	60 (21 + 60)
Інтактні	9,4 ± 0,2	9,8 ± 0,3	8,9 ± 0,1	9,4 ± 0,2	9,7 ± 0,4
Ад'ювантний артрит ^б	5,7 ± 0,5*	5,90 ± 0,50*	5,97 ± 0,70*	6,6 ± 0,5*	8,9 ± 0,6
Артеріальна гіпертензія	11,8 ± 0,3 [#]	10,7 ± 1,0 [#]	10,7 ± 0,8 [#]	11,3 ± 0,6 [#]	11,1 ± 0,4 [#]
Коморбідна патологія	11,2 ± 0,3	12,0 ± 0,9 [#]	11,2 ± 0,9 [#]	13,7 ± 1,0 ^{#Δ}	11,2 ± 0,7 [#]
Ад'ювантний артрит + Лефлуномід	3,39 ± 0,50 ^б	12,2 ± 0,4 [#]	13,6 ± 0,5* ^{#Δ□}	13,4 ± 0,7* ^{#Δ}	12,6 ± 0,9 [#]
Коморбідна патологія + Лефлуномід	11,2 ± 0,3	12,2 ± 0,5 [#]	12,2 ± 0,5 [#]	12,6 ± 0,7 [#]	12,4 ± 0,7 [#]
Коморбідна патологія + Лефлуномід + Целекоксиб	11,2 ± 0,3	13,7 ± 0,9 ^{#Δ}	12,1 ± 0,4 [#]	12,5 ± 0,5 [#]	12,0 ± 0,5 [#]
Коморбідна патологія + Лефлуномід + Амлодипін	11,2 ± 0,3	12,5 ± 0,5* ^{#Δ}	13,6 ± 0,5* ^{#Δ□}	14,1 ± 0,9* ^{#Δ}	12,0 ± 0,5 [#]
Коморбідна патологія + Лефлуномід + Целекоксиб + Амлодипін	11,2 ± 0,3	12,5 ± 0,6* [#]	12,9 ± 0,5* ^{#Δ}	12,5 ± 0,8* [#]	12,1 ± 0,6* [#]

Примітки. * $p \leq 0,05$ відносно вихідних даних (на 21 добу) у щурів зазначеної групи, [#] $p \leq 0,05$ відносно даних у тварин лише з АА (без лікування), ^Δ $p \leq 0,05$ відносно даних у тварин лише з АГ, [□] $p \leq 0,05$ відносно даних у тварин з поєднаною патологією, ^бзначення ПБЧ через 7 діб після введення АФ – початок лікування ЛФ, ^ау дужках зазначено загальний термін спостереження за тваринами (від початку формування АГ); інші числа у графі означають термін після уведення АФ. ^бтварини зазначеної групи спостерігалися лише впродовж 60 діб після уведення АФ (щурів без АГ); значимість результату обрахована відносно вихідних даних (9,07 ± 0,02) для щурів цієї групи.

ЛФ. Водночас зменшення знеболювальної дії ЛФ не спостерігалось, що обґрунтовує можливість комбінованого використання досліджуваних засобів (ЦК та АМ) за необхідності застосування останніх за відповідними специфічними для цих препаратів показаннями на тлі коморбідного стану.

Отримані дані можуть бути врахованими за умов призначення лікарських засобів досліджуваних фармакотерапевтичних груп. Імуносупресор ЛФ зберігає знеболювальну дію за комбінованого застосування з ЦК та АМ. Вочевидь, АМ більшою мірою сприяє посиленню анагетичної активності за комбінованого застосування з ЛФ, ніж ЦК. Застосування ЦК на тлі лікування ЛФ з метою зменшення больового відчуття на тлі коморбідної патології виправдане лише в гострий період розвитку АА на тлі АГ (до 14 доби). Використання АМ за необхідності його застосування за основним призначенням (як гіпотензивного засобу) можливе ще й з метою посилення знеболювальної дії ЛФ. Водночас питання щодо збереження гіпотензивної активності в АМ на тлі поєднаної патології за комбінованого застосування з ЛФ потребують з'ясування.

Висновки

1. Больова чутливість у щурів знижується як за умов АГ, так і на тлі експериментального коморбідного стану – АГ, поєднаної з РА.
2. ЛФ суттєво підвищує ПБЧ у білих щурів як на тлі лише АА, так і за умов асоційованої патології.
3. Комбіноване застосування ЦК і ЛФ з метою зменшення больового відчуття виправдане лише в гострий період розвитку АА на тлі АГ.
4. АМ більшою мірою сприяє зростанню ПБЧ у щурів за комбінованого застосування з ЛФ, ніж ЦК, у період генералізації АА на тлі АГ, що обґрунтовує доцільність його застосування з метою посилення знеболювальної дії ЛФ за необхідності його призначення за основним показанням (як гіпотензивного засобу).
5. Комбіноване застосування трьох препаратів (ЛФ, ЦК та АМ) з метою зменшення больового синдрому є недоцільним через відсутність суттєвого зростання ПБЧ у щурів з коморбідним станом відносно значень цього показника, зареєстрованого у тварин, лікованих лише ЛФ.

1. American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis / J. A. Singh, D. E. Furst, A. Bharat [et al.] // *Arthritis Care Res.* – 2012. – V. 64, № 5. – P. 625–639.
2. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review in forming the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis / C. Gaujoux-Viala, J. Smolen, R. Landewe [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – V. 69 – P. 1004–1009.
3. Коваленко В. Н. Современные мишени для целевой терапии ревматоидного артрита: от моноклональных антител до блокаторов сигнальных молекул / В. Н. Коваленко, И. Ю. Головач, О. П. Борткевич // *Український ревматологічний журнал.* – 2012. – Т. 49, № 3. – С. 5–15.
4. Garces S. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory disease: a systematic review of the literature with a meta-analysis / S. Garces, J. Demenqueot, E. Bentio-Garcia // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – V. 72, № 12. – P. 1947–1955.
5. Бадюкин В. В. Лефлуноמיד – модификатор течения и исходов ревматоидного артрита / В. В. Бадюкин // *Эффективная фармакотерапия. Ревматология. Травматология. Ортопедия.* – 2015. – № 3–4 (47). – С. 20–28.
6. Лефлуноמיד: токсические особенности / О. Н. Воловикова, Е. И. Михайлова, Г. Г. Дундарова, Е. Э. Карпенко // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2014. – № 4 (42). – С. 30–34.
7. Олюнин Ю. А. Лефлуноמיד в клинической практике / Ю. А. Олюнин // *Современная ревматология.* – 2014. – № 8 (1). – С. 59–63.
8. Эффективность и безопасность лефлуномида при ревматоидном артрите: результаты Российского наблюдательного многоцентрового исследования / Р. М. Балабанова, Т. В. Дубинина, Д. В. Горячев [и др.] // *Современная ревматология.* – 2015. – № 9 (2). – С. 33–36.
9. Коваленко В. Н. Новая стратегия терапии ревматоидного артрита (на основании пересмотра рекомендаций Европейской антиревматической лиги по лечению синтетическими и биологическими базисными болезнью-модифицирующими антиревматическими препаратами / В. Н. Коваленко, О. П. Борткевич, Ю. В. Белявская // *Український ревматологічний журнал.* – 2013. – № 4 (54). – С. 97–104.

10. Насонов Е. Л. Комбинированная терапия ритуксимабом и лефлуномидом при ревматоидном артрите (предварительные результаты российского АРБИТР) / Е. Л. Насонов, Г. В. Лукина, Я. А. Сигидин // Научно-практическая ревматология. – 2011. – № 1. – С. 16–20.
11. Коморбидность при ревматоидном артрите / Т. А. Панафидина, Д. С. Новикова, Т. В. Попкова [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2014. – Т. 52, № 3. – С. 283–289.
12. Хіміон Л. В. Коморбідність при ревматичних захворюваннях / Л. В. Хіміон, І. В. Климась // Український ревматологічний журнал. – 2015. – Т. 62, № 4. – С. 15–18.
13. Atar D. «Treat to target»: moving targets from hypertension, hyperlipidaemia and diabetes to rheumatoid arthritis / D. Atar, K. I. Birkeland, T. Uhlig // Ann. Rheum. Dis. – 2010. – № 69. – P. 629–630.
14. Попкова Т. В. Кардиоваскулярные факторы риска при ревматических заболеваниях: связь с воспалением / Т. В. Попкова, Д. С. Новикова, Е. Л. Насонов // Cons. Medicum. – 2010. – № 2. – С. 112–118.
15. Гордеев А. В. Мультиморбидная среда обитания: адалимумаб в лечении пациентов с ревматическими и другими сопутствующими заболеваниями / А. В. Гордеев // Эффективная фармакотерапия. Ревматология. Травматология. Ортопедия. – 2015. – № 47. – С. 34–37.
16. Рудюк Л. І. Особливості лікування артеріальної гіпертензії при ревматоїдному артриті / Л. І. Рудюк // Український ревматологічний журнал. – 2012. – № 48 (2). – С. 53–55.
17. Долженко М. Н. Различия в ведении пациентов с артериальной гипертензией в европейских и американских рекомендациях: украинский выбор / М. Н. Долженко // Здоров'я України. – 2014. – № 15–16 (340–341). – С. 17–18.
18. Балабанова Р. М. Влияние селективных ингибиторов ЦОГ-2 на сердечно-сосудистую систему при ревматических заболеваниях / Р. М. Балабанова // Современная ревматология. – 2010. – № 2. – С. 88–93.
19. Колесник, Т. В. Комбинированная терапия в лечении артериальной гипертензии / Т. В. Колесник // Здоров'я України 21 сторіччя. – 2016. – № 13–14 (386–387), липень. – С. 29.
20. Кардіотропна дія цеλεкоксибу за комбінованого застосування з амлодипіном у щурів на тлі ад'ювантного артриту, поєднаного з артеріальною гіпертензією / Н. М. Серединська, А. А. Сушинська, В. С. Хоменко [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2016. – № 1. – С. 91–97.
21. Порівняльна оцінка протизапальної активності німесулід, диклофенаку та амлодипіну за ад'ювантного артриту / Н. М. Серединська, Л. М. Киричок, М. А. Мохорт, Г. В. Павлюк // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 2. – С. 65–69.
22. Серединская Н. Н. Анальгетическая активность Амлодипина при адьювантном артрите / Н. Н. Серединская, А. В. Павлюк, Л. М. Киричок // Curierul medical. – 2013. – V. 56, № 4. – P. 28–31.
23. Саратиков А. С. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия) / А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, Т. П. Прищеп. – Томск, 1983. – 104 с.
24. Tanushree R. Animal models of rheumatoid arthritis: correlation and usefulness with human rheumatoid arthritis / R. Tanushree, G. Saikat // Am. J. Pharm. Res. – 2013. – V. 3, № 8. – P. 6131–6142.
25. Badyal D. K. Animal models of hypertension and effect of drugs / D. K. Badyal, H. Lata, A. P. Dadhich // Indian J. Pharmacol. – 2003. – № 35. – P. 349–362.
26. Dornas W. C. Animal models for study of arterial hypertension / W. C. Dornas, M. E. Silva // J. Biosci. – 2011. – V. 36, № 4. – P. 731–737.

**Н. М. Серединська, М. А. Мохорт, Л. М. Киричок, В. С. Хоменко,
Т. А. Бершова, О. С. Суворова**

Протибольова активність лефлуноміду за комбінованого застосування з цеλεкоксибом та амлодипіном на тлі експериментального ревматоїдного артриту, асоційованого з артеріальною гіпертензією

Стаття присвячена дослідженню протибольової активності синтетичного імуносупресора лефлуноміду за комбінованого застосування з цеλεкоксибом та амлодипіном на тлі експериментального ревматоїдного артриту, поєднаного з артеріальною гіпертензією. Больова чутливість у щурів знижується як за умов артеріальної гіпертензії, так і на тлі експериментального коморбідного стану. Лефлуномід суттєво підвищував поріг больової чутливості в щурів як на тлі лише ад'ювантного артриту, так і за умов асоційованої патології. За комбінованого застосування з лефлуномідом цеλεкоксиб у гострий період розвитку ад'ювантного артриту на тлі артеріальної гіпертензії сприяв підвищенню порога больової чутливості порівняно до значень у тварин, які отримували лише імуносупресор, що обґрунтовує доцільність застосування цеλεкоксибу з лефлуномідом з метою зменшення больового відчуття саме впродовж цього періоду. Амлодипін більшою мірою, ніж цеλεкоксиб, сприяв зростанню порога больової чутливості в щурів за комбінованого застосування з лефлуномідом у період генералізації ад'ювантного артриту, що обґрунтовує його застосування з метою посилення знеболювальної дії лефлуноміду за необхідності його призначення за основним показанням (як гіпотензивного засобу).

Ключові слова: лефлуномід, амлодипін, цеλεкоксиб, протибольова активність, ревматоїдний артрит, артеріальна гіпертензія

**Н. Н. Серединская, Н. А. Мохорт, Л. М. Киричок, В. С. Хоменко,
Т. А. Бершова, А. С. Суворова**

Противоболевая активность лефлуномида при комбинированном применении с целекоксибом и амлодипином на фоне экспериментального ревматоидного артрита, ассоциированного с артериальной гипертензией

Статья посвящена исследованию протиболовой активности синтетического иммуносупрессора лефлуномида при комбинированном применении с целекоксибом и амлодипином на фоне экспериментального ревматоидного артрита, сочетанного с артериальной гипертензией. Болевая чувствительность у крыс снижалась как при артериальной гипертензии, так и на фоне экспериментального коморбидного состояния. Лефлуномид существенно повышал порог болевой чувствительности у крыс и при адьювантном артрите, и при ассоциированной патологии. При комбинированном применении с лефлуномидом целекоксиб способствовал повышению порога болевой чувствительности во время острого периода развития адьювантного артрита на фоне артериальной гипертензии по сравнению с данными у животных, получавших только иммуносупрессор, что обосновывает целесообразность комбинированного применения этих препаратов с целью уменьшения болевой реакции в течение указанного периода. Амлодипин в большей степени, чем целекоксиб, способствовал возрастанию порога болевой чувствительности у крыс при комбинированном применении с лефлуномидом в период генерализации адьювантного артрита, что оправдывает его применение с целью усиления противоболевого действия лефлуномида при необходимости его назначения по основному показанию (как гипотензивного препарата).

Ключевые слова: лефлуномид, амлодипин, целекоксиб, противоболевая активность, ревматоидный артрит, артериальная гипертензия

**N. M. Seredinska, N. A. Mokhort, L. M. Kirichok, V. S. Khomenko,
T. A. Bershova, A. S. Suvorova**

Analgesic activity of leflunomide in combination with celecoxib and amlodipine under experimental rheumatoid arthritis associated with arterial hypertension

The article is devoted to the study of analgesic activity of a synthetic immunosuppressant leflunomide in combination with celecoxib and amlodipine under experimental rheumatoid arthritis associated with arterial hypertension. Pain sensitivity in rats decreases both under conditions of arterial hypertension and at the experimental comorbid state. Leflunomide significantly increased the threshold of pain sensitivity in rats, both at adjuvant arthritis and under the conditions of associated pathology. In combination with leflunomide, celecoxib in the acute period of adjuvant arthritis associated with arterial hypertension contributed to the increase of the threshold of pain sensitivity compared with values in animals that were taken only immunosuppressive drugs, substantiating the feasibility of celecoxib use with leflunomide to reduce pain during this particular period. Amlodipine is more than celecoxib contributed to increase of the threshold of pain sensitivity in rats in combination with leflunomide during the generalization of adjuvant arthritis, justifying its use in order to increase the analgesic effect of leflunomide, if necessary on the main indication (as a hypotensive agent).

Key words: leflunomide, amlodipine, celecoxib, analgesic activity, rheumatoid arthritis, arterial hypertension

Надійшла: 7 березня 2018 р.

Контактна особа: Серединська Наталія Миколаївна, доктор медичних наук, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057.
Тел.: + 38 0 44 456 84 72.

A. I. Soloviev

The BK_{Ca} channels deficiency and high protein kinase C activity as a main reasons for radiation-induced vascular hypercontractility

Institute of Pharmacology and Toxicology, National Academy of Medical Science, Kiev

Key words: smooth muscle contractility, RNA interference, BK_{Ca} channels, irradiation, calcium sensitivity, contractile proteins, hypertension

Introduction

One of the main clinical manifestations of ionized irradiation in case of nuclear accidents or radiation beam therapy in patients with neoplasm is a local (cardiac ischemia and arrhythmias) or generalized (arterial hypertension) vasospasm development which seriously complicates the course and the treatment of the main disease. It was clearly demonstrated that even single dose non-fatal whole-body ionized irradiation of rats in dose of 5–6 Gy led to a sustained arterial blood pressure elevation and abnormalities in vascular contractility [1]. One of the leading causes of radiation-dependent deaths in bomb survivors from Hiroshima and Nagasaki [2] and survivors of Chernobyl accident [3] is associated with cardiovascular unwanted events.

Having this fact established we have focused on underlie mechanisms. For instance, we demonstrated that an increased contractility of blood vessels following irradiation may be due to selective inhibition of EDRF (NO) – dependent, but not EDHF – dependent, relaxation in irradiated vascular tissues [4].

Then, we tested a possible involvement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channels (BK_{Ca} channel), which appear to be a possible radiation target in vascular system. It is known that BK_{Ca} channelopathy is involved in a number of vascular disorders including diabetes and arterial hypertension [5, 6]. We have shown recently that BK_{Ca} channels play an important role in radiation-induced vascular abnormali-

ties. The data obtained clearly indicate the decrease of outward current density in both endothelial [7] and smooth muscle cells (SMCs) accompanied with diminished BK_{Ca} mRNA expression [8].

It is well known that the native BK_{Ca} channel is composed by at least two distinct integral membrane subunits: the pore-forming (ion-conducting) α -subunit (KCNMA1) and a regulatory β -subunit (KCNMB1-4). The α -subunit is the minimal molecular component for BK_{Ca} channel activity and a functional channel can be formed with four α -subunits. Mammalian BK_{Ca} channel α -subunit is encoded by a single gene called KCNMA1, which was formerly named as Slowpoke, Slo or Slo1 [9, 10]. That is why we have focused our studies to α -subunit changes under irradiation.

Taking into account the molecular structure of BK_{Ca} and the ability of small interference RNAs (siRNAs) knockdown essentially any gene of interest [11–13], we supposed that knockdown of BK_{Ca} channel α -subunit in rat's vascular tissues is a good model for radiation-induced vascular malfunction and related arterial hypertension development in rats.

In contrast to the numerous studies demonstrating that irradiation depresses endothelium-dependent vasorelaxation, other investigations have shown that irradiation enhances vascular contractility in an endothelium-independent manner [14]. This information suggests that, in addition to the indirect effect through a decrease in endothelial-dependent relaxation, a direct effect on vascular contractility may be important in the vascular anomalies induced by irradiation.

Vascular smooth muscle is known to contract in response to an increase in cellular free calcium ([Ca²⁺]_i). It is well

known that the increase in $[Ca^{2+}]_i$ activates the calmodulin dependent myosin light chain (MLC) kinase which catalyzes the phosphorylation of the 20,000 dalton MLC. MLC phosphorylation in turn activates the myosin molecule, which can then interact with actin and contract. In addition to this primary regulatory pathway, several modulatory pathways exist in smooth muscle that can alter the magnitude of force that is developed for any given level of cellular Ca^{2+} . Alterations in myofilament Ca^{2+} sensitivity can be either positive or negative depending on the pathways stimulated. For increases in myofilament Ca^{2+} sensitivity, two primary hypotheses have been proposed: G-protein dependent activation of Rho kinase and protein kinase C dependent phosphorylation of a cellular protein called CPI-17. Both proposals have a common end-point, that being inhibition of the MLC phosphatase resulting in a greater level of MLC phosphorylation for any given level of Ca^{2+} and activity of the MLC kinase.

Hypertension has been clearly shown to be associated with an increase in vascular reactivity. In turn, the enhanced reactivity during hypertension has been shown to be due in part to an increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity [15]. Both an increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity and a decrease in BK_{Ca} activity may result from a high protein kinase C (PKC) activity. Taken together, this suggests the possibility that alterations in PKC may be a unifying hypothesis in the irradiation induced hypertensive state and alterations in vascular function.

Thus, *the main goal of this study* was to clarify whether siRNAs administration, targeted to BK_{Ca} encoding gene, is able to alter the form and function of BK_{Ca} and this way produce vascular abnormalities and hypertension development in a manner similar to ionized irradiation. *The next goal* of this study was to test the hypothesis that the increase in vascular responsiveness that results following whole body irradiation is due to a change in the PKC dependent increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity in the vascular smooth muscle cell.

Materials and methods. *Animals.* All animal studies were performed in accordance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. Experiments were performed on 6–8 weeks male Wistar rats (weight 250–300 g) housed under controlled environmental conditions (21 °C, 12–12 h light-dark cycle) and free access to water and standard rodent chow.

KCNMA1 gene knockdown by RNA interference. The double-stranded silencing siRNA for KCNMA1 gene sense 5'-GUA CAG GAA GGG AAC AUU UUU-3', antisense 5'-AAA UGU UCC CUU CCU GUA CUU-3' and nonsilencing (scrambled, scrRNA) RNA: sense 5'-UGU UCA GCG AAA UAU AAC CUU-3', antisense 5'-GGU UAU AUU UCG CUG AAC AUU-3' were prepared from corresponding oligonucleotides provided by Metabion (Germany) according to the manufacturer's instructions. For KCNMA1 gene knockdown *in vivo* these double-strand RNAs were injected in tail vein of rats (80 µg/kg) twice with 24-h interval. The molecular and functional changes (expression of mRNA BK_{Ca} channels α subunit, K^+ channels activity, acetylcholine-induced, endothelium-dependent vasorelaxation and norepinephrine-induced vasoconstriction, arterial systolic blood pressure) were analyzed 7 days after first siRNA injection.

It is clear that delivery of siRNAs to target cell is a serious problem and naked siRNAs administrated intravenously may be unstable in serum being degraded by endo- and exonucleases. Nevertheless, the recent data obtained [16] indicate that naked siRNAs in many studies demonstrate significant RNA-interference effect while chemical or other type modification of siRNAs can increase stability of these molecules *in vitro*, but can not demonstrate an increment in their efficacy *in vivo*. We suppose that the main experimental criteria of the siRNAs specific effectiveness is the real difference in the mRNA expression in tissues obtained from the animals treated with

specific siRNAs as compared to the healthy rats or the rats that were treated with scr-siRNAs.

Whole-body animal γ -irradiation. Rats were exposed to a 6 Gy dose of ionizing irradiation for 7.5 min. The dose of 6 Gy was used based on our previous studies showing that this dose induced vascular effects while maintaining survival of the animals throughout experimental period [1, 8, 17]. Whole-body irradiation was performed with gamma rays delivered at a rate of 0.80 Gy $\cdot$ min⁻¹ from a ⁶⁰Co source (TGT ROCUS M, Russian Federation) positioned 50 cm from the animal. During irradiation, animals were restrained in a plastic box specifically designed for this study and the radiation beam was focused on the animal's chest. There was no change in housing, standard food, or drink following irradiation. All animals survived the 30 day experimental period following the exposure to irradiation.

RNA isolation and real-time PCR. Total RNA was isolated from rat aorta using a Trizol RNA-prep kit (Isogen, Russian Federation) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined with the use of a NanoDrop spectrophotometer ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was performed using a RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania), using 1.2–1.5 μ g of total RNA and a random hexamer primer. Single-chain DNA was used for polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR.

We performed amplification in 10 μ l of SYBR Green PCR Master Mix containing 30 pM of each primer. For amplification mRNA BK_{Ca} channels (housekeeping gene) fragments we used next primers:

BK_{Ca} α subunit sense 5'-tac ttc aat gac aat atc ctc acc ct-3' and antisense 5'-acc ata aca acc acc atc ccc taa g-3'; β actin sense 5'-tgt tac gtc gcc ttg gat ttg gag-3' and antisense 5'-aag aga gag aca tat cag aag c-3'.

L-type Ca: sense -5'- tgacagtgcagagctttgaggag -3' antisense - 5'- tctagtcctctcgaaccagag -3'

Kv 1.5. Up: sense -5'- ttcataaggaagag-gagaagc-3', antisense - 5'- agtgtcctag-gcaagagtggag-3'

Kir 6.2. Up: sense -5'- agaaaccctcatcttcagcaag -3', antisense - 5'- aatctcgtcagccagataggag -3'

Kir 6.1. Up: sense -5'- acgatatctcagccactgacct -3', antisense - 5'- ctctcctcatggagttgtttc-3'

Sample volume was driven to 20 μ l with deionized water. 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 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. We calculated the expression of the target gene relative to the housekeeping gene as the difference between the threshold values of the two genes.

Isolation of rat thoracic aorta smooth muscle cells. Smooth muscle cells were isolated from rat thoracic aorta by collagenase treatment. Briefly, the rats were anesthetized with ketamine (37.5 mg/kg b.w., IP) and xylazine (5 ml/kg b.w. IP) and approximately 1.0–1.5 cm of the thoracic aorta was excised and cleaned of connective tissue. The aorta was then cut into small pieces (1.5 $\times$ 1.5 mm) in a cold low-Ca²⁺ solution containing (in mM): NaCl 140, KCl 6, MgCl₂ 3, D-glucose 10, HEPES 10 (pH 7.4). The vascular tissues were transferred to a fresh low-Ca²⁺ solution containing: 2 mg/ml collagenase type IA (417 U/mg), 0.5 mg/ml pronase E type XXV, and 2 mg/ml bovine serum albumin. The tissues were then incubated for 30 min at 37 °C. After incubation, the tissues were washed (2–3 min) twice in a fresh low-Ca²⁺ solution to remove

the enzymes. Cells were dispersed by agitation using a glass pipette, and then were placed in normal Krebs bicarbonate buffer. Aliquots of the myocytes were stored at +4 °C and remained functional for at least 4 h.

Electrophysiology studies. The whole-cell patch clamp technique in the amphotericin B (250 µg/mL) perforated-patch configuration was used to study whole-cell potassium currents (voltage clamp mode). Data acquisition and voltage protocols were performed using an Axopatch 200B Patch-Clamp amplifier and Digidata 1200B interface (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) coupled with computer equipped with pClamp software (version 6.02, Axon Instruments Inc., USA). Membrane currents were filtered at 2 kHz and digitized at a sampling rate of 10 kHz. The reference electrode was Ag-AgCl plug electrically connected to the bath. Macroscopic current values were expressed as current density in pA/pF. The membrane capacitance of each cell was estimated by integrating the capacitive current generated by a 10 mV hyperpolarizing pulse after electronic cancellation of pipette-patch capacitance using Clampfit software (version 6.02, Axon Instruments Inc., USA). All electrophysiological experiments were carried out at room temperature (20 °C).

Patch pipettes were made from borosilicate glass (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England) and backfilled with intracellular solution (in mM): KCl 140, NaCl 10, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, HEPES 10, D-glucose 11.5, adjusted to pH 7.3 with KOH. Pipettes had resistances of 2.5–5.0 MΩ. The standard Krebs-HEPES external solution contained (in mM): NaCl 140, KCl 5.9, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, HEPES 10, D-glucose 11.5, pH 7.4.

Ca²⁺-free, high K⁺ (135 mM) solution was prepared replacing NaCl with equimolar concentration of KCl and removing Ca²⁺ from bath solution.

Measurement of Contractile Force. Segments of thoracic aorta (1.5 cm-long) were obtained as described above, cleaned of both connective and adipose tissue, and cut into 1 to 1.5 mm width rings. All procedures were performed at room tem-

perature in a nominally Ca²⁺-free physiological salt solution.

Experiments were performed on the thoracic aorta rings obtained from healthy, irradiated adult rats and animals after siRNAs and scr-siRNAs treatment. The vascular tissues were prepared with special care in order to keep the endothelium intact for the following vasodilatation study. If necessary endothelium was removed using 15 min incubation in Krebs bicarbonate buffer with saponin (0.1 mg/ml). Aortic rings were mounted isometrically in a tissue bath between a stationary stainless steel hook and an isometric force transducer (AE 801, SensoNor, A/S, Norten, Norway) coupled to a AD converter Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA). The rings were equilibrated for 1 h with a resting tension of 10 mN. Experiments were made at 37 °C in modified Krebs bicarbonate buffer solution of the following composition (in mM): NaCl 133, KCl 4.7, NaHCO₃ 16.3, NaH₂PO₄ 1.38, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, HEPES 10, D-glucose 7.8 at pH 7.4. Following the equilibration period, the aortic rings were exposed several times to norepinephrine (10⁻⁵ M) until reproducible contractile responses were obtained. To test endothelial functional activity and integrity, the relaxant responses to acetylcholine (10⁻⁹–10⁻⁵ M) were examined on the plateau of the norepinephrine (10⁻⁶ M) – induced contraction. Contractile abilities of VSM were estimated reproducing dose-response curves to norepinephrine.

Measurement of [Ca²⁺]_i

Experiments for the simultaneous measurement of [Ca²⁺]_i and contractile force were carried out in a 500 µl tissue chamber mounted on the stage of a fluorescence microscope LUMAM-2 (Russia) equipped with epifluorescence collection. The aortic rings were mounted isometrically between a stationary stainless steel hook and a force transducer (AE 801, SensoNor A/S, Norten, Norway). Except for during the Fura-2AM loading procedure, the rings were continuously perfused with preheated Krebs solution at 35 °C at a rate of 2.0 ml per minute. The rings were loaded with 10 M Fura 2-AM in a physiological solution of the follow-

ing composition (mM): 122 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 11.6 HEPES, 11.5 glucose, and a pH of 7.3–7.4. The loading solution also contained 2.5% DMSO and 5 mg/ml Pluronic F-127. Loading continued for 2 hours at room temperature. The tissues were then mounted in a tissue chamber for measurement of force and [Ca²⁺]_i and equilibrated in normal physiological salt solution for at least 30 min.

Fura-2 fluorescence was excited at 340 and 380 nm wavelength (λ) and recorded at 510 nm emission wavelengths from a central region (approximately 0.5 mm in diameter) on the blood surface of the aorta ring. The fluorescence emitted from the tissue was collected by a photomultiplier through a 510 nm filter. The results of [Ca²⁺]_i measurements are presented as the ratio (R) of 510 nm emission fluorescence intensity [I₅₁₀(λ)] at λ = 340 nm and λ = 380 nm excitation signals: $R = I_{510}(340)/I_{510}(380)$. [Ca²⁺]_i was determined, as described by Grynkiewicz et al., using the formula $[Ca^{2+}]_i \text{ (nM)} = K_d \cdot [(R - R_{min})/(R_{max} - R)] \cdot (S_{f2}/S_{b2})$, where K_d (224 nM at 37 °C) is the dissociation constant of Fura-2 for Ca²⁺; R is the ratio of fluorescence of the sample at 340 to that at 380 nm; R_{min} and R_{max} represent the ratios of fluorescence at the same wavelengths in the presence of zero and saturating Ca²⁺ respectively; and S_{f2}/S_{b2} is the ratio of fluorescence of Fura-2 at 380 nm in zero Ca²⁺ to that in saturating Ca²⁺ respectively. Prior to initiating experiments, it was determined that contractions induced by high KCl were not affected by Fura-2 loading.

Solutions. All tissues were stored in a physiological salt solution of the following composition (in mM): 122 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 15.5 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, and 11.5 glucose, pH 7.3–7.4. Nominally Ca²⁺-free solutions were prepared by simply omitting CaCl₂. Ca²⁺-free/EGTA solutions used for removal of cellular calcium were prepared by omitting CaCl₂ and including 1 mM ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA). Depolarizing KCl solutions were prepared by the equimolar exchange of KCl for NaCl.

Solutions for experiments performed using permeabilized muscle contained (in

mM): 3.2 MgATP, 2 free-Mg²⁺, 12 phosphocreatine, 0.5 sodium azide, 30 N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES), pH 6.9 at 21 °C. Unless otherwise stated, creatine phosphokinase (15 U/ml) and calmodulin (0.5 μM) were added to all solutions. Desired free-Ca²⁺ levels (expressed as pCa) were obtained by mixing stock solutions containing K₂EGTA and K₂CaEGTA. The total EGTA concentration was 4 mM. Ionic strength was adjusted to 150 mM with potassium propionate.

Arterial Blood Pressure Measurement. Systolic arterial pressure was measured in non-anesthetized rats using cuff tail sphygmomanometer S-2 (Hugo Sachs Electronic, Germany).

Chemicals. Collagenase type IA, pronase E type XXV, bovine serum albumin, paxilline, tetraethylammonium, glibenclamide, norepinephrine, acetylcholine as well all the constituents of the Krebs solution were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Fura-2 AM was obtained from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). All other compounds were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (0.1 % final concentration) was used as a solvent for phorbol dibutirate. This concentration did not affect the results.

Statistics and analysis. The data are shown as means ± S. E. M., and n indicates the number of cells, preparations or animals tested. Data analysis was performed using Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) software. Half-maximally effective concentration (EC₅₀) values were expressed as pD₂ (-log EC₅₀). To determine the maximal responses and EC₅₀, concentration-response curves were fit to the dose-response equation: $F = F_{max}/[1+10^{((\log EC_{50} - \log C) \cdot h)}]$, where F and F_{max} are actual and maximal relaxation (constriction) responses, h is the Hill slope, C is actual concentration. Multiple comparisons were made using one way analysis of variance (ANOVA) and if any significant difference was found, the Tukey's multiple comparison tests were performed. Arterial pressure data were analyzed by Student's t-test for paired observations. Differences were considered to be statistically significant when P was less than 0.05.

Results

1. Irradiation and *KCNMA1* gene silencing lead to similar decrease in BK_{Ca} mRNA expression and potassium outward current density. Figure 1 shows that both irradiation and siRNAs targeted to *KCNMA1* gene administered in total dose of 80 $\mu\text{g/kg}$ (twice with 24-h interval, intravenously) produced a 2.5–3.5-fold decrease in BK_{Ca} α -subunit mRNA level in aortic SM as compared to tissues obtained from healthy rats and the rats treated with a scrambled siRNAs (scr-siRNAs). For instance, BK_{Ca} mRNA level decreased from (0.013 ± 0.003) relative units in SM treated with a scr-siRNAs to (0.005 ± 0.002) relative units in SM treated with siRNAs targeted to *KCNMA1* gene ($n = 11$, $P < 0.05$).

Thus, the expression profile of BK_{Ca} mRNA transcripts in SM appeared to be significantly decreased in *KCNMA1* silencing SM similar to irradiated tissues when the level of BK_{Ca} expression has been significantly decreased 30 days after irradiation (Figure 1 A).

The next series of experiments was performed to study potassium channel activity in SMC from control, irradiated and scr-siRNAs/siRNAs-administered animals. To measure K^+ channel activity, we used whole-cell perforated patch-clamp technique using freshly isolated thoracic aorta SMCs. To induce outward currents SMCs were held at the resting potential of -60 mV and then stimulated with increasing depolarizing 300-ms voltage steps from -100 mV to $+70$ mV.

As shown in Figure 2 A, B total outward potassium currents stimulated by depolarized voltage step were (30 ± 1) , (11 ± 1) and (13 ± 1) pA/pF at $+70$ mV in control, irradiated (6 Gy) and *KCNMA1* gene knockdown SMC, respectively ($n = 12$ –24, $P < 0.05$, see Figure 2 legend for detail). Scr-siRNAs was without visible effect on outward potassium currents in SMC as compared to control.

After that we identified the different component of total potassium current following irradiation and *KCNMA1* gene silencing (Figure 3 A, B). It is become clear that total outward current significantly decreased as the result of irradiation and *KCNMA1* gene silencing mainly

due to inhibition of paxilline-sensitive component, i.e. the current carried through BK_{Ca} channels.

This conclusion is based on the next evidence. Paxilline (500 nM), a selective inhibitor of BK_{Ca} channels [29, 42], added to the external bathing solution significantly decreased outward K^+ current density in the aortic cells obtained from control and scr-siRNAs-treated rats while this effect was six-four-fold attenuated in irradiated and siRNA-treated VSM cells. Paxilline-sensitive components were (25 ± 2) , (5 ± 1) , (26 ± 4) and (9 ± 1) pA/pF at $+70$ mV in intact, irradiated, scr-siRNAs and siRNAs-treated SMC, respectively ($n = 12$, $P < 0.05$).

External paxilline application combined with tetraethylammonium (TEA, 10 mM), non-selective inhibitor of potassium channels, led to additional inhibi-

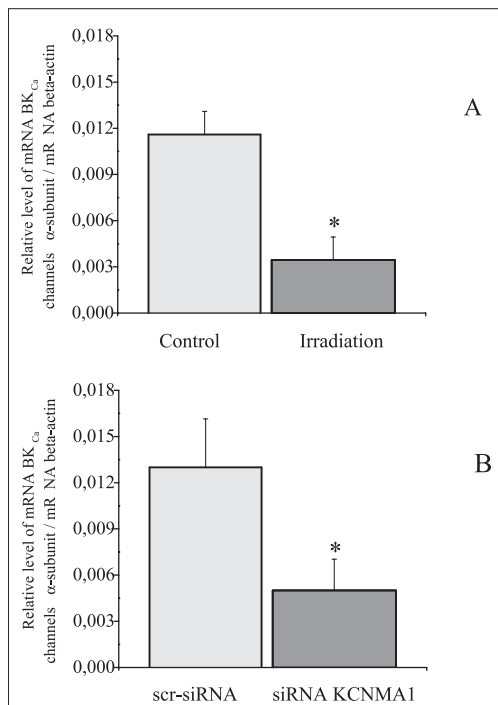


Figure 1. Expression of mRNA BK_{Ca} channels α -subunit in rat thoracic aorta smooth muscle after irradiation (A) and *KCNMA1* gene silencing (B). A, aortic total RNA was isolated from 5 control rats and 6 rats on 30th days after irradiation impact. β -actin was used as an internal control; B, aortic total RNA was isolated from 6 control rats (scr-siRNAs) and 7 rats on 7th day following siRNAs injection. β -actin was used as an internal control. The asterisks indicate the statistical significance as compared to control and scr-siRNAs ($P < 0.05$)

tion of outward potassium current but there was no significant difference between TEA action in the cells obtained from intact, irradiated and scr-siRNAs/siRNAs treated SM cells (Figure 3 A, B). There were no differences in residual TEA- and paxilline-insensitive components of outward current in all groups of animals (Figure 3 A, B) at the potential +70 mV.

To identify the glibenclamide-sensitive component of outward current more precisely, we used the protocol described by Mishra and Aaronson [18]. Figure 4

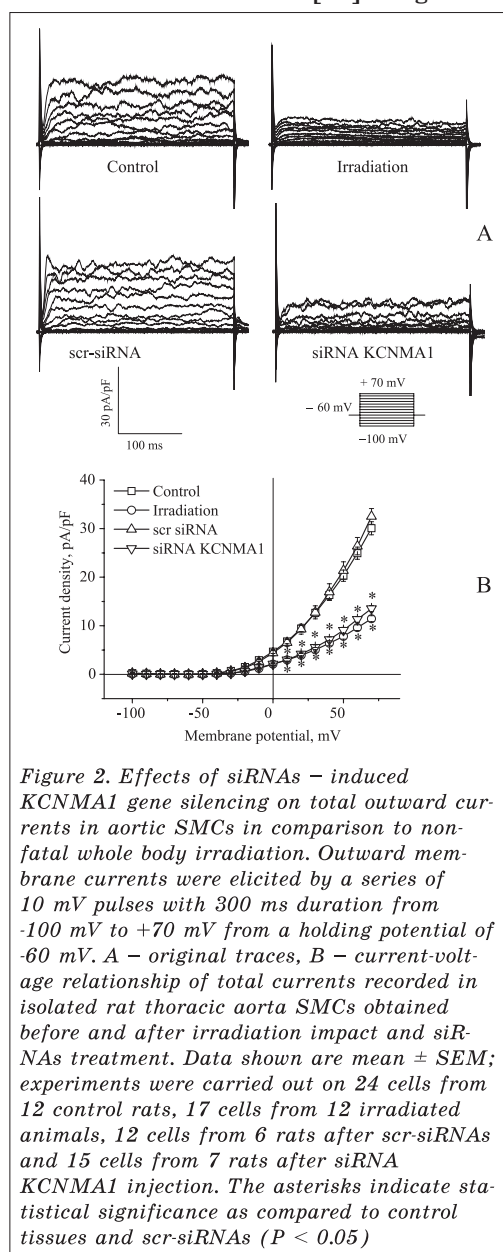


Figure 2. Effects of siRNAs – induced *KCNMA1* gene silencing on total outward currents in aortic SMCs in comparison to non-fatal whole body irradiation. Outward membrane currents were elicited by a series of 10 mV pulses with 300 ms duration from -100 mV to +70 mV from a holding potential of -60 mV. A – original traces, B – current-voltage relationship of total currents recorded in isolated rat thoracic aorta SMCs obtained before and after irradiation impact and siRNAs treatment. Data shown are mean $\pm$ SEM; experiments were carried out on 24 cells from 12 control rats, 17 cells from 12 irradiated animals, 12 cells from 6 rats after scr-siRNAs and 15 cells from 7 rats after siRNA *KCNMA1* injection. The asterisks indicate statistical significance as compared to control tissues and scr-siRNAs ($P < 0.05$)

shows that when superfusion solution was changed from standard 5.9 mM K^+ medium to Ca^{2+} -free, high K^+ (135 mM) and TEA (2 mM) containing solution (at this solution content reversal potential for K^+ shifted to 0 mV and other potassium currents are suppressed), an inward currents of about $-(6.4 \pm 0.4)$ pA/pF and $-(4.7 \pm 0.4)$ pA/pF ($P < 0.05$, $n = 6$) were recorded under normal condition and after irradiation, respectively. Glibenclamide (10 μ M) significantly suppressed this current in both intact and irradiated SMCs, indicating

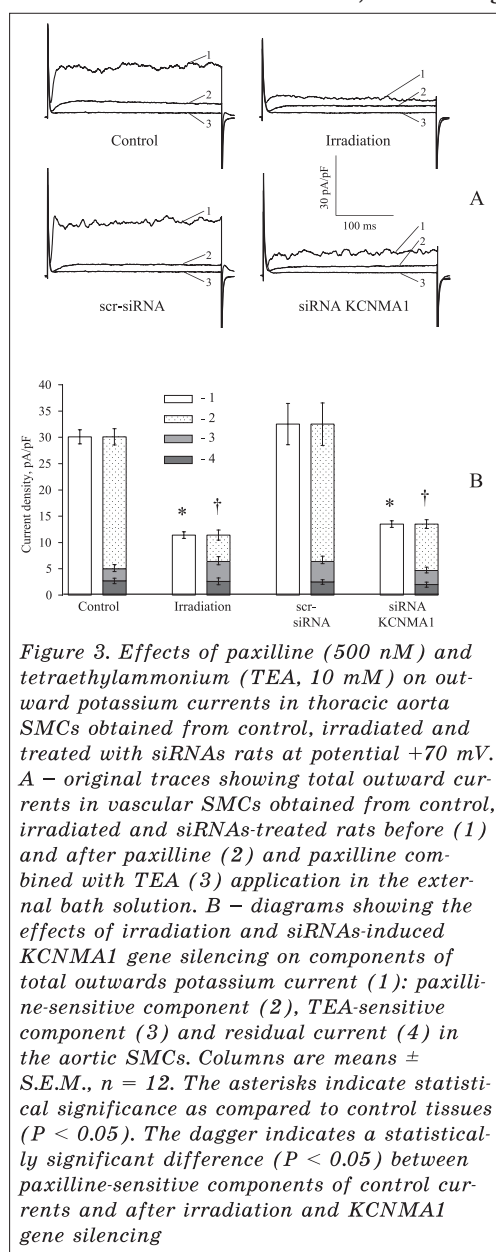


Figure 3. Effects of paxilline (500 nM) and tetraethylammonium (TEA, 10 mM) on outward potassium currents in thoracic aorta SMCs obtained from control, irradiated and treated with siRNAs rats at potential +70 mV. A – original traces showing total outward currents in vascular SMCs obtained from control, irradiated and siRNAs-treated rats before (1) and after paxilline (2) and paxilline combined with TEA (3) application in the external bath solution. B – diagrams showing the effects of irradiation and siRNAs-induced *KCNMA1* gene silencing on components of total outwards potassium current (1): paxilline-sensitive component (2), TEA-sensitive component (3) and residual current (4) in the aortic SMCs. Columns are means $\pm$ S.E.M., $n = 12$. The asterisks indicate statistical significance as compared to control tissues ($P < 0.05$). The dagger indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) between paxilline-sensitive components of control currents and after irradiation and *KCNMA1* gene silencing

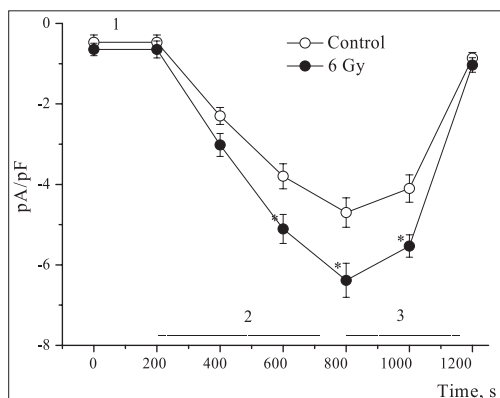


Figure 4. Effect of ionized irradiation on the resting glibenclamide ($10 \mu\text{M}$) – sensitive current in thoracic aorta SMCs. Currents were elicited by replacement of normal external solution with Ca^{2+} -free, high K^+ (135 mM) solution containing 2 mM TEA and $10 \mu\text{M}$ glibenclamide before and after irradiation. Horizontal bar 1 – superfusion with standard external solution; bar 2 indicates superfusion with Ca^{2+} -free, high K^+ (135 mM) solution containing 2 mM TEA; bar 3 – glibenclamide ($10 \mu\text{M}$) was added to the superfusate

K_{ATP} -dependent, glibenclamide-sensitive component of outward current not only suppressed but appears to be increased significantly following irradiation.

2. *KCNMA1* gene silencing increases mRNA expression of K_v , K_{ATP} and L-type Ca^{2+} channels. To investigate the effect further it would be interesting to know whether mRNA expression of other members of voltage-dependent potassium channels family will be affected following *KCNMA1* gene silencing. Taking into account functional association between voltage-dependent calcium and K^+ channels, L-type Ca^{2+} channels mRNA expression was studied additionally. Figure 5 shows that mRNA expression of K_v and K_{ATP} channels in SM with silencing *KCNMA1* gene significantly increased from (12.6 ± 1.3) to (17.8 ± 1.4) relative units and from (13.4 ± 1.8) to (22.1 ± 4.0) relative units ($P > 0.05$, $n = 12$), respectively, while L-type Ca^{2+} channels mRNA level demonstrated non-significant tendency to increment – from (14.5 ± 1.5) to (18.0 ± 2.1) relative units ($P > 0.05$, $n = 10$).

In contrast to siRNAs administration, the levels of mRNA expression of K_v and K_{ATP} channels on 30th days after irradiation were increased significantly: K_v

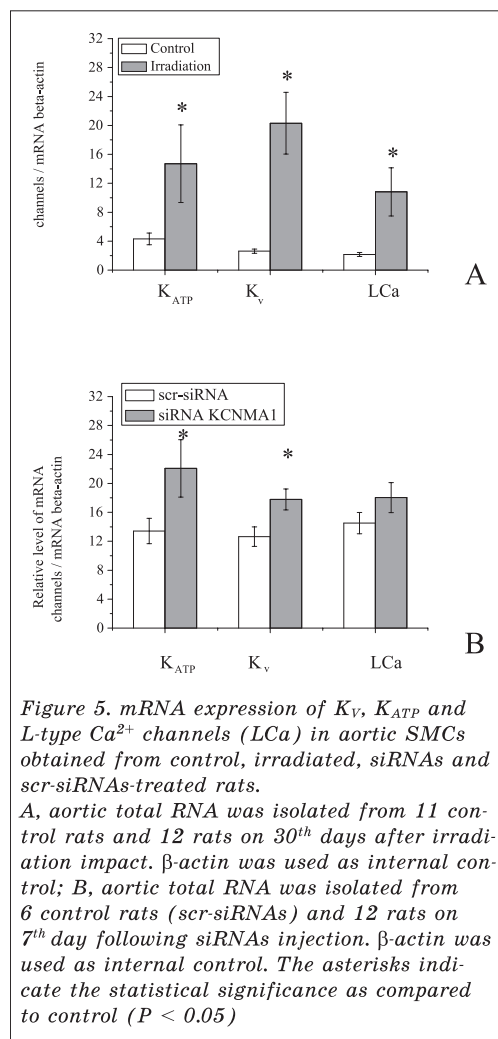


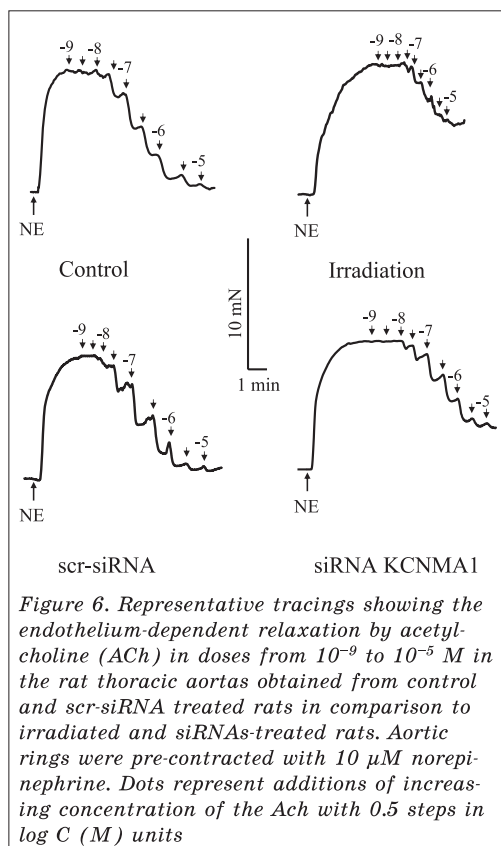
Figure 5. mRNA expression of K_v , K_{ATP} and L-type Ca^{2+} channels (LCa) in aortic SMCs obtained from control, irradiated, siRNAs and scr-siRNAs-treated rats.

A, aortic total RNA was isolated from 11 control rats and 12 rats on 30th days after irradiation impact. β -actin was used as internal control; B, aortic total RNA was isolated from 6 control rats (scr-siRNAs) and 12 rats on 7th day following siRNAs injection. β -actin was used as internal control. The asterisks indicate the statistical significance as compared to control ($P < 0.05$)

from (2.6 ± 0.03) to (20.3 ± 4.3) ($P < 0.05$), K_{ATP} from (4.3 ± 0.8) to (14.7 ± 5.4) ($P < 0.05$). The level of L-type Ca^{2+} channels expression had increased from (2.20 ± 0.03) to (10.8 ± 3.3) relative units ($P < 0.05$).

3. *KCNMA1* gene silencing changes SM responses to acetylcholine and nor-epinephrine. Figure 6 shows original tracing demonstrating the results of standard acetylcholine test in control and scr-siRNA-treated groups of animals as compared to irradiated and siPNAs-treated rats. Relaxations of the rat thoracic aortas were obtained by cumulative additions of acetylcholine in doses of 10^{-9} – 10^{-5} M .

Original recordings combined with dose-responses curves (Figure 7 A) clearly indicate that the maximal amplitude of endothelium-dependent SM relaxation



had decreased from 84–86 % in control groups (healthy and scr-siRNAs treated rats) to $(43 \pm 3) \%$ and $(61 \pm 3) \%$ in irradiated and KCNMA1 silencing tissues, respectively ($n = 14-18$, $P < 0.01$).

Moreover, both irradiation and KCMA1 gene silencing SM produced an increased sensitivity in denuded aortic SM to norepinephrine (Figure 7 B) – mean values of pD_2 ($-\log EC_{50}$) are (6.5 ± 0.05) control, (7.50 ± 0.05) irradiated, (6.60 ± 0.05) scr-siRNAs and (7.0 ± 0.04) in KCMA1 gene silencing SM, respectively, suggesting increased SM contractility following both irradiation and KCMA1 gene silencing ($n = 12-18$, $P < 0.001$).

4. Arterial blood pressure (BP) in irradiated and KCNMA1 silencing rats. Figure 8 shows the effect of whole body irradiation (6 Gy) on arterial blood pressure measured in non-anesthetized healthy and scr-siRNAs-treated rats in comparison to irradiated rats and rats with knockdown of KCMA1 gene. Systolic BP had considerably increased on 30th day of post-irradiation from (113 ± 2) mmHg in

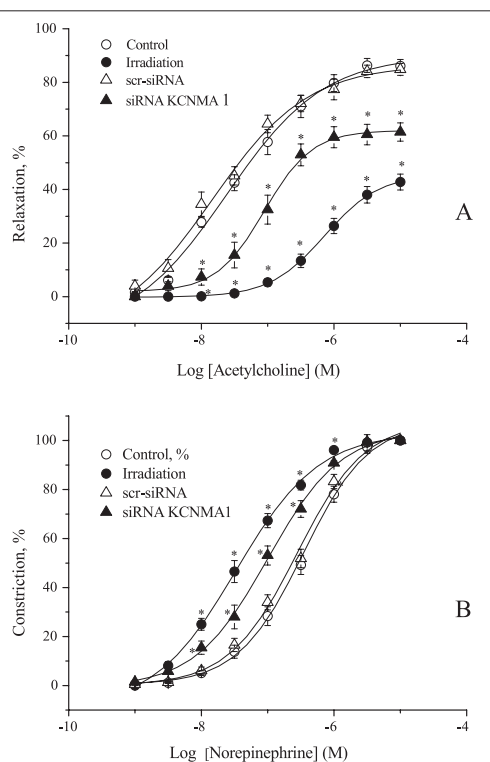


Figure 7. Effects of non-fatal whole body irradiation and siRNAs KCNMA1 gene silencing on endothelium-dependent relaxation in intact rat thoracic aorta rings (A), and dose-response curves to norepinephrine (B) in denuded rat thoracic aortas obtained from control, irradiated and scr-siRNAs/siRNAs treated rats. Relaxations are expressed as percent decrease in tension evoked by $10 \mu\text{M}$ norepinephrine, contractions are expressed as percent of maximal tension evoked by $10 \mu\text{M}$ norepinephrine. Experiments were carried out on 15 rings from eight control rats, 18 rings from nine irradiated animals, 12 aortic rings from seven rats with siRNAs treatment and 12 aortic rings from six scr-siRNAs treated rats. Values shown are means $\pm$ S.E.M., the asterisks indicate statistical significance as compared to control tissues ($P < 0.05$). Concentration-response curves were fitted to the dose-response equation

control to (139 ± 6) mmHg ($n = 15$, $P < 0.05$) in irradiated animals. In contrast to irradiated rats, the rats with KCNMA1 gene knockdown demonstrated insignificant BP increment from (115 ± 2) mmHg (scr-siRNAs treated animals) to (122 ± 6) mmHg ($n = 12$, $P > 0.05$).

It is important to note that despite the KCMA1 gene silencing was without significant effect on BP level in experimental group of rats in total, some animal's

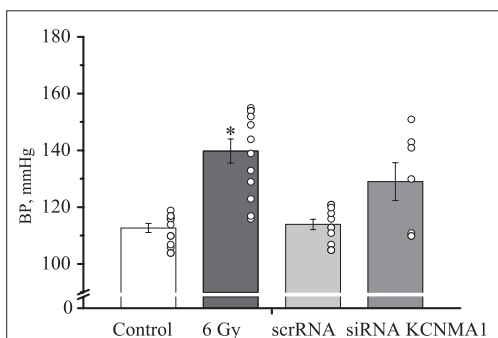


Figure 8. Effect of whole body γ -irradiation (6 Gy) impact and siRNAs administration on systolic blood pressure measured using a cuff tail sphygmomanometer in non-anesthetized rat. Measurements were made in healthy (n = 12), irradiated (n = 12), scr-siRNAs (n = 12) and siRNAs – treated rats (n = 7). Columns are means $\pm$ S. E. M. The asterisks indicate statistical significance as compared to control animals ($P < 0.05$)

demonstrated well expressed tendency to BP elevation.

5. Intact vascular strips from control and irradiated animals. The first series of experiments performed were designed to determine the effects of whole body irradiation on vascular contractile sensitivity. Figure 9 A shows the results of concentration-response curves from the cumulative addition of KCl. The addition of KCl (8–120 mM) produced concentration-dependent

increases in force development in the thoracic aorta from both control and irradiated animals. The experiments were performed on the 9th and 30th days post-irradiation. Thoracic aortic rings obtained from irradiated animals on the 9th day post-irradiation were significantly more sensitive to the addition of KCl as compared to aortic rings from control animals. Maximum force development was similar in aortic rings from the two animals groups (7.6 ± 0.8 mN control; 8.6 ± 1.2 mN irradiated; $P < 0.05$, n = 12). The similar results were obtained on the 30th day of post-irradiation period (maximal force development was 10.0 ± 1.1 mN, $P < 0.05$, n = 12).

Similar experiments using the cumulative addition of phenylephrine showed increased sensitivity as evidenced by a shift to the left in the stimulation response curve in vascular rings from animals subjected to whole body irradiation as compared to those from control animals (Figure 9 B). Based on these results, whole body γ -irradiation produces a general increase in contractile sensitivity in response to all forms of stimulation, whether in response to membrane depolarisation or agonist activation.

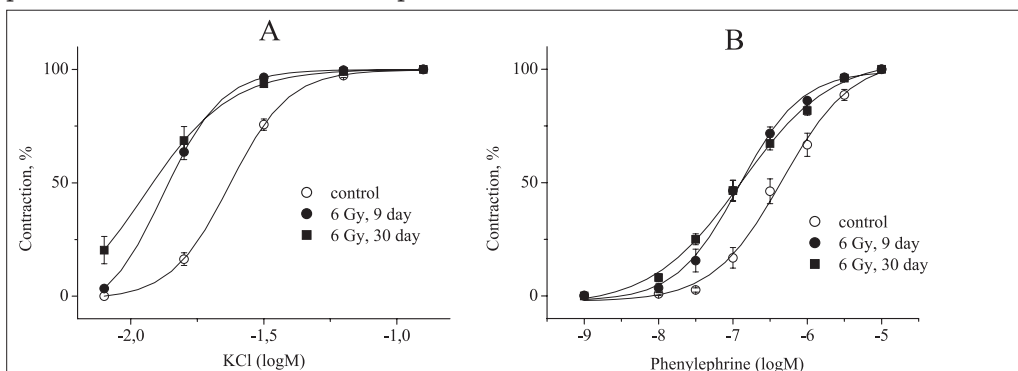
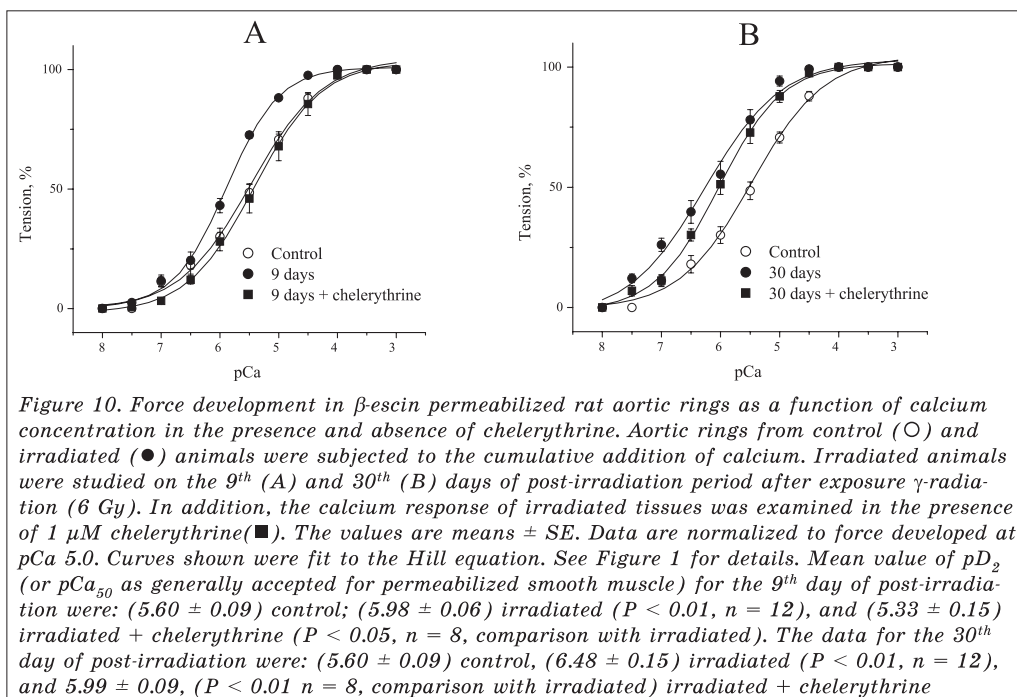
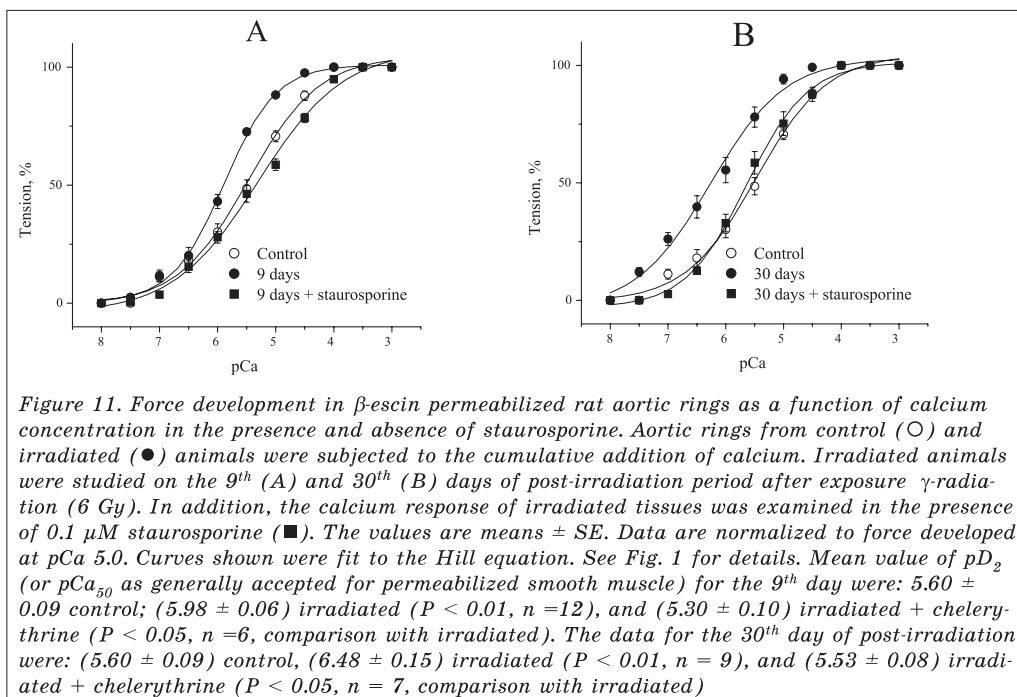


Figure 9. Effect of whole body irradiation (6 Gy) on KCl – and phenylephrine-induced contractions of rat thoracic aorta. A – Cumulative concentration-response curves for KCl were obtained with aortic rings from healthy (○) and irradiated rats on the 9th (●) and 30th (■) days of post-irradiation. Data shown are means $\pm$ SE. Curve fits of mean values were performed using the following: $F = F_{max} / [1 + \exp(\log EC_{50} - \log[Ca^{2+}]_i) \cdot h]$, where F and F_{max} are actual and maximal force, h is the Hill coefficient, EC_{50} is 50 % effective concentration. Mean value of pD_2 ($-\log EC_{50}$) are: (1.70 ± 0.03) control, and (1.90 ± 0.05) ($P < 0.01$, n = 12) and (1.90 ± 0.03) ($P < 0.01$, n = 12), irradiated (9th and 30th days, respectively). B – cumulative concentration-response curves to phenylephrine obtained on the thoracic aorta rings from healthy and irradiated rats. Mean value of pD_2 are: (6.30 ± 0.07) control, and (6.92 ± 0.05) ($P < 0.01$, n = 12) and (6.89 ± 0.05) ($P < 0.01$, n = 12), irradiated (9th and 30th days, respectively). Contractions are expressed as a per cent of the tension evoked by maximal KCl (120 mM) or phenylephrine (10^{-5} M) concentration



6. Experiments on chemically permeabilized vascular strips from control and irradiated animals. Although there exists many mechanisms by which irradiation could increase vascular sensitivity, the two most probable are alterations in calcium metabolism in response to stimulation or a direct effect on the contractile proteins. One of the best models to use to

differentiate between these two possibilities is the chemically permeabilized strip. This preparation allows one to examine the contractile response under conditions of constant intracellular $[Ca^{2+}]_i$. The data shown in Figures 10 and 11 were obtained from experiments performed on β -escin permeabilized aortic strips. All forces shown were normalized to the maximal



Ca^{2+} -dependent force attained in each vascular preparation. The results shown in these figures clearly demonstrate that on the 9th and 30th days of post-irradiation period a significant shift to the left in the calcium-tension relationship was seen denoting an increase in myofilament calcium sensitivity. For instance, on the 9th day after a single whole body γ -irradiation, an increased myofilament Ca^{2+} sensitivity of (0.38 ± 0.09) pCa units was observed in the series of experiments performed to generate Figure 10 and Figure 11.

In an attempt to uncover potential mechanism(s) responsible for the γ -irradiation induced increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity, we performed experiments using inhibitors of PKC. Figure 10 shows the results of experiments using chelerythrine (10^{-6} M) and Figure 11 shows the results of experiments using staurosporine (10^{-7} M). Both inhibitors reversed the increase in myofilament Ca^{2+} sensitivity induced by single whole body γ -irradiation on the 9th and 30th days of post-irradiation period. For instance, on the 9th day post-irradiation chelerythrine shifted the Ca^{2+} concentration response curve (0.65 ± 0.10) μM to the right whereas staurosporine shifted the curve (0.68 ± 0.08) μM to the right. Of particular interest was the total lack of effect of the PKC inhibitors on the calcium responsiveness of permeabilized aortic tissues from control animals. This is an especially important finding given the potential for non-specific inhibition of other kinases by these inhibitors, such as the MLC kinase.

Phorbol dibutirate (PDB, 10^{-7} M), a potent PKC activator, shifted the pCa-tension response relationship for skinned smooth muscles to the left in a healthy tissues and was without effect in irradiated thoracic aorta rings (Figure 12).

7. Simultaneous measurements of contractile force and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The next series of experiments were designed to simultaneously measure stimulation-induced changes in intracellular calcium concentration and force in the intact aortic tissue from control and irradiated animals. It is important to note that in these experiments the endothelial cells were mechanically removed from the area in

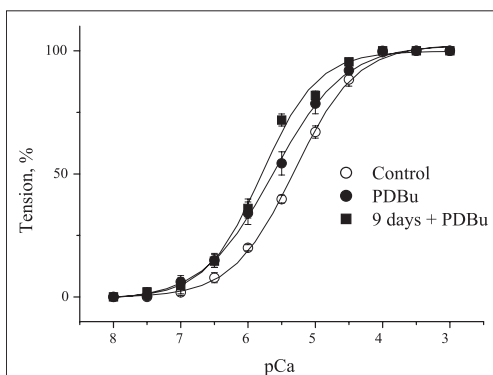


Figure 12. Effect of phorbol dibutirate (PDB, 10^{-7} M) on force development in healthy and irradiated β -escin permeabilized rat aortic rings as a function of calcium concentration. $\circ$ – control, $\bullet$ – PDB-treated healthy tissues, $\blacksquare$ – PDB-treated irradiated tissues. Mean value of pD_2 (or pCa_{50} as generally accepted for permeabilized smooth muscle) for the 9th day of post-irradiation were: (5.3 ± 0.03) control, (5.63 ± 0.11) PDB administration ($P < 0.05$, $n = 6$), and (5.81 ± 0.04) irradiated + PDB ($P < 0.01$, $n = 6$, comparison with irradiated)

which fura-2 calcium fluorescence was measured. Therefore, fluorescent changes were derived specifically from the vascular smooth muscle cells and not influenced by any potential changes in the endothelium. The goal of these experiments was to determine if the irradiation induced change in myofilament calcium sensitivity demonstrated in the permeabilized preparation could also be demonstrated in an intact tissue where calcium is mobilized by normal physiological pathways.

Intact aortic preparations were stimulated with 60 mM KCl and the increase in force and preceding increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured simultaneously. Representative tracings from such experiments are shown in Figure 13. Membrane depolarization by 60 mM KCl produced a slightly smaller increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in aorta from irradiated as compared to that from control animals. In contrast, aorta from irradiated animals produced significantly more force than tissues from control animals.

The compilation of several simultaneous force and calcium measurements are shown in Figure 14. As expected, a positive correlation exists between force developed at different KCl concentrations in the organ bath and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Similar to

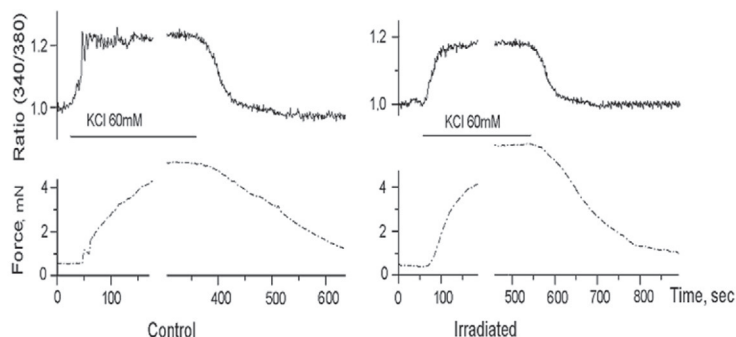


Figure 13. Representative recordings of the effect of irradiation (6 Gy) on KCl-induced increase in intracellular free Ca^{2+} concentration ($R_{340/380}$) and tension in intact rings of rat thoracic aorta. KCl-mediated muscle contraction (lower panels) and increment in ($R_{340/380}$) (upper panels) were measured simultaneously in the same aortic ring. Aortic rings from both animal groups produced similar increases in cellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to 60 mM KCl. Aortic rings from irradiated animals produced significantly more force in response to 60 mM KCl as compared to rings from control animals

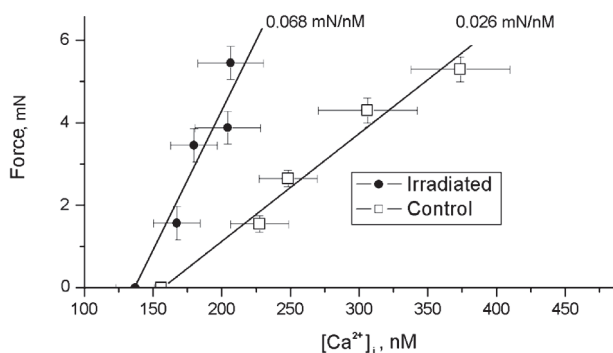


Figure 14. Effect of irradiation (6 Gy) on the KCl-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tension relationship in the thoracic aorta. Several experiments of the type shown in Figure 4 were used to develop the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tension relationship shown in this figure. Rings loaded with Fura-2 were subjected to the cumulative addition of KCl and levels of force and the simultaneous measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recorded. The results are shown as ($\square$: control) and ($\blacksquare$: irradiated). The slope (mN tension/nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$) was significantly increased in irradiated tissues as compared to control, indicating that Ca^{2+} sensitivity of the myofilaments had increased

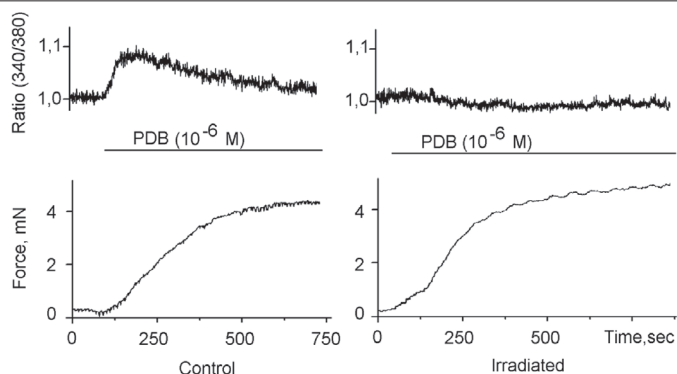


Figure 15. Typical recordings of effect of phorbol dibutirate (PDB, 10^{-6} M) on intracellular calcium concentration ($R_{340/380}$) and contractile force development in both healthy and irradiated thoracic aorta tissues. Force and $R_{340/380}$ (ratio of F_{340} to F_{380}) were measured in the same aortic ring

the results obtained from the permeabilized arterial preparations, greater levels of force are developed at any given $[Ca^{2+}]_i$ in tissues from irradiated animals as compared to those from control animals. Aortic rings obtained from irradiated animals produced 0.068 mN force/nM Ca^{2+} whereas arteries from control animals produced 0.026 mN force/nM Ca^{2+} .

Stimulation of intact aortic smooth muscles with PDB (10^{-6} M) produced a sustained progressively developing tonic contraction (it took 26–28 min before a maximal tension development was established while an increment in $[Ca^{2+}]_i$ was transient (Figure 15 A). In contrast, in irradiated tissues (Figure 15 B) the amplitude of PDB-induced contraction was higher than that seen in intact tissues and there was no any elevation in $[Ca^{2+}]_i$.

Discussion

Using RNA-interference (RNAi) phenomenon and physiological techniques we tried to identify the role and the place of BK_{Ca} channels in vascular tone maintenance following irradiation. The main finding of this study is radiation-induced suppression of the BK_{Ca} channels form and function accompanied with compensatory increment in mRNA expression and activity of other members of potassium channels family in irradiated vascular tissues. Another interesting phenomenon is the absence of significant increment in L-type Ca^{2+} channels mRNA expression in siRNAs knock-down rats as compared to irradiated rats that demonstrated an increased level of mRNA expression for this type of ionic channels.

It is well known that force development in VSM is closely coupled to membrane potential, which, in turn, is determined by potassium channels activity. The large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}) is the predominant K^+ channel species in most arteries and is known to play an essential role in vascular function via its involvement in changes of VSM membrane polarisation [9, 19–21]. BK_{Ca} channels differ from all other K^+ channels due to their high sensitivity to $[Ca^{2+}]_i$ and voltage. Inhibition

of BK_{Ca} produced membrane depolarization and subsequent vasoconstriction, and their dysfunction plays an important role in the pathogenesis of a number of vascular diseases including pulmonary and systemic hypertension, diabetes and atherosclerosis complications [22, 23].

Our preliminary data clearly indicate that BK_{Ca} appear to be the most vulnerable member of potassium channel family involved in radiation-induced arterial hypertension development [8]. The data obtained in this study indicate that KV and K_{ATP} channels are likely to be resistant to oxidative stress, and this way may constitute a reserve mechanism for the maintenance of tissue blood supply under radiation-induced BK_{Ca} channelopathy.

The data presented by Zhang and Bolton [24] suggest the existence of two type of ATP-sensitive potassium channels, one of them (termed as MK channel) was relatively insensitive to ATP in inside-out patch experiments using rat portal vein SMCs. Generally accepted that glibenclamide is widely used for K_{ATP} channels separation and identification. It has been shown also [18] that so called glibenclamide-sensitive K^+ channels exist in rat thoracic aorta myocytes and appear to have an important role in maintenance of the resting membrane potential while classical K_{ATP} channels are closed at normal intracellular ATP concentration, and play a little role in the maintenance of membrane potential.

The situation with possible similarity and/or difference between classical K_{ATP} and glibenclamide-sensitive K^+ channels, termed also as MK channels, remains yet puzzling. Nevertheless, taking into account that the role of K_v channels in aortic SMCs membrane potential and tone regulation is negligible under basal condition (near a membrane potential of -60 mV), we have studied glibenclamide-sensitive members of potassium channels family before and after irradiation. The data obtained clearly demonstrated that irradiation led to significant increase in current carrying through glibenclamide-sensitive potassium channels, indicating existing compensatory component of outward current in SMCs under irradiation.

It is likely that relative role of this compensatory mechanisms in irradiated vascular tissues is insufficient to overcome an inhibitory effect of irradiation on vasodilator potential of vascular wall. The aim of future pharmacological interventions under irradiation is to intensify the expression of this mechanism.

The main reason to provide this study were the data in which we have observed a significant and sustained elevation in arterial blood pressure in irradiated rats [1]. The clinical studies postulated also that the most serious health problem in the population exposed to radiation following Chernobyl disaster was diseases of cardiovascular system and hypertension especially [25] but underlie mechanisms of this phenomenon remained unknown. Later we have shown that radiation impact inhibits endothelium-dependent relaxation in irradiated blood vessels [4] and decreases both BK_{Ca} current density and the level of expression in α - and β_1 - subunit that composed BK_{Ca} channel [8], i.e. it is became clear that irradiation leads to decrease in vasodilator potential of vascular wall.

The similar radiation-induced reduction in BK_{Ca} activity that are important in regulating the driving force for calcium entry and therefore for regulation of NO synthesis we observed earlier in endothelial cells [7]. Nevertheless, the question yet remains whether radiation-induced BK_{Ca} channelopathy in endothelial and smooth muscle cells really contributes to radiation-induced vascular hypercontractility and related arterial hypertension development.

Discovery of the RNAi phenomenon let us an instrument to test this hypothesis. RNAi using small interfering RNAs (siRNAs, a double stranded RNA molecule having 21–23 bp) has recently provided a powerful tool for silencing a target gene by means highly sequence-specific degradation of mRNA [11, 26, 27]. It is likely that this technique represents an ideal instrument to dissect the function of different splice variants of ion channel encoding genes.

We clearly understand that delivery of siRNAs to target tissues is a serious problem since the siRNAs must reach the

target organ and must enter to the cytoplasm of target cells. Well known that unmodified, naked siRNAs are relatively unstable in serum, as they rapidly degraded by endo- and exonucleases. Nevertheless, the review presented [16] clearly indicates that naked siRNA in many studies demonstrate significant RNA-interference effect. On the other hands, chemical or other type modification of siRNA can increase stability of these molecules *in vitro*, but can not demonstrate an increment in their efficacy *in vivo*. The main evidence of the siRNAs specific effectiveness in our experiments is the significant difference in the ionic channels mRNA expression in vascular tissues of the animals that obtained specific siRNAs as compared to the rats that were treated with scr-siRNAs.

Thus, to provide evidence of BK_{Ca} involvement into radiation-induced vascular malfunctions, we used the siRNAs ability to downregulate specific BK_{Ca} mRNA transcript expression. RT-PCR experiments clearly indicated that siRNAs to *KCNMA1* gene being administered to experimental animals led to 3-fold decrease in BK_{Ca} α -subunit mRNA level in aortic SMC as compared to tissues obtained from both control rats and the rats treated with a scr-siRNAs. The similar effects on BK_{Ca} mRNA expression in vascular tissues were seen in irradiated animals.

These data tightly correlate to inhibition of outward potassium currents carried through BK_{Ca} channels in rat thoracic aorta SMCs treated with siRNAs and this effect of siRNAs administration, in turn, is a very similar to radiation-induced inhibition in BK_{Ca} activity.

Experiments with a standard acetylcholine (ACh) test clearly demonstrated that the silencing of *KCNMA1* gene led to decrease in amplitude of maximal ACh-induced relaxation in rat thoracic aortas and accompanied with increased contractile responses of denuded vascular rings to norepinephrine in a radiation-like manner. It is known that BK_{Ca} indirectly involved in nitric oxide production in endothelial cells and they are very important for valuable endothelium-dependent relaxation.

The data obtained [7] demonstrate radiation-induced suppression of BK_{Ca} in endothelial cells which, in turns, leads to the shift of reversal potential toward more positive values. It means that irradiated endothelial cells are depolarized as compared to non-irradiated cells. It produces a significant reduction in the driving force for Ca²⁺, resulting in a decrease in NO synthesis, and producing a blunted endothelium-dependent relaxation.

Having established that the silencing of KCNMA1 gene in endothelial cells and SMCs significantly suppressed vasodilator potential of vascular wall, i.e. decreased endothelium-dependent vasorelaxation with concomitant increment in endothelium-independent vascular contractility, we next investigated *in vivo* the effect of KCNMA1 gene silencing on arterial blood pressure in comparison with irradiated animals.

Surprisingly, but we have failed in our attempts to induce sustained and significant elevation of arterial blood pressure in the group of rats treated with siRNAs targeted to KCNMA1 gene. Nevertheless, some of the rats with silencing KCNMA1 gene demonstrated pronounced increase in arterial blood pressure. The data suggest that BK_{Ca} channelopathy may be involved, at least partially, not only to radiation-induced local vascular malfunctions but to generalized vasospasm development although it is not the main reason for triggering of arterial hypertension.

The most likely that the lack of hypertensive effect of KCNMA1 gene silencing is due to the absence of L-type Ca²⁺ channels over expression in vascular tissues following siRNAs administration in contrast to that we seen after irradiation.

The next possible explanation for this surprising discovery might be the absence of BK_{Ca} in rat myocardium. As mentioned by some authors [19, 28, 29] BK_{Ca} channel ubiquitous and present in virtually all tissues except in myocardium. However, the problem appears to be more complex than meets the eye. For instance, Hu et al. [30] and Wang et al. [31] postulated the presence of BK_{Ca} in the cardiac inner mitochondrial membrane, and the data presented by Imlach et al. [32]

indicate that BK_{Ca} channels located in mice and rats heart are involved in the regulation of heart rate.

Taking into account that BK_{Ca} are comprised of a α - and β_1 -subunits we produced selective siRNAs-induced α -BK_{Ca} gene silencing. It is possible to suggest that selective loss of BK_{Ca} α -subunit is not sufficient to cause sustained hypertension. Xu et al. [33] studied BK_{Ca} β_1 -subunit knocked out mice and their results showed that these animals are not hypertensive although this type of BK_{Ca} deficiency increased reactivity of mesenteric arteries to norepinephrine. Another group of investigators [34] concluded that the hypertension associated with BK_{Ca} β_1 knockout occurs because of enhanced fluid retention due to BK_{Ca} β_1 localization in adrenal glands where it controls aldosterone production and in less degree because of vascular dysfunction.

In intermediate conclusion, KCNMA1 gene silencing in rats alters the form and function of the BK_{Ca} channel similar to irradiation, and this type of ionic channels may contribute to related vascular abnormalities. Nevertheless, it is unlikely that BK_{Ca} can operate as a crucial factor for radiation-induced arterial hypertension. It is clear that the underlying mechanism producing the alterations of vascular function under irradiation is multifaceted and trigger mechanics leading to hypertension development under irradiation involve both multiple vascular and cardiac functional changes.

The results in the present study also clearly demonstrate that single whole body γ -irradiation significantly increases the myofilament calcium sensitivity of the vascular smooth muscle cell independent of any action on the endothelium. Moreover, our results strongly suggest that the mechanism by which irradiation increases myofilament calcium sensitivity is through a PKC dependent pathway.

In the present study we examined the relationship between Ca²⁺ and tension development in vascular smooth muscle using both permeabilized and intact preparations, where [Ca²⁺]_i can either be directly controlled or directly measured, respectively. Both approaches have dis-

tinct advantages as well as disadvantages. Chemical permeabilization of the cell membrane has been commonly used to estimate the sensitivity of myofilaments to Ca^{2+} in a variety of smooth muscle preparations. This preparation allows the precise control of the intracellular environment however there is also the potential for the loss of important regulatory elements within the cell. The simultaneous measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension in the intact tissue allows one to determine directly the relationship between the two parameters during normal cellular calcium handling. Therefore this approach allows estimation of myofilament Ca^{2+} sensitivity in smooth muscle with unimpaired excitation-contraction coupling processes and retained regulatory targets for second messenger pathways. On the other hand, intracellular events cannot be controlled and small localized changes in calcium may not be measured. Combining the two preparations allows for the measurement of force during both the controlled and physiological changes in calcium concentration.

Alterations in myofilament calcium sensitivity have been shown to underlie, at least in part, the changes in smooth muscle function that occur in response to hypertension, asthma, benign prostatic hyperplasia and now based on our results, in response to γ -irradiation. The question then becomes, what are the mechanisms underlying the increase in myofilament calcium sensitivity that we observed following radiation exposure? Myofilament calcium sensitivity may be altered by influencing the enzymes that initiate or modulate actin and myosin interactions or by direct actions on the contractile proteins. Although theoretically possible, the second suggestion is not supported by experimental evidence. The first possibility is supported by a vast amount of literature [35]. Two pathways have been proposed for the enhancement of myofilament calcium sensitivity in smooth muscle. The first is the G-protein dependent activation of Rho kinase, which phosphorylates the MLC phosphatase resulting in a decrease in activity. The second is a

PKC dependent pathway whereby PKC phosphorylates and activates a MLC phosphatase inhibitor, CPI-17. The endpoint for both pathways is down-regulation of the MLC phosphatase and therefore an increase in MLC phosphorylation levels at any given $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Our results would suggest that exposure to γ -irradiation increases myofilament calcium sensitivity by augmenting the PKC pathway. This is based on the findings that the increase in calcium sensitivity in vessels from irradiated animals was reversed by either staurosporine or chelerythrine, and PKC activator, phorbol diester had no effect on pCa-force relationship in irradiated tissue while shifted this one to the left in healthy aortic rings. It is important to point out again that neither antagonist had any effect on the calcium sensitivity of vessels from control animals. Thus, non-specific actions of these PKC inhibitors were apparently not an issue in this study. Moreover, the calcium concentration curves in the permeabilized tissues were performed in the absence of GTP and activation of the intact tissues was in response to membrane depolarization. Neither stimulation regimen would be expected to significantly activate G-proteins. Importantly, PKC has been shown to be activated in KCl stimulated intact vascular smooth muscle [36] and PKC is retained and can be activated in permeabilized vascular tissues [37].

Simultaneous measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and force support this point of view. The amplitude of PDB-induced contraction in irradiated tissues was, at least, not smaller or even greater than in intact preparations while not accompanied with an increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, suggesting that myofilament calcium sensitivity had increased mainly due to high PKC activity.

If, as we speculate, PKC activity is enhanced following irradiation, then are there potential mechanisms that could produce this end result? It is well known that following irradiation, the content of oxygen derived free radicals, including superoxide anion, hydroxyl anions, and others, increases significantly in living cells and biological liq-

uids. These reactive oxygen species are associated with radiation-induced cytotoxicity and are responsible for radiation-induced lipid peroxidation and related vascular lesions. We therefore hypothesize that irradiation induces a state of oxidative injury on vascular tissue. A possible role for oxidative stress in radiation-induced vascular dysfunction is supported by the protective effect of the antioxidant, α -tocopherol in rabbit thoracic aorta [4]. α -Tocopherol was shown to prevent the loss of endothelium-dependent relaxation when administered as a single dose shortly after radiation exposure. Nevertheless, this problem remains yet unsolved and takes more convincing evidence.

Radiation has been shown to have a direct effect on altering the expression of PKC. Radiation therapy dose-dependently increased PKC in mouse lymphocytes [38]. Interestingly, differential responses were found in the radiation induced expression of α , δ , ζ isoforms of PKC. In addition, it is known that radiation induces the translocation of PKC from the cytosol to the membrane as a result of reactive oxygen formation producing membrane lipid peroxidation [39].

Thus radiation not only increases the expression of specific PKC isoforms but also the activity of PKC mediated by reactive oxygen species. These findings are relevant to our present study as the α isoform of PKC has been implicated in calcium dependent PKC induced contractions of smooth muscle and the novel PKC isoform ε of which ζ is also a member has been implicated in calcium-independent PKC induced contractions.

It should be born in mind that vascular dysfunction including an increased PKC or Rho – kinase activities under irradiation is mediated by multiple mechanisms and maybe, at least partially, related to changes in NO metabolism. It is well known that phorbol esters may

inhibit NO release, and thus an elevation of PKC activity might interfere with NO synthesis. In turn, it is likely that NO induces rat aorta dilatation via inhibition of Rho-kinase. Just recently it has been shown [41] that NO possesses the ability to relax smooth muscle via protein phosphatases activation. It known that NO-generating agents may decrease phosphotransferase activity of purified PKC with IC_{50} $7.5 \cdot 10^{-5}$ M and this effect was blocked by NO scavenger oxyhemoglobin and reversed by dithiothreitol [41]. In case when NO-dependent component of relaxation is abolished resulting irradiation, PKC activity in vascular wall could be elevated and contractile force development related to increased myofilament calcium sensitivity might be increased too. At the same time experiments on skinned smooth muscle clearly demonstrate that direct effect of radiation on PKC-related mechanism of calcium myofilament sensitivity take place.

Therefore, we propose the hypothesis that whole body γ -irradiation results in the production of reactive oxygen species, which alters vascular function by an effect on both the endothelial layer and the smooth muscle cell. In the smooth muscle cell, specific isoforms of PKC are up regulated and activated, which produces an apparent increase in myofilament calcium sensitivity and BK_{Ca} expression and function. The combination of decreased NO release from damaged endothelial cells and hypercontractility of the vascular smooth muscle cells act in concert to produce increases in arterial blood pressure and vasospasm in response to normally occurring levels of endogenous agents.

Acknowledgements

This study was supported by The Physiological Society 'Centre of Excellence Award Scheme'.

1. Soloviev, A. I., Stefanov, A. V., Tishkin, S. M., Khromov, A. S., Parshikov, A. V., Ivaniva, I. V., Gurney, A. M. 2002. Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from gamma-radiation. *J. Physiol. Pharmacol.* 53, 707–712.
2. Shimizu, Y., Pierce, D. A., Preston, D. L., Mabuchi, K. 1999. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part II Noncancer Mortality: 1950–1990. *Radiat. Res.* 152, 374–389.
3. Cardis, E., Hatch, M. 2011. The Chernobyl accident – an epidemiological perspective. *Clinical Oncology*, doi:10.1016/j.clon.2011.01.510

4. Soloviev, A. I., Tishkin, S. M., Parshikov, A. V., Ivanova, I. V., Goncharov, E. V., Gurney, A. M. 2003. Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 138, 837–844.
5. Wang, Y., Zhang, H.T., Su, X.L., Deng, X.L., Yuan, B.X., Zhang, W., Wang, X.F., Yang, Y.B. 2010. Experimental diabetes mellitus down-regulates large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cerebral artery smooth muscle and alters functional conductance. *Curr. Neurovasc. Res.* 7 (2), 75–84.
6. Feletou, M.S., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M. 2007. Increased spontaneous tone in renal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1673–H1683.
7. Tishkin, S. M., Rekalov, V. V., Ivanova, I. V., Moreland, R. S., Soloviev, A. I. 2007. Ionizing non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in endothelial cells of coronary artery: Possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation. *Intern. J. of Radiat. Biol.*, 83, 161–169.
8. Soloviev, A. I., Tishkin, S. M., Ivanova, I. V., Zelensky, S. N., Dosenko, V. E., Kyrychenko, S. V., and Moreland, R.S. 2009. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat aortic smooth muscle cells. *Life Science.* 84, 164–171.
9. Cox, D. H. 2006. BK_{Ca} -channel structure and function. *SVNY290-Chung*, July 25, 171–217.
10. Berkefeld, H., Fakler, B., Schulte, U., 2010. Ca^{2+} -activated K^{+} channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev.* 90, 1437–1459.
11. Kim, S. H., Jeong, J. H., Cho, K. C., Kim, S. W., Park, T. G. 2005. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylamine). *J Control Rel.* 104, 223–232.
12. Carthew, R. W., Sontheimer, E. J. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 136, 642–655.
13. Sibley, C. R., Seow, Y., Wood, M. 2010. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing. *Mol Ther.* 18, 466–476.
14. Levesque L., Lam M. H., Allaire P., Mondat M., Houle S., Beaudoin G., Donath D., and Leclerc G. 2001. Effects of radiation exposure on vascular responsiveness. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37, 381–393.
15. Soloviev, A. and Bershtein, S. 1992. The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C. *J Hypertens.* 10, 131–136.
16. Akhtar, S., Benter, I. F. 2007. Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*. *J Clin Invest.* 117, 3623–32.
17. Soloviev, A. I., Tishkin, S. M., Zelensky, S. N., Ivanova, I. V., Kizub, I. V., Pavlova, A. A., Moreland R. S. 2005. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C. *Am. J. Physiol. (Regul. Integr. and Compar. Physiol.)* 289, R755–R762.
18. Mishra, S. K., Aaronson P. I. 1999. A role for glibenclamide-sensitive, relatively ATP-insensitive K^{+} current in regulating membrane potential and current in rat aorta.
19. Nelson, M. T., Quayle, J. M. 1995. Physiological role and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268, C. 799–822.
20. Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., Adelman, J. P. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8 (3), 321–329.
21. Walner, M., Meera, P., Toro, L. 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (7), 4137–4142.
22. Cox, R. H., Folander, K., Swanson, R. 2001. Different expression of voltage-gated K^{+} channels genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 37, 1315–1322.
23. Korovkina, V. P., England, S. K. 2002. Detection and implications of potassium channel alterations. *Vasc Pharmacol.* 38 (1), 3–12.
24. Zhang, H. L., Bolton, T. B. 1996. Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 118, 105–114.
25. Klimov, D. V., Adziarykha, K. N. 2001. Risk factors for the development of hypertension in the liquidators of 1986–1987. *Intern. J. of Radiation Med.* 3, 59 (Abstr. of the 3rd Intern. Confer. Health effects of the Chernobyl accident: results of the 15-year follow-up studies. June 4–8, 2001, Kiev, Ukraine).
26. Hammond, S. M., Caudy, A. A., Hannon, G. J. 2001. Post-transcription gene silencing by double stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 110–119.
27. McManus, M. T., Sharp, P. A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 3, 737–747.
28. Wang, X-L., Ye D., Peterson, T. E., Cao, S., Shah, V. H., Katusic, Z., Sieck, G. C., Lee, H-C. 2005. Caveolae targeting and regulation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 11656–11664.
29. Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R. et al. 2005. International union of pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57, 463–472.
30. Xu, H., Liu, Y., Wang, S., McDonald T., Van Eyk, J. E. et al. 2002. Cytoprotective role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298, 1029–1033.

31. Wang, X., Fisher, P. W., Kukreja, R. C. 2008. Essential role of mitochondrial Ca^{2+} -activated and ATP-sensitive K^+ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J. Molec. Cell. Cardiol.* 44, 105–113.
32. Imlach, W. L., Finch, S. C., Miller, J. H., Meredith, A. L., Dalziel, J. E. 2010. A role of BK channels in heart rate regulation in rodents. *PLoS One.* 5 (1). e8698. doi:10.137
33. Xu, H., Garver, H., Galligan, J. J., Fink, G. D. 2011. Large-conductance Ca^{2+} -activated channel β_1 -subunit knockout mice are not hypertensive. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H476–H485.
34. Grimm, P. R., Sanson, S. C. 2010. BK channels and a new form of hypertension. *Kidney Internat.* 78, 956–962.
35. Somlyo A. P. and Somlyo A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 83, 1325–1258, 2003.
36. Singer H. A., Schworer C. M., Sweeley C., and Benscoter H. 1992. Activation of protein kinase C isozymes by contractile stimuli in arterial smooth muscle. *Arch Biochem Biophys.* 299, 320–329.
37. Chatterjee M and Tejada M. 1986. Phorbol ester-induced contraction in chemically skinned vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 251, C356–C361.
38. Varadakar P., Krishna M., and Verma N. 2003. Dose-dependent differential expression of protein kinase C isozymes in mouse lymphocytes after gamma irradiation *in vivo* and *ex vivo*. *Radiat Res.* 159, 453–457.
39. Nakajima T. and Yukawa O. 1996. Radiation-induced translocation of protein kinase C through membrane lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Internat'l J Radiat Biol.* 70, 473–480.
40. Soloviev A., Lehenky V., Zelensky S. and Hellstrand P. 2004. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. *Cell Calcium.* 36, 165–173.
41. Gopalkrishna R., Chen Z., Gundimeda U. 1993. Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol Chem.* 268, 27180–27185.
42. Li, G., Cheung, D. W. 1999. Effect of paxilline on K^+ channels in rat mesenteric arterial cells. *Eur J Pharmacol.* 370, 65–72.

A. I. Soloviev

The BK_{Ca} channels deficiency and high protein kinase C activity as a main reasons for radiation-induced vascular hypercontractility

It is likely that large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channels channelopathy tightly involved in vascular malfunctions and arterial hypertension development. In the present study, we compared the results of siRNAs-induced $\alpha\text{-BK}_{\text{Ca}}$ gene silencing and vascular abnormalities produced by whole-body ionized irradiation in rats. The experimental design comprised RT-PCR and patch clamp technique, thoracic aorta smooth muscle (SM) contractile recordings using intact and chemically permeabilized rat thoracic aortic rings combined with cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) measurements, arterial blood pressure (BP) measurements on the 30th day after whole body irradiation (6 Gy) and following siRNAs KCNMA1 gene silencing *in vivo*. The expression profile of BK_{Ca} mRNA transcripts in SM was significantly decreased in siRNAs-treated rats in a manner similar to irradiated SM. In contrast, the mRNA levels of K_v and K_{ATP} were significantly increased while L-type calcium channels mRNA transcripts demonstrated tendency to increment. The SMC obtained from irradiated animals and after KCNMA1 gene silencing showed a significant decrease in total K^+ current density amplitude. Paxilline (500 nM)-sensitive components of outward current were significantly decreased in both irradiated and gene silencing SMC. KCNMA1 gene silencing increased SM sensitivity to norepinephrine while Ach-induced relaxation had decreased. The silencing of KCNMA1 had no significant effect on BP while radiation produced sustained arterial hypertension. Therefore, radiation alters the form and function of the BK_{Ca} channel and this type of channelopathy may contribute to related vascular abnormalities. Nevertheless, it is unlikely that BK_{Ca} can operate as a crucial factor for radiation-induced arterial hypertension.

Irradiation significantly shifted pCa-tension in β -escin permeabilized smooth muscle on the 9th and 30th days post-irradiation to the left suggesting that myofilament Ca^{2+} sensitivity had increased. Inhibitors of protein kinase C (PKC), chelerythrine and staurosporine, had no effect on the pCa-tension curves in control permeabilized tissues but significantly shifted the curves to the right in permeabilized tissues on the 9th and 30th days post-irradiation. Phorbol dibutylate (PDB, 10^{-7} M), a potent PKC activator, shifted the pCa-tension response relationship for skinned smooth muscles to the left in a healthy tissues and was without effect in irradiated vascular rings. Simultaneous measurements of contractile force and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ showed that the coefficient of myofilament Ca^{2+} sensitivity defined as a ratio of force change to $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ significantly increased following γ -irradiation. Stimulation of intact aortic smooth muscles with PDB (10^{-6} M) produced a sustained progressively developing tonic contraction while an increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was transient. In contrast, in irradiated tissues the amplitude of PDB-induced contraction was even higher than that seen in intact tissues and there was no any elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These data strongly support the hypothesis that the sensitivity of vascular smooth muscle myofilaments to Ca^{2+} is increased following irradiation and this effect is dependent also on activation of PKC.

Therefore, we propose the hypothesis that whole body γ -irradiation results in the production of reactive oxygen species, which alters vascular function by an effect on both the endothelial layer and the smooth muscle cell. In the smooth muscle cell, specific isoforms of PKC are up regulated and activated, which produces an apparent increase in myofilament calcium sensitivity and BK_{Ca} expression and function. The combination of decreased NO release from damaged endothelial cells and hypercontractility of the vascular smooth muscle cells act in concert to produce increases in arterial blood pressure and vasospasm in response to normally occurring levels of endogenous agents.

Key words: smooth muscle contractility, RNA interference, BK_{Ca} channels, irradiation, calcium sensitivity, contractile proteins, hypertension

А. І. Соловйов

Порушення функції Ca^{2+} -залежних калієвих каналів великої провідності та висока активність протейнінази С – головні причини розвитку гіперскоротливості судин, викликаной впливом радіації

Цілком ймовірно, що порушення провідності кальцій-активованих калієвих каналів великої провідності (BK_{Ca}) тісно пов'язане з розвитком судинних порушень і розвитком артеріальної гіпертензії. У цьому дослідженні ми порівняли результати глушіння гена, що кодує експресію BK_{Ca} у щурів, за допомогою техніки РНК-інтерференції з судинними порушеннями, викликаними впливом іонізуючої радіації в дозі 6 Грей. В експериментах використовували методи RT-PCR та patch-clamp, реєстрацію скоротливої активності гладеньких м'язів (SM) з використанням інтактних і хімічно скінрованих аортальних кілець з одночасним виміром внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$, вимірювання артеріального тиску (АТ) на 30-й день після опромінення. Профіль експресії транскриптів мРНК BK_{Ca} в SM був значно знижений у щурів, які отримували siRNAs і опромінених тварин. Навпаки, рівні мРНК K_v і K_{ATP} були значно збільшені, а транскрипти мРНК кальцієвих каналів L-типу продемонстрували тенденцію навіть до збільшення. Клітини SM, отримані від опромінених тварин і після глушіння гена $KCNMA1$, показали значне зменшення загальної амплітуди щільності вихідного струму K^+ . У разі впливу паксилліну (блокатор BK_{Ca}) – чутливі компоненти вихідного струму значно зменшувалися як за опромінення, так і в разі глушіння гена $KCNMA1$. Глушіння гена $KCNMA1$ збільшило чутливість SM до норадреналіну, у той час як амплітуда ацетилхолін-індукованого розслаблення SM зменшилася. Глушіння $KCNMA1$ суттєво не впливало на рівень АТ, у той час як радіація викликала стійку артеріальну гіпертензію. Отже, випромінювання змінює експресію та функцію каналу BK_{Ca} , і цей тип каналопатії може сприяти виникненню судинних аномалій. Проте малоймовірно, що BK_{Ca} каналопатія може бути єдиним і вирішальним фактором розвитку пострадіаційної артеріальної гіпертензії.

Опромінення зміщує криву рСа-напруга в гладенькому м'язі на 9-й і 30-й дні після опромінення вліво, що свідчить про підвищення Ca^{2+} -чутливості міофіламентів. Інгібітори протейнінази С (PKC), хелеритрин і стауроспорин не впливали на криві рСа-напруга в контрольних скінрованих SM, але значно зрушили криві вправо на 9-й і 30-й дні після опромінення. Форбол дибутірат (PDB, 10^{-7} моль/л), потужний активатор PKC, змістив криву рСа-напруга вліво в здорових тканинах і не впливав на опромінені судинні кільця. Одночасні вимірювання скорочувальної сили і $[Ca^{2+}]_i$ показали, що коефіцієнт Ca^{2+} – чутливості скорочувальних білків, який визначається як відношення природної сили до змін $[Ca^{2+}]_i$, значно збільшується після опромінення. Стимуляція інтактних SM аорти PDB (10^{-6} моль/л) викликала стійке прогресуюче тонічне скорочення, в той час як приріст в $[Ca^{2+}]_i$ був короточасним. Навпаки, в опромінених тканинах амплітуда індукованого PDB скорочення була навіть вище, ніж в інтактних. У цьому разі не було ніякого підвищення в $[Ca^{2+}]_i$. Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що після опромінення збільшується чутливість міофіламентів SM судин до Ca^{2+} , і цей ефект обумовлений активацією PKC.

Можна вважати, що γ -опромінення призводить до утворення реактивних форм кисню й активації PKC. Це призводить до збільшення кальцієвої чутливості міофіламентів і зниження експресії та функції BK_{Ca} . Усе це разом узятє здатне призвести до гіперскоротливості клітин SM судин і викликати розвиток вазоспазму та збільшення АТ.

Ключові слова: скоротливість гладеньких м'язів, РНК-інтерференція, BK_{Ca} канали, опромінення, кальцієва чутливість, скорочувальні білки, гіпертензія

А. И. Соловьев

Нарушение функции Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов большой проводимости и высокая активность протеинкиназы С – главные причины развития гиперсократимости сосудов, вызванной воздействием радиации

Вполне вероятно, что нарушение проводимости кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca}) тесно связано с развитием сосудистых нарушений и развитием артериальной гипертензии. В настоящем исследовании мы сравнили результаты глушения с помощью техники РНК-интерференции гена, кодирующего экспрессию BK_{Ca} у крыс, с сосудистыми нарушениями, вызванными воздействием ионизирующей радиации в дозе 6 Грей. В экспериментах использовали методы RT-PCR и patch-clamp, регистрацию сократительной активности гладких

мышц (SM) с использованием интактных и химически скинированных аортальных колец с одновременным измерением внутриклеточной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$, измерение артериального давления (АД) на 30-й день после облучения. Профиль экспрессии транскриптов мРНК BK_{Ca} в SM был значительно снижен у крыс, получавших siRNAs и облученных животных. Напротив, уровни мРНК K_v и K_{ATP} были значительно увеличены, а транскрипты мРНК кальциевых каналов L-типа продемонстрировали тенденцию даже к увеличению. Клетки SM, полученные от облученных животных и после глушения гена $KCNMA1$, показали значительное уменьшение общей амплитуды плотности выходящего тока K^+ . При действии паксиллина (блокатора BK_{Ca}) чувствительные к нему компоненты выходящего тока значительно уменьшались как при облучении, так и при подавлении гена $KCNMA1$. Глушение гена $KCNMA1$ увеличило чувствительность SM к норэпинефрину, в то время как амплитуда ацетилхолин-индуцированного расслабления SM уменьшилась. Глушение $KCNMA1$ не оказало существенного влияния на уровень АД, в то время как радиация вызывала устойчивую артериальную гипертензию. Следовательно, излучение изменяет экспрессию и функцию канала BK_{Ca} , и этот тип каналопатии может способствовать возникновению сосудистых аномалий. Тем не менее, маловероятно, что BK_{Ca} каналопатия может действовать как единственный и решающий фактор развития пострадиационной артериальной гипертензии.

Облучение сдвигало кривые рСа-напряжение в SM на 9-й и 30-й дни после облучения влево, что свидетельствует о повышении Ca^{2+} -чувствительности миофиламентов. Ингибиторы протеинкиназы C (PKC), хелеритрин и стауроспорин не влияли на кривые рСа-напряжение в контрольных скинированных SM, но значительно сдвинули кривые вправо на 9-й и 30-й дни после облучения. Форбол дибутират (PDB, 10^{-7} моль/л), мощный активатор PKC, сдвинул отношение рСа-напряжение влево в здоровых тканях и не оказывал влияния на облученные сосудистые кольца. Одновременные измерения сократительной силы и $[Ca^{2+}]_i$ показали, что коэффициент Ca^{2+} -чувствительности сократительных белков, определяемый как отношение прироста силы к изменениям $[Ca^{2+}]_i$, значительно увеличивается после облучения. Стимуляция интактных SM аорты PDB (10^{-6} моль/л) вызывала устойчивое прогрессирующее тоническое сокращение, в то время как приращение в $[Ca^{2+}]_i$ было транзиторным. Напротив, в облученных тканях амплитуда индуцированного PDB сокращения была даже выше, чем в интактных тканях. При этом не было никакого повышения $[Ca^{2+}]_i$. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что после облучения увеличивается чувствительность миофиламентов SM сосудов к Ca^{2+} , и этот эффект обусловлен активацией PKC.

Можно полагать, что γ -облучение приводит к образованию реактивных форм кислорода и активации PKC. Это приводит к увеличению кальциевой чувствительности миофиламентов и снижению экспрессии и функции BK_{Ca} . Все это вместе взятое способно привести к гиперсократимости клеток SM сосудов и вызвать развитие вазоспазма и увеличение АД.

Ключевые слова: сократимость гладких мышц, РНК-интерференция, BK_{Ca} -каналы, облучение, кальциевая чувствительность, сократительные белки, гипертензия

Надійшла: 11 лютого 2018 р.

Контактна особа: Соловйов А. І., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 536 13 41. Електронна пошта: tonysolpharm@gmail.com

А. О. Шарова, Н. І. Гринчук, Д. М. Дудікова, В. В. Недашківська,
З. С. Суворова, Н. О. Вринчану

Антибактеріальна активність 4-(1-адамантил)- (1-амінобутил)бензолу відносно біоплівки *S. aureus*

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

Ключові слова: похідні адамантану,
антибактеріальна активність,
Staphylococcus aureus, біоплівки

Сьогодні основною проблемою в лікуванні інфекційних захворювань є резистентність збудників до антибактеріальних засобів. Проявом резистентності є утворення мікроорганізмами біоплівок – прикріплених до поверхні та оточених біополімерним матриксом мікробних угруповань, здатних формуватись на біотичних (слизові оболонки, тканини) та абіотичних (медичні пристрої, катетери, імпланти, протези) поверхнях та спричиняти так звані девайс-асоційовані захворювання. Розвиток біоплівкових спільнот є однією з основних стратегій виживання мікроорганізмів як у навколишньому середовищі, так і в організмі людини. Утворення біоплівок бактеріями створює великі труднощі в медичній практиці, оскільки це значно підвищує стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних і дезінфікуючих засобів, а також факторів імунної системи організму, збільшуються витрати на лікування пацієнта, а також летальність від інфекційних ускладнень [1, 2]. Натеper у клінічну практику не впроваджено жодного антимікробного препарату, який би в нетоксичних для пацієнта дозах впливав на біоплівкові форми мікроорганізмів. Клітини в складі біоплівки в 1000 разів більш стійкі до дії антибіотиків, ніж планктонні мікроорганізми [2]. Згідно з даними літератури, антимікробні препарати не тільки не проявляють антибіоплівкової дії, але й здатні стимулювати її утворення. Так, гентаміцин не активний відносно сформованих

золотистим стафілококом біоплівок, проте стимулює їхнє утворення [3].

Одним з шляхів вирішення проблеми антибіотикорезистентності є пошук сполук з виразною антибактеріальною дією, у тому числі й антибіоплівковою активністю, та створення на їхній основі нових ефективних і безпечних лікарських засобів.

Нашими попередніми дослідженнями виявлено виразну антибактеріальну та антифунгальну активність у адамантанвмісної сполуки 4-(1-адамантил)-(1-амінобутил)бензолу (шифр – АМ-166), до дії якої чутливі як планктонні, так і біоплівкові мікроорганізми. Антимікробна активність сполуки АМ-166 відносно планктонних мікроорганізмів обумовлена мембранотропними властивостями: змінами ультраструктури клітин бактерій та грибів, взаємодією з білком, фосфоліпідами і ДНК як компонентами мембрани, підвищенням проникливості ендогенних речовин крізь цитоплазматичну мембрану мікроорганізмів. АМ-166 сприяє підвищенню вмісту в зовнішній мембрані бактерій ліпополісахаридів зі зміненим моносахаридним та жирнокислотним складом і стимулює утворення ергостерину в грибів [4–7].

Мета дослідження – встановити активність АМ-166 відносно біоплівок *Staphylococcus aureus* 222 порівняно з антимікробними засобами.

Дане дослідження є фрагментом планової науково-дослідної роботи лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» «Дослідження впливу аміноспиртів з адамантильним та N-алкіларильним радикалом на про-

цеси плівкоутворення монокультур бактерій, грибів та мікробних асоціацій» (№ державної реєстрації 0115U002442).

Матеріали та методи. Дослідження проводили з використанням клінічного штаму *S. aureus* 222, виділеного від хворого з гнійно-запальним процесом. Культура виявила резистентність до дії оксациліну, гентаміцину, рифампіцину та ципрофлоксацину, помірну чутливість до дії еритроміцину, чутливість – до азитроміцину, амікацину та кліндаміцину. Досліджений тест-штам *S. aureus* 222 характеризувався виразними адгезивними властивостями ($0,24 < OD$) [12].

Антимікробну активність сполуки АМ-166 та препаратів порівняння ципрофлоксацину, гентаміцину, азитроміцину та рифампіцину досліджували методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі (ПС) № 8 та диско-дифузійним методом з використанням ПС № 1. Оцінку антимікробної активності здійснювали за показником МІК та зонами затримки росту мікроорганізмів [8–11]. Адгезивні властивості *S. aureus* 222 до абіотичної поверхні досліджували за Christensen [12]. В експериментах використано нічну культуру золотистого стафілококу, розведену 1:100 поживним середовищем. Плівкоутворення *S. aureus* 222 досліджували в динаміці впродовж 1, 3, 5 та 7 год за 37 °С. Термін інкубації складав (18–24) год за 37 °С. Фіксацію біоплівки здійснювали 96,0 % етанолом (15 хв). Для виявлення адгезованих мікроорганізмів у лунки планшетів вносили 0,1 % розчин генціанвіолету, витримували 5 хв і промивали лунки проточною водою. Результати реєстрували за довжини хвилі 630 нм за допомогою «Absorbance Microplate Reader Elx800».

Здатність адамантанвмісної сполуки впливати на плівкоутворення та сформовані біоплівки досліджували на полістиролових планшетах для імуноферментного аналізу [13, 14]. Для вивчення впливу сполуки та препаратів порівняння на плівкоутворення сполуку та препарати порівняння вносили в інкубаційне середовище одночасно, для оцінки впливу на сформовані біоплівки – на 1-у та 2-у добу залежно від

умов експерименту. У дослідженні використано 1-добову культуру тест-штаму золотистого стафілококу, вирощену на рідкому ПС № 8. Для приготування інокуляту культуру в ПС розводили в 100 разів (1:100). Термін інкубації мікробної культури з АМ-166 або препаратами порівняння складав 24 год (37 °С). Після закінчення терміну інкубації вміст планшетів видаляли, лунки тричі промивали дистильованою водою, вносили 0,1 % розчин генціанвіолету та витримували 10–15 хв. Для виявлення сформованої біоплівки барвник екстрагували етанолом (15 хв). Вимірювання оптичної щільності проводили на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) за довжини хвилі 630 нм. Контролем були інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без додавання розчинів сполуки або препаратів.

Експерименти щодо здатності мікроорганізмів до плівкоутворення на засобах медичного застосування здійснювали на урогенітальних катетерах з полівінілхлоридного матеріалу виробництва ТОВ «Допомога-1» (розмір 16). Здатність АМ-166 запобігати плівкоутворенню вивчали за умови одночасного внесення в просвіт катетера мікроорганізмів та сполуки або препаратів, термін інкубації складав 24 год (37 °С). Для встановлення впливу на сформовані біоплівки АМ-166 або препарати вносили через 24 год після інокуляції катетерів. Інтенсивність плівкоутворення оцінювали порівняно з контролем за стандартною методикою з використанням генціанвіолету [13]. Концентрації сполуки АМ-166 і препаратів порівняння становили 5,0 МІК.

Для статистичної обробки отриманих даних і виявлення відмінностей між дією сполуки та препаратів порівняння були використані критерії Краскела-Уолеса та Ньюмена-Кейлса. Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statistica» (StatSoft. Inc., USA) [15, 16]. Дані досліджень представлені як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна помилка середнього.

Результати та їх обговорення. Дослідженням антимікробної дії сполуки

АМ-166 і препаратів порівняння відносно клінічного штаму *S. aureus* 222 встановлено, що МІК АМ-166 складає – 2,5 мкг/мл, ципрофлоксацину – 16 мкг/мл, азитроміцину – 0,12 мкг/мл, гентаміцину – 32 мкг/мл, рифампіцину – 0,5 мкг/мл.

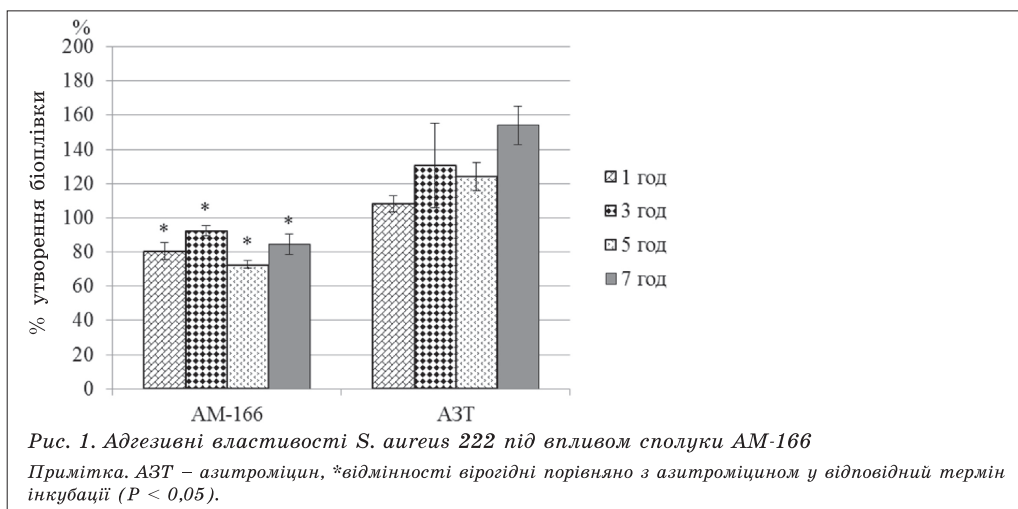
Результати досліджень щодо впливу сполуки АМ-166 на адгезію клітин золотистого стафілокока наведено на рисунку 1.

Отримані дані (рис. 1) свідчать, що сполука АМ-166 у концентрації 5,0 МІК порушує адгезію клітин *S. aureus* 222 до абіотичної поверхні (інгібіція впродовж 1 год впливу складає 19,6 %). Дослідження динаміки адгезії бактерій впродовж перших 7 год підтверджують здатність адамантанвмісної сполуки порушувати прикріплення до абіотичної поверхні, ступінь інгібування в межах 7,4–27,3 % залежно від терміну інкубації. Препарат порівняння азитроміцин у концентрації 5,0 МІК не порушує адгезію золотистого стафілокока до абіотичної поверхні за умови обробки клітин протягом 1–7 год та вірогідно поступається похідному адамантану.

Наступним етапом дослідження сполуки з адамантильним радикалом було встановлення її здатності попереджувати формування біоплівки та руйнувати сформовані 1- та 2-добові біоплівки на поверхні полістиролу. Дослідження впливу адамантанвмісної сполуки та препаратів порівняння здійснювали в концентраціях, які відповідали 0,5 МІК і 5,0 МІК. Результати експериментів наведено на рисунку 2.

Згідно з даними рисунка 2А, адамантанвмісна сполука порушує формування біоплівки золотистим стафілококом: за концентрації 5,0 МІК – на 88,9 %, 0,5 МІК – на 54,1 %. У разі оцінки впливу препаратів порівняння встановлено, що в концентрації 5,0 МІК біоплівка практично не формується за дії азитроміцину, ципрофлоксацину та гентаміцину (ступінь інгібування 93,2–97,6 %). Важливим є те, що препарати порушують плівкоутворення в субінгібуючій концентрації 0,5 МІК, пригнічення плівкоутворення залежно від препарату становить 29,8–47,5 %. Експерименти показали, що найменш ефективним відносно тест-штаму золотистого стафілокока є рифампіцин, у разі 5,0 МІК пригнічення становить 68,9 %. Зниження концентрації препарату до 0,5 МІК супроводжується стимуляцією плівкоутворення (на 70,0 % більше порівняно з контролем). Аналіз отриманих даних показав, що сполука АМ-166 у концентрації 5,0 МІК вірогідно переважає рифампіцин ($P < 0,05$) та не поступається іншим препаратам порівняння ($P > 0,05$).

Результати досліджень щодо вивчення здатності АМ-166 і препаратів порівняння впливати на сформовані 1-добові біоплівки *S. aureus* 222 (рис. 2Б) свідчать, що адамантанвмісна сполука в концентрації 5,0 МІК руйнує сформовану 1-добову біоплівку, ступінь інгібування складає 68,8 %. Сполука в концентрації 0,5 МІК інгібуючої дії не справляє.



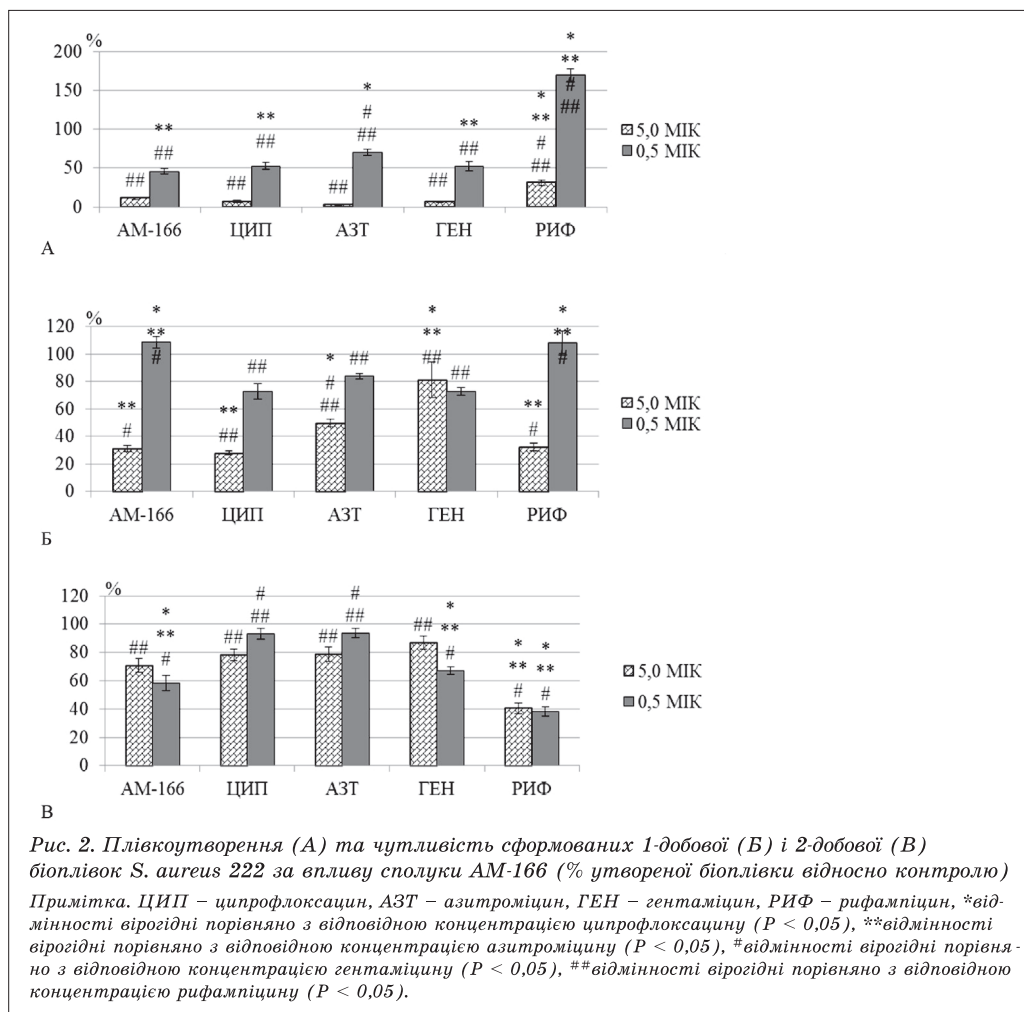


Рис. 2. Плівкоутворення (А) та чутливість сформованих 1-добової (Б) і 2-добової (В) біоплівки *S. aureus* 222 за впливу сполуки АМ-166 (% утвореної біоплівки відносно контролю)
Примітка. ЦИП – ципрофлоксацин, АЗТ – азитроміцин, ГЕН – гентаміцин, РИФ – рифампіцин, *відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією ципрофлоксацину ($P < 0,05$), **відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією азитроміцину ($P < 0,05$), #відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією гентаміцину ($P < 0,05$), ##відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією рифампіцину ($P < 0,05$).

Серед препаратів порівняння найактивнішими виявилися ципрофлоксацин і азитроміцин, для яких характерний дозозалежний вплив: у разі 5,0 МІК інгібіція складала 72,2 і 50,2 %, 0,5 МІК – 27,3 і 16,1 % відповідно. Інгібуючий ефект гентаміцину в субінгібуючій концентрації склав 27,1 %, у разі 5,0 МІК інгібуюча дія зменшилась до 18,7 %. Значно вищою порівняно з гентаміцином є активність рифампіцину, за концентрації 5,0 МІК деструкція біоплівки складала 67,8 %.

Отримані результати щодо впливу АМ-166 і препаратів порівняння на сформовані 2-добові біоплівки *S. aureus* 222 (рис. 2В) виявили деякі відмінності порівняно з 1-добовою біоплівкою. 2-добова біоплівка є більш стійкою до дії сполуки, за 5,0 МІК деструкція біоплівки зменшується на 39,5 % і скла-

дає 29,3 %. Разом з тим, слід відмітити активність сполуки в субінгібуючій концентрації (41,8 %). За антибіоплівковою дією АМ-166 переважає таку ципрофлоксацину, азитроміцину та гентаміцину, яка складає в разі 5,0 МІК – 22,0 %, 21,3 % та 13,1 %, 0,5 МІК – 7,0 %, 6,2 % та 33,1 % відповідно ($P < 0,05$). Відносно 2-добової біоплівки сполука АМ-166 дещо поступається рифампіцину, антибіоплівкова активність якого за 5,0 МІК становить 59,6 %, 0,5 МІК – 61,8 %.

Важливим етапом досліджень було вивчення здатності сполуки АМ-166 попереджувати формування біоплівки на поліуретанових катетерах.

Отримані дані щодо впливу адамантанвісної сполуки на плівкоутворення та сформовані в катетерах біоплівки *S. aureus* 222 наведено на рисунку 3.

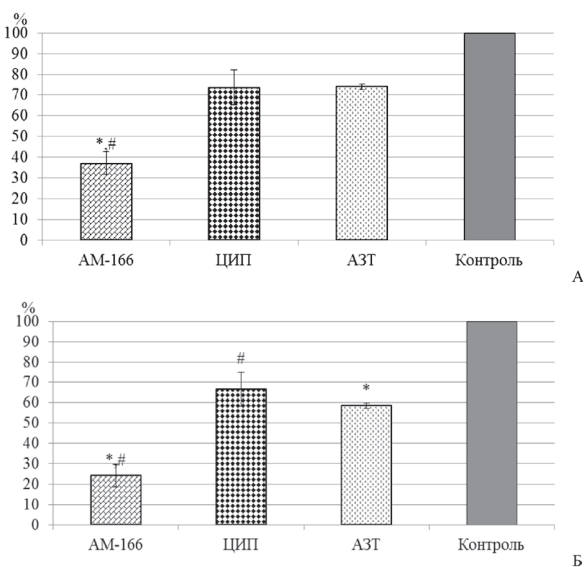


Рис. 3. Плівкоутворення (А) і чутливість (Б) сформованих у катетері біоплівки *S. aureus* 222 під впливом сполуки АМ-166 (% утвореної біоплівки відносно контролю)

Примітка. ЦІП – ципрофлоксацин, АЗТ – азитроміцин, *відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією ципрофлоксацину ($P < 0,05$), #відмінності вірогідні порівняно з відповідною концентрацією азитроміцину ($P < 0,05$).

Експериментами встановлено (рис. 3А), що попередня обробка поліуретанових катетерів розчином сполуки АМ-166 у концентрації 5,0 МІК призводить до пригнічення плівкоутворення золотистого стафілокока, ступінь інгібування становить 63,0 % порівняно з контролем. Активність сполуки є вірогідно вищою за таку обох препаратів порівняння – ципрофлоксацину та азитроміцину (інгібіція 26,3 і 25,9 % відповідно).

Отримані дані щодо впливу сполуки на сформовані біоплівки наведено на рисунку 3Б. Результати експериментів показали, що сполука АМ-166 здатна руйнувати сформовану в катетерах «молоду» 1-добову біоплівку, ступінь інгібування – 75,7 %. Адамантанвісна сполука вірогідно переважала за активністю препарати порівняння: активність азитроміцину – 49,5 %, ципрофлоксацину – 35,6% порівняно з контролем.

Таким чином, проведені дослідження довели, що сполука з адамантильним радикалом більш виразно впливає на ранні етапи плівкоутворення, порушує адгезію золотистого стафілокока до абіотичної поверхні, хоча в катетерній моделі похідне адамантану виявляє

також інгібуючу дію щодо сформованих біоплівки.

Висновки

1. Адамантанвісна сполука АМ-166 проявляє антиадгезивні властивості відносно *S. aureus* 222 та за своєю дією переважає таку препарату порівняння азитроміцину.
2. АМ-166 виявляє пригнічуючий вплив на плівкоутворення золотистого стафілокока (інгібіція 54,1–88,9 % залежно від концентрації). Встановлено, що 1-добова біоплівка виявилася більш чутливою за дії в концентрації 5,0 МІК (68,8 %), 2-добова – 0,5 МІК (41,8 %). Встановлено, що антибіоплівкова дія досліджуваної сполуки не поступається або переважає таку препаратів порівняння.
3. В експериментах встановлено, що сполука АМ-166 проявляє виразний пригнічуючий вплив відносно біоплівок *S. aureus* 222, сформованих на катетерах (63,0 і 75,7 %), що вірогідно переважає такий препаратів порівняння.
4. У подальших поглиблених дослідженнях необхідно встановити механізм антибіоплівкової активності сполуки АМ-166.

1. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса / Г. Г. Харсеева, Я. Н. Фролова, А. Ю. Миронов // *Успехи современной биологии*. – 2015. – Т. 135, № 4. – С. 346–354.
2. *Ерошенко Д. В.* Влияние факторов внешней среды на первые этапы образования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*: дисс. канд. биол. наук: 03.02.03 / Д. В. Ерошенко. – Пермь, 2015. – 137 с.
3. Вплив антибіотиків на біоплівкоутворення *MSSA* та *MRSA* штамми стафілокока / С. А. Деркач, І. А. Воронкіна, Л. С. Габишева [та ін.] // *Інфекційні хвороби*. – 2016. – № 4. – С. 46–51.
4. Влияние 4-(1-адамантил)-1-(1-аминобутил)бензола на биопленку *E. coli* / Н. А. Врынчану, С. В. Гриневиц, З. С. Суворова, А. С. Шаламай // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2015. – Т. 17, № 2, Приложение 1. – С. 21–22 (тези).
5. Влияние производного (1-адамантил)-фенола ЮК-23 на формирование биопленок *Candida albicans* / С. В. Гриневиц, Н. А. Врынчану, З. С. Суворова [и др.] // *Проблемы медицинской микологии*. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 62 (тези).
6. Adamantane derivative inhibits *Escherichia coli* biofilm formation / N. O. Vrynchanu, S. V. Hrynevych, M. L. Dronova [et al.] // *Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century* (APRIL 14–15, 2016, KYIV). – P. 100–101.
7. *Врынчану Н. О.* Антимікробні властивості нових похідних аміноадамантану та експериментальне обґрунтування доцільності їх медичного використання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук; спец. 14.03.05 «Фармакологія» / Врынчану Ніна Олексіївна; Інститут фармакології та токсикології НАМН України. – Київ, 2010. – 38 с.
8. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.1890-04 / Н. А. Семина, С. В. Сидоренко, С. П. Резван [и др.] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
9. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007 / МОЗ України; уклад.: Л. С. Некрасова, В. М. Свита, Т. Г. Глушкевич [та ін.]. – Київ, 2007. – 73 с.
10. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації / МОЗ України; уклад.: Ю. Л. Волянський, І. С. Гриценко, В. П. Широбоков [та ін.]. – Київ, 2004. – 38 с.
11. EUCAST. Antifungal susceptibility testing – EUCAST disk diffusion method and Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: version 6.1 / European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013. – Режим доступу: http://www.eucast.org/ast_of_fungi.
12. Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. A. Younger [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1985. – V. 22, № 6. – P. 996–1006.
13. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay / G. A. O'Toole // *J. Vis. Exp.* – 2011. – № 47. – pii: 2437.
14. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Ю. М. Романова, Т. А. Смирнова, А. Л. Андреев [и др.] // *Микробиология*. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 556–661.
15. *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.
16. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под общ. ред. В. П. Фисенко, Е. Б. Арзамасцева, Э. А. Бабаян, В. М. Булаева [и др.]. – Москва: ЗАО «ИИА Ремедиум», 2000. – 450 с.

**А. О. Шарова, Н. І. Гринчук, Д. М. Дудікова, В. В. Недашківська,
З. С. Суворова, Н. О. Врынчану**

Антибактеріальна активність 4-(1-адамантил)-(1-амінобутил)бензолу відносно біоплівок *S. aureus*

Утворення біоплівок бактеріями створює великі труднощі в медичній практиці, оскільки це значно підвищує стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних і дезінфікуючих засобів, збільшує витрати на лікування пацієнта, зростає летальність від інфекційних ускладнень. Тому перспективним є пошук сполук, здатних впливати на біоплівку, на різні етапи її формування.

Мета дослідження – встановити активність похідного адамантану АМ-166 відносно біоплівок *Staphylococcus aureus* 222 порівняно з антибактеріальними препаратами.

Чутливість клінічного штаму *S. aureus* до дії сполуки АМ-166 і препаратів порівняння ципрофлоксацину, азитроміцину, гентаміцину та рифампіцину визначали методом серійних мікророзведень і диско-дифузійним методом й оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) і зонами затримки росту мікроорганізмів. Здатність адамантанвмісної сполуки та препаратів порівняння порушувати плівкоутворення та впливати на сформовані золотистим стафілококом біоплівки досліджували методом сорбції генціанвіолету на її структурах з подальшою десорбцією в етиловий спирт.

Проведені дослідження виявили в похідного адамантану АМ-166 виразну антибіоплівкову активність і здатність впливати на різні етапи формування біоплівок. Встановлено, що в концентрації 5,0 МІК сполука впливає на динаміку плівкоутворення на ранніх етапах її формування, ступінь інгібування в межах 7,4–27,3 %. Сполука АМ-166 здатна порушувати плівкоутворення та руйнувати сформовані біоплівки. У разі дії на сформовану 1-добову біоплівку сполука практично не поступається активності ципрофлоксацину та рифампіцину й переважає дію азитроміцину та гентаміцину. Відносно 2-добових біоплівок сполука виявляє переваги перед ципрофлоксацином, азитроміцином і

гентамицином. Сполука АМ-166 запобігає утворенню біоплівки золотистого стафілокока на поліуретанових катетерах і виявляє переваги перед ципрофлоксацином і азитромицином.

Отже, адамантанвісна сполука АМ-166 може бути перспективною для створення на її основі лікарських засобів з антибіоплірковою активністю.

Ключові слова: похідне адамантану, антибактеріальна активність, *Staphylococcus aureus*, біоплівки

**А. А. Шарова, Н. И. Гринчук, Д. М. Дудикова, В. В. Недашківська,
З. С. Суворова, Н. А. Врынчану**

Антибактериальная активность 4-(1-адамантил)-(1-аминобутил) бензола относительно биопленок *S. aureus*

Образование биопленок бактериями создает большие трудности в медицинской практике, так как при этом значительно повышается устойчивость бактерий к антибактериальным и дезинфицирующим средствам, увеличиваются расходы на лечение пациента, возрастает летальность от инфекционных осложнений. Поэтому перспективным является поиск новых соединений, способных влиять на биопленку, на разные этапы ее формирования.

Цель исследования – установить влияние производного адамантана АМ-166 на биопленку *Staphylococcus aureus* 222 по сравнению с антибактериальными препаратами.

Чувствительность клинического штамма *S. aureus* к действию соединения АМ-166 и препаратов сравнения ципрофлоксацина, азитромицина, гентамицина, рифампицина определяли методом серийных микроразведений и диско-диффузионным методом, оценивали по показателям минимальной ингибирующей концентрации (МИК), а также зонам задержки роста микроорганизмов. Способность адамантансодержащего соединения и препаратов сравнения нарушать пленкообразование и влиять на сформированные биопленки исследовали методом сорбции генцианвиолета на ее структурах с дальнейшей десорбцией в этиловый спирт.

Проведенные исследования показали, что соединение АМ-166 проявляет выраженную антибиопленочную активность и способность влиять на разные этапы формирования биопленки. Установлено, что в концентрации 5,0 МИК соединение нарушает динамику пленкообразования на ранних этапах ее формирования, степень ингибирования в диапазоне 7,4–27,3 %. При действии на сформированную 1-суточную биопленку соединение практически не уступает по активности ципрофлоксацину и рифампицину, имеет преимущество над азитромицином и гентамицином. В отношении 2-суточных биопленок соединение более активно в сравнении с ципрофлоксацином, азитромицином и гентамицином. Установлено, что АМ-166 предотвращает образование биопленки золотистым стафилококком на полиуретановых катетерах и имеет преимущество по сравнению с ципрофлоксацином и азитромицином.

Таким образом, адамантансодержащее соединение АМ-166 может быть перспективным для разработки на его основе лекарственных препаратов антимикробного действия.

Ключевые слова: производное адамантана, антибактериальная активность, *Staphylococcus aureus*, биопленки

**А. О. Sharova, N. I. Hrynychuk, D. M. Dudikova, V. V. Nedashkivska,
Z. S. Suvorova, N. O. Vrynchanu**

Antibacterial activity of 4-(adamantyl)-(1-aminobutyl) benzole against *S. aureus* biofilms

Biofilm formation is considered as a serious medical problem due to its resistance to antibacterials and disinfectants, high treatment costs and the increase of the lethal complications rate. Therefore, there is a constant demand for the new compounds possessing a distinct activity against mature biofilm on the different stages of its formation.

The aim of the study was to investigate the effect of compound AM-166 on *S. aureus* biofilms in comparison to antibacterial drugs.

Strain susceptibility to tested compound AM-166 and antibacterials (ciprofloxacin, azithromycin, gentamicin, rifampicin) was performed using minimum inhibitory concentration (MIC) determination by broth microdilution method and areas of growth retardation by disk diffusion method. Antibiofilm activity was determined by the crystal violet assay.

Our studies have shown that compound AM-166 possessed a distinct antibiofilm activity on the different stages of biofilm formation. The compound at 5,0 × MIC concentration reduced biofilm formation at an early stage by 7,4–27,3 %. Treatment of *S. aureus* 24-h mature biofilm with compound resulted in superior or comparable antibiofilm action compared with referent antimicrobials. Against 48-h mature biofilms compound demonstrated more pronounced effect than ciprofloxacin, azithromycin and gentamicin. AM-166 prevented *S. aureus* biofilm formation on polyurethane catheters, compound' activity was superior to ciprofloxacin and azithromycin.

The data obtained suggest the promises of adamantane derivative AM-166 for the development of new antimicrobial drugs.

Key words: adamantane derivative, antibacterial activity, *S. aureus*, biofilms

Надійшла: 5 лютого 2018 р.

Контактна особа: Гринчук Наталія Ігорівна, інженер I категорії, відділ фармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 83 32. Електронна пошта: natali72grynchuk@gmail.com

Л. М. Шеремета, М. Б. Гайнюк, М. М. Багрій

Вплив пектину яблучного на гістоструктуру печінки щурів й активність процесів ПОЛ за умов хронічної алкогольної інтоксикації

Івано-Франківський національний медичний університет

Ключові слова: пектин яблучний, хронічна алкогольна інтоксикація, гістологічна структура печінки, процеси ПОЛ

Алкоголізм – медична та соціальна проблема, є інвалідизуючою патологією й викликає пошкодження не тільки центральної нервової системи, але й інших органів та систем організму. Лікування алкоголізму, як і інших залежностей, спрямоване не тільки на позбавлення пацієнта нестримного бажання вживати алкоголь, але й на відновлення та покращання функцій серцево-судинної системи, печінки та шлунково-кишкового тракту в цілому та ін. [1]. До клінічного протоколу лікування алкогольної хвороби печінки на різних етапах включено пребіотики, тобто речовини, які не розщеплюються у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту через відсутність у ньому специфічних ензимів [2]. Пектин є гетерополісахаридом, що складається з багатьох залишків галактуранової кислоти, має властивості пребіотика з $\text{pH} = 3,3\text{--}3,7$, у медичній практиці застосовується для зниження рівня холестерину та тригліцеридів, для лікування діабету та рефлюксної хвороби, детоксикації в разі отруєнь солями важких металів і для прискорення виведення радіонуклідів, а також входить до складу лікарських засобів як наповнювач. Побічні реакції на пектин за перорального застосування не відомі [3]. За АТС класифікацією пектин належить до групи A07BC – інші кишкові адсорбенти [4]. У багатьох країнах проводяться дослідження протиракових властивостей пектину, у тому числі й клінічні [5].

Мета дослідження – з'ясувати вплив яблучного пектину на активність про-

цесів ПОЛ і гістоструктуру печінки щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Матеріали та методи. Дослідження проведене на 35 білих рандомізованих щурах (самцях) масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Дослідним тваринам вводили етанол (40 %) у шлунок протягом 28 днів натщесерце зондом з оливою з розрахунку 2 мл/100 г маси тіла 1 раз на 1 добу за стандартною методикою [6]. Порошок яблучного пектину застосовували в кількості 0,2 г/100 г маси тіла через 30 хв після введення алкоголю, а референтні препарати – порошок вугілля активованого та порошок діоксиду кремнію («біле вугілля») по 0,25 та 0,05 г/100 г маси тіла відповідно, розрахунки ізоефективних доз проводили за стандартною формулою [7]. Тварини були поділені на дослідні групи: 1 – інтактні; 2–5 – алкоголізовані: 2 – без лікування; 3 – з введенням пектину; 4 – з введенням активованого вугілля; 5 – з введенням діоксиду кремнію. Виведення тварин з експерименту проводили під тіопенталовим наркозом у дозі 40 мг/кг [8] на 28 добу експерименту. Гістологічні дослідження проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа Leica DME (Німеччина) на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозиним, з осягненням перивазальних, перипортальних і проміжних відділів часточок. З метою об'єктивізації досліджень проводили комп'ютерну морфометрію об'єктів у гістологічних препаратах [9]. На першому етапі отримували цифрові копії оптичного зображення ділянок мікроскопічних препаратів за допомогою цифрової фотокамери Nikon Coolpix 4500 (Япо-

нія). У подальшому цифрові копії зображення аналізували за допомогою комп'ютерної програми Image Tool 3,0 for Windows (вільна ліцензія). Морфометричний аналіз печінки здійснювали з врахуванням наступних показників:

- 1) частка паренхіми у відсотковому співвідношенні;
- 2) кількість одноядерних нормальних клітин на 100 гепатоцитів;
- 3) кількість двоядерних нормальних клітин на 100 гепатоцитів;
- 4) кількість дистрофічно змінених клітин на 100 гепатоцитів;
- 5) кількість некротично-апоптично змінених клітин на 100 гепатоцитів;
- 6) середня площа гепатоциту;
- 7) частка синусоїдних капілярів у відсотковому співвідношенні;
- 8) частка сполучної тканини у відсотковому співвідношенні.

Півкількісну оцінку вмісту ліпідів і напівкількісну оцінку інтенсивності некротично-апоптичного процесу проводили за п'ятибальною системою, відповідно до якої: 1 бал – слабкі зміни, 2 бали – середні зміни, 3 бали – виразні зміни та 4 бали – дуже виражені зміни. Вивчали також наступні біохімічні показники: активність каталази (КТ) [10, 11], уміст дієнових кон'югатів (ДК) і чутливих до тіобарбітурової кислоти продуктів ПОЛ у сироватці крові [12, 13].

Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Exel та Statistica 5.5 (Multiple Regression) з використанням методів варіаційної статистики. Визначали середньоарифметичне значення (M), стандартну похибку (m), критерій Стюдента (t), коефіцієнт вірогідності (p). За вірогідні приймали значення $p < 0,05$.

Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської Конвенції щодо експериментів на тваринах.

Результати та їх обговорення. За хронічної інтоксикації етанолом на перший план виступають дистрофічні зміни печінкових клітин (рис. 1). Вони проявляються наявністю в цитоплазмі більшості гепатоцитів (74,40 клітини на 100 гепатоцитів) прозорих вакуолей різного розміру, здебільшого середньо-

го, зі злиттям останніх у більш крупні. Також відзначається найбільший ступінь накопичення вмісту ліпідів – 4,8 бала за півкількісною п'ятибальною шкалою.

Ліпідні включення візуалізуються в різних відділах класичних печінкових часточок: як у перипортальній зоні, так і проміжній і центральній. Контури гепатоцитів – нечіткі, межі клітин зливаються. Трабекулярна будова органу різко порушена через неправильні полігональні контури збільшених паренхіматозних клітин печінки. Частка паренхіми становить $(87,73 \pm 6,13) \%$. За даними морфометричного дослідження, середня площа гепатоцита становить $(423,74 \pm 28,63) \text{ мкм}^2$, середній периметр гепатоцита – $(73,18 \pm 5,44) \text{ мкм}$. Загалом кількість одноядерних нормальних клітин у даній дослідній групі є найменшою – 19,65 клітин на 100 гепатоцитів. За хронічної алкогольної інтоксикації, незважаючи на стрімке зростання кількості дистрофічно змінених гепатоцитів, кількість некротично-апоптично змінених клітин є порівняно невеликою – 2,13 клітини на 100 гепатоцитів. Некротично змінені клітини здебільшого з різко завуальованими, або відсутніми ядрами, з вакуолізованою та зернистою цитоплазмою, яка зазнає плазмореक्सису. Інтенсивність некротично-апоптичного процесу становить 0,8 бала за напівкількісною шкалою оцінки інтенсивності даного

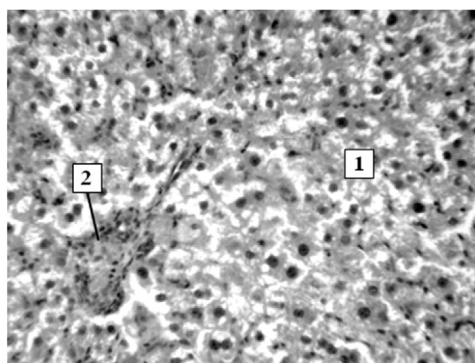


Рис. 1. Хронічна інтоксикація етанолом. Дисемінована різновакуольна жирова дистрофія гепатоцитів (1). Портальний тракт з незначно вираженим склерозом і макрофагально-лімфоцитарною інфільтрацією (2). Забарвлення: гематоксилін та еозин. Зб.: ок. 10, об. 40

процесу. Відзначається значне зниження кількості двоядерних печінкових клітин – 4,82 клітини на 100 гепатоцитів, що близько до кількості таких клітин за гострої інтоксикації етанолом.

Застосування пектину за хронічної інтоксикації етанолом супроводжується різко вираженим регресом жирової дистрофії гепатоцитів – з 4,8 до 0,9 бала у разі півкількісної оцінки вмісту ліпідів. Відзначається зональність дистрофічно змінених гепатоцитів – здебільшого по периферії часточок у ділянці триади (рис. 2).

Застосування пектину за хронічної інтоксикації етанолом супроводжується зниженням інтенсивності некротично-апоптичного процесу – 0,1 бала проти 0,8 бала без застосування пектину. Кількість некротично-апоптично змінених клітин відповідно також є низькою – 0,94 клітини на 100 гепатоцитів.

Поряд зі зменшенням зворотних і незворотних пошкоджень паренхіматозних елементів печінки різко зростає кількість репаративних двоядерних гепатоцитів – з 4,82 у разі хронічної інтоксикації до 13,25 на 100 гепатоцитів у разі застосування пектину, що свідчить про активацію репаративних процесів у печінці. У сполучній тканині портальних трактів, частка якої ($6,47 \pm 0,43$ %), зменшується кількість фібробластів, що свідчить про призупи-

нення прогресування склеротичних змін у портальному полі. Також зменшується набряк у портальному полі та візуалізуються лише поодинокі макрофаги та лімфоцити (рис. 3). Портальні судини – без ознак плазматичного просякання, просвіти здебільшого заповнені еритроцитами.

Аналіз гістологічних препаратів печінки алкоголізованих щурів показав посилення жирової дистрофії, порушення трабекулярної будови, збільшення інтенсивності некротично-апоптичного процесу та значне зниження кількості двоядерних печінкових клітин, що вказує на пригнічення регенеративних процесів. За умов застосування пектину відзначається регрес жирової дистрофії, у сполучній тканині портальних трактів зменшується набряк і кількість фібробластів, що свідчить про призупинення прогресування склеротичних змін у портальному полі. Різко зростає кількість репаративних двоядерних гепатоцитів – з 4,82 за хронічної інтоксикації до 13,25 на 100 гепатоцитів у разі застосування пектину, що підтверджує активацію репаративних процесів у печінці.

Результати визначення активності процесів ПОЛ у сироватці крові дослідних тварин корелювали з даними, отриманими за гістологічного та морфометричного аналізу (таблиця).

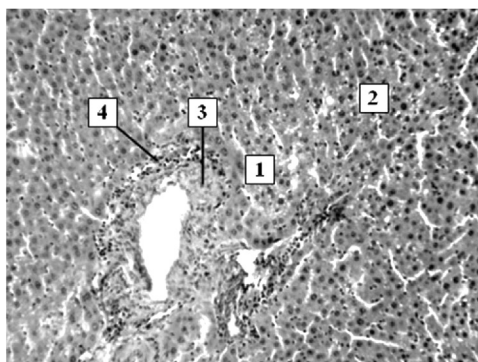


Рис. 2. Хронічна інтоксикація етанолом і застосування пектину. Зональна жирова дистрофія гепатоцитів у перипортальній зоні (1) і невелика кількість дистрофічно змінених гепатоцитів у проміжній зоні (2). Склероз у портальному полі (3) з поодинокими макрофагами та лімфоцитами (4). Забарвлення: гематоксилін та еозин. Зб.: ок. 10, об. 20

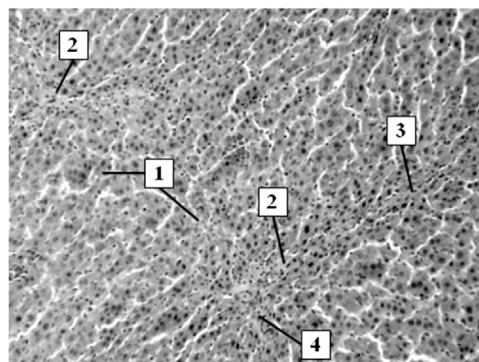


Рис. 3. Хронічна інтоксикація етанолом і застосування пектину. Синусоїдні гемокапіляри здебільшого заповнені кров'ю (1). Склероз портального тракту (2), перипортальний склероз (3). Поодинокі макрофаги та лімфоцити у портальному полі (4). Забарвлення: гематоксилін та еозин. Зб.: ок. 10, об. 20

**Показники біохімічного дослідження сироватки крові
дослідних тварин ($M \pm m$, $n = 5-7$)**

Дослідна група	Дієнові кон'югати, мкмоль/л	ТБК-АП, мкмоль/л	Активність ката- лази, мкмоль хв · мг білка
Інтактні	$2,97 \pm 0,09$	$4,43 \pm 0,09$	$2,54 \pm 0,12$
Алкоголь 40 %	$4,94 \pm 0,23^1$	$5,46 \pm 0,14^{1,3}$	$1,72 \pm 0,09^1$
Алкоголь + Пектин	$3,44 \pm 0,06^{1,2}$	$4,56 \pm 0,08^2$	$2,74 \pm 0,14^2$
Алкоголь + Активоване вугілля	$3,82 \pm 0,09^{1,2,3}$	$5,17 \pm 0,11^{1,2,3}$	$2,73 \pm 0,12^2$
Алкоголь + «Біле вугілля»	$3,83 \pm 0,16^{1,2,3}$	$4,96 \pm 0,09^{1,2,3}$	$2,86 \pm 0,08^2$

Примітка. ¹ $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами, ² $p < 0,05$ порівняно з нелікованими тваринами, ³ $p < 0,05$ порівняно з тваринами, лікованими пектином.

Збільшення рівня продуктів ПОЛ – ДК та ТБК-АП – спостерігали в усіх групах тварин, котрим вводили алкоголь, але, водночас, у групах, що отримували пектин і референтні препарати ці показники були вірогідно нижчими, ніж у нелікованих щурів. Крім того, застосування яблучного пектину сприяло достовірному пригніченню ліпопероксидації та зменшенню вмісту її продуктів у сироватці крові порівняно з іншими групами лікованих тварин. Активність ферменту антиоксидантного захисту каталази була виразно пригнічена тільки в нелікованих тварин ($p < 0,05$, таблиця).

Таким чином, яблучний пектин за введення в шлунок через 30 хв після етанолу спричиняє позитивний вплив і пригнічує розвиток хронічної алкогольної інтоксикації в експериментальних тварин. Планується подальше дослідження механізму дії й ефективності за умов гострої інтоксикації алкоголем.

Висновки

1. Хронічна алкогольна інтоксикація призводить до розвитку жирової дистрофії гепатоцитів, порушення трабекулярної будови печінки, суттєвого зменшення кількості одноядерних

нормальних клітин і значного зниження кількості двоядерних печінкових клітин (4,82 клітини на 100 гепатоцитів).

2. Застосування пектину за хронічної інтоксикації етанолом супроводжується різко вираженим регресом жирової дистрофії гепатоцитів (з 4,8 бала у алкоголізованих до 0,9 бала у лікованих пектином) за півкількісної оцінки вмісту ліпідів. Відмічено зниження інтенсивності некротично-апоптичних процесів (0,1 бала проти 0,8 бала в нелікованих тварин), зростає кількість репаративних двоядерних гепатоцитів – з 4,82 без лікування до 13,25 на 100 гепатоцитів у разі застосування пектину, що свідчить про активацію репаративних процесів у печінці. Зменшення кількості фібробластів свідчить про призупинення прогресування склеротичних змін у портальному полі.

3. Застосування яблучного пектину достовірно сприяло виразному пригніченню ліпопероксидації та зменшенню вмісту ДК і ТБК-АП у сироватці крові порівняно з іншими групами лікованих тварин ($p < 0,05$). Активність ферменту антиоксидантного захисту каталази була виразно пригнічена тільки в нелікованих тварин ($p < 0,05$).

1. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги хворим на алкогольний гепатит [Електронний ресурс] // 2014 <http://ukrgastro.com.ua/wp-content/uploads/2015/11/alko-gepatit-abp.pdf>.
2. Клінічний протокол надання медичної допомоги хворим на алкогольну хворобу печінки [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://medstandart.net/browse/1891>.
3. Drugs.com // <https://www.drugs.com/npp/pectin.html>
4. АТС – класифікатор – Державний формуляр лікарських засобів [Електронний ресурс] / Режим доступу: preparaty.org/atc.

5. Leclerc L. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin [Електронний ресурс] / Leclerc L., Van Cutsem P., Michiels C. // Front. Pharmacol., 08 October 2013 / Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115933>.
6. Халилов М. Х. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации / М. Х. Халилов, Ш. Я. Закирхорджаев // Вопросы клиники алкоголизма: науч. тр. Ташкент. – 1983. – С. 38–41.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ: ВД «Авіцена», 2001. – 527 с.
8. bioethics.imbp.ru // <http://www.bioethics.imbp.ru/info/methods>.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
10. Вплив L-аргініну та L-паме на морфологію еритроцитів периферійної крові щурів за умов алкогольної інтоксикації / Н. В. Єфіменко, К. П. Дудок, Н. І. Климишин, Н. О. Сибірна. [Електронний ресурс. – Режим доступу: <http://kaos.bsmu.edu.ua/article/viewFile/98159/93454>.
11. Каталаза в биологических средах организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценках эндотоксикоза [Електронний ресурс] / Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов, Н. Б. Ганяева и др. – Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/v/katalaza-biologicheskikh-sred-organizma-cheloveka-i-ee-kliniko-biokhimicheskoe-znachenie-v-otsenke-endotoksikoza>.
12. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
13. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии; ред. В. Н. Орехович. – Москва: Медицина, 1977. – С. 57–59.
14. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – № 1. – С. 127–131.

Л. М. Шеремета, М. Б. Гайнюк, М. М. Багрій

Вплив пектину яблучного на гістоструктуру печінки щурів й активність процесів ПОЛ за умов хронічної алкогольної інтоксикації

Мета дослідження – з'ясувати вплив яблучного пектину на активність процесів ПОЛ і гістоструктуру печінки щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

В експериментах відтворено модель хронічної алкогольної інтоксикації за введення 40 % етанолу в шлунок у дозі 2 мл/100 г маси тіла один раз на 1 добу протягом 28 діб. Яблучний пектин і референтні препарати – активоване вугілля та діоксид кремнію – вводили в шлунок через 30 хв після етанолу. Проводили гістоструктурний і морфометричний аналіз тканини печінки, визначення рівня дієнових кон'югатів (ДК) і ТБК-АП, активності каталази в сироватці крові.

Отримані результати показали, що яблучний пектин зменшував інтенсивність некротично-апоптичних процесів, пригнічував прогресування склеротичних змін у портальному полі та сприяв вираженому регресу жирової дистрофії гепатоцитів. Водночас відзначали активацію репаративних процесів у гепатоцитах. Вивчення впливу яблучного пектину на активність процесів ПОЛ показало виразне пригнічення ліпопероксидації – зменшення вмісту ДК і ТБК-АП у сироватці крові порівняно з іншими групами лікованих тварин ($p < 0,05$) та відновлення активності ферменту антиоксидантно-го захисту – каталази.

Результати дослідження вказують на здатність яблучного пектину зменшувати прояви хронічної алкогольної інтоксикації шляхом регресу дистрофічних і пригнічення некротичних і склеротичних процесів з одночасним відновленням репаративних змін у клітинах печінки. Перелічені ефекти ймовірно, пов'язані як з його сорбційними властивостями, так і частковою нейтралізацією етанолу.

Ключові слова: пектин яблучний, хронічна алкогольна інтоксикація, гістологічна структура печінки, процеси ПОЛ

Л. М. Шеремета, М. Б. Гайнюк, М. М. Багрій

Влияние яблочного пектина на гистоструктуру печени крыс и активность процессов ПОЛ в условиях хронической алкогольной интоксикации

Цель исследования – выяснить влияние яблочного пектина на активность процессов ПОЛ и гистоструктуру печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией.

В экспериментах воспроизведена модель хронической алкогольной интоксикации при введении 40 % этанола в желудок в дозе 2 мл/100 г массы тела 1 раз в 1 сутки в течение 28 суток. Яблочный пектин и референтные препараты – активированный уголь и диоксид кремния – вводили в желудок через 30 мин после этанола. Проводили гистоструктурный и морфометрический анализ ткани печени, определение уровня диеновых конъюгатов (ДК) и ТБК-АП, активности каталазы в сыворотке крови.

Полученные результаты показали, что яблочный пектин уменьшал интенсивность некротически-апоптических процессов, подавлял прогрессирование склеротических изменений в портальном

поле и способствовал выраженному регрессу жировой дистрофии гепатоцитов. В то же время отмечали активацию репаративных процессов в гепатоцитах. Изучение влияния яблочного пектина на активность процессов ПОЛ показало отчетливое угнетение липопероксидации – уменьшение содержания ДК и ТБК-АП в сыворотке крови по сравнению с другими группами леченных животных ($p < 0,05$) и восстановление активности фермента антиоксидантной защиты – каталазы.

Результаты исследования указывают на способность яблочного пектина уменьшать проявления хронической алкогольной интоксикации путем регресса дистрофических и угнетения некротических и склеротических процессов с одновременным восстановлением репаративных процессов в клетках печени. Перечисленные эффекты, вероятно, связаны как с его сорбционными свойствами, так и частичной нейтрализацией этанола.

Ключевые слова: пектин яблочный, хроническая алкогольная интоксикация, гистологическая структура печени, процессы ПОЛ

L. M. Sheremeta, M. B. Haynyuk, M. M. Bagriy

The influence of apple pectin on the rat's liver histological structure and activity of the lipid peroxidation in experimental chronic alcohol intoxication

The aim of study was to determine the effect of apple pectin on the activity of the lipid peroxidation (LP) and histological structure of the liver in rats with chronic alcohol intoxication.

Chronic alcohol intoxication was performed by introduction of 40 % ethanol in the stomach at a dose of 2 ml/100 g body weight once a day during 28 days on rats. Apple pectin and reference sorbents – activated charcoal and silicon dioxide – were administrated into the stomach in 30 min. after ethanol. Histological structure and morphometric analysis of liver tissue, determination of the level of diene conjugates (DC) and TBA-AP, and catalase activity in serum were investigated.

The results obtained showed that apple pectin reduced the intensity of necrotic-apoptotic processes, suppressed the progression of sclerotic changes in the portal field, and contributed to a pronounced regression of fatty degeneration of hepatocytes. At the same time, the activation of reparative processes in hepatocytes was noted. The study of the influence of apple pectin on the activity of the LP processes showed a marked suppression of lipoperoxidation – a decrease in the content of DC and TBA-AP in serum compared with other groups of treated animals ($p < 0,05$) and restoration of catalase activity.

The results of our study indicate the ability of apple pectin to reduce manifestations of chronic alcohol intoxication by regressing dystrophic and inhibition of necrotic and sclerotic processes, while simultaneously restoring reparative changes in liver cells. These effects are probably related both to its sorption properties and to the partial neutralization of ethanol.

Key words: apple pectin, chronic alcoholic intoxication, liver histological structure, lipid peroxidation (LP)

Надійшла: 23 лютого 2018 р.

Контактна особа: Шеремета Л. М., Івано-Франківський національний медичний університет, буд. 2, вул. Галицька, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: + 38 0 342 53 32 95.

С. М. Дроговоз, Е. В. Матвеева, Ю. О. Лукиянчук, П. В. Ракеев

Факторы, способствующие побочным эффектам *off label* препаратов

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: лекарственные средства *off label*, безопасность, регуляторные органы, риски

В большинстве стран мира, где оборот лекарственных средств (ЛС) урегулирован на законодательном уровне, лекарства должны получить разрешение регуляторных органов (FDA, ГЭЦ), чтобы врачи и пациенты могли их использовать. Разрешение на маркирование или на регистрационное свидетельство в Украине и странах постсоветского пространства предоставляется, если по результатам оценки регистрационного досье препарат является качественным, безопасным и эффективным для зарегистрированных показаний в соответствии с рекомендованным режимом его назначения (это *on label* препарат). Следовательно, перед тем, как ЛС появляется на фармацевтическом рынке, благоприятный баланс между его пользой и вредным действием должен быть доказан. Целью лицензирования ЛС является обеспечение их безопасности и эффективности после того, как доказано, что польза от их применения преобладает над риском. При этом инструкция к препарату является руководством для врачей, других медицинских и фармацевтических работников и больных о том, как использовать препарат [1, 2].

По данным ВОЗ половина всех лекарственных средств назначается по показаниям, которых нет в инструкции, и такое использование ЛС называется *off label*. Стиль терапии *off label use* (англ. от *off* – за пределами, *label* – инструкция, этикетка, *use* – применение) означает, что применение препарата для лечения какого-либо заболевания/состояния не было официально одобрено регуляторным органом, не было

клинических испытаний его безопасности и эффективности для этого показателя [3].

Однако в любом случае понятие *off label use* не включает варианты злоупотребления ЛС, использования их без медицинских показаний, преднамеренного увеличения дозировки или использование ЛС с пренебрежением к рекомендациям по их безопасности.

В большинстве случаев применение лекарства по показаниям, отсутствующим в инструкции, запрещено. Однако в реальной медицинской практике назначение препаратов *off label* очень распространено во всех областях медицины, а для некоторых препаратов это является обычной практикой, особенно в педиатрии, психиатрии и онкологии. В 1991 году в США было проведено исследование, результаты которого продемонстрировали, что одну треть всех лекарств у больных раком назначали *off label*. В 1997 году 200 онкологов подтвердили, что 60 % антибластных лекарств используются *off label* [12].

До тех пор, пока *off label* лекарства эффективны, безопасны, хорошо переносятся и относительно недороги, их использование не вызывает беспокойства. Однако, несмотря на ряд преимуществ использования *off label* препаратов, одной из потенциальных озабоченностей для врачей является то, что *off label* лекарства не всегда имеют убедительное научное обоснование, что может иногда представлять риски при приеме таких ЛС для больного и врача.

В связи с этим в системе здравоохранения применение *off label* препаратов вызывает серьезную озабоченность по поводу их безопасности, особенно, когда препарат широко используется несмотря на то, что регуляторные орга-

ны не определили для него соотношение польза–риск. Потенциальный риск является значительным, когда для *off label* препаратов не хватает достаточной доказательной базы их безопасности. Анализ 150 миллионов рецептурных *off label* препаратов в США показал, что 73 % из них практически не имели научной поддержки. Как свидетельствует статистика во многих странах до 70 % *off label* препаратов тоже не имеют научных обоснований как показаний, так и побочных действий и противопоказаний [5]. Поэтому, учитывая риск ответственности за назначение лекарства по неутвержденным показаниям, врачи должны прибегать к этому лишь в том случае, если полностью убеждены, что потенциальная польза от применения препарата *off label* превышает его риски.

Несмотря на вышеизложенное, стиль *off label* терапии совершенно приемлем, чтобы с его помощью лечить больных с учетом их возможностей и безопасности. Однако это не приемлемо, когда:

- врач не знает о последствиях, влияющих на здоровье пациента;
- отсутствует доверие между пациентом и врачом в вопросах информированного согласия больного;
- под угрозой находится безопасность пациента (с его согласия или врача).

В фармакологии придерживаются аксиомы, если ЛС используется в разных направлениях фармакотерапии, то следует ожидать более высокий риск его токсичности. Особенно большой риск побочного действия лекарств связан с назначением *off label* у детей при отсутствии или ограничении доказательств, касающихся побочных действий и противопоказаний для специфических и редких заболеваний [4].

Многие факторы *off label* фармакотерапии могут быть разными по сравнению с утвержденной инструкцией ЛС: возраст пациента, диапазон доз, различия в фармакокинетике и фармакодинамике лекарств. Все эти отличия могут влиять на эффективность и безопасность *off label* лекарства. Существует реальная вероятность, что при использовании неадекватной дозы *off label* лекарства и продолжительности

лечения может возникнуть лекарственная резистентность или опасность взаимодействия между препаратами.

По результатам анализа, серьезные последствия при применении *off label* лекарств возникают в 68,2 % случаев, в том числе с летальным исходом – 9,8 % случаев (10,4 % из них – у детей от 0 до 9 лет): из-за неадекватных доз (40,9 %), нерационального выбора препарата (16,0 %) и неправильного пути их введения (9,5 %) [6].

Исследования английских ученых показали, что побочные реакции лекарств у госпитализированных детей чаще ассоциируются с *off label* препаратами, чем с лицензированными (6 % против 3,9 %) [8].

Неонатологи часто назначают препараты способами, которые не одобрены регуляторными органами: 80 % детей в отделениях интенсивной терапии новорожденных в Австралии получали препараты, официально не прошедшие процедуру регистрации для данной категории пациентов. Многие лекарства имеют одинаковый эффект и похожий профиль безопасности у взрослых и детей, однако не для всех ЛС это характерно. Типичными примерами являются тетрациклины, вызывающие пятнистость зубов у детей, или селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), приводящие к суицидальным мыслям у подростков.

В отделениях интенсивной терапии в Бразилии проведен анализ неонатального *off label* использования и побочного потенциала препаратов. Установлено, что *off label* препараты имеют широкий спектр применения, без каких-либо данных об их безопасности и эффективности. Наиболее часто используемые *off label* препараты были назначены новорожденным [7].

В 2007 году ВОЗ приняла документ «Лучшие *off label* лекарства для детей», в соответствии с которым в педиатрии необходимо улучшение мониторинга ЛС, чтобы обеспечить безопасность и эффективность лекарства для различных возрастных групп детей. Сегодня ситуацию с *off label* препаратами можно улучшить сообщениями о

педиатрическом опыте их использования в журнальных статьях, на различных конференциях. Каждый маленький пациент уникален, поэтому польза и риск при использовании *off label* препаратов должны быть оценены высоким качеством доказательств. Только такие, целенаправленные и скоординированные действия врача смогут обеспечить право детей на безопасное и эффективное лечение [11].

Родители должны быть очень бдительными, если их детям назначают *off label* препараты при психических заболеваниях (депрессия или гиперреактивность). Исследования показали, что они имеют опасные побочные эффекты у детей и подростков, в отличие от взрослых, особенно при назначении нейролептиков, противовоспалительных и других «популярных» лекарств [8, 12].

Следовательно, существует необходимость строгого регулирования назначения *off label* ЛС у детей в целях обеспечения безопасности и эффективности. Понимание различных факторов риска и спектра побочного действия *off label* лекарств может помочь в разработке рациональных стратегий назначения таких препаратов.

Одним из опасных примеров применения *off label* лекарств является лоразепам в инъекционной форме, который во многих справочниках для неонатального ухода рекомендуют в качестве выбора противосудорожного препарата после того, как фенobarбитал и фентонил не были эффективными. В соответствии с инструкциями, лоразепам противопоказан новорожденным в возрасте менее 4 недель из-за того, что содержит бензиловый спирт в форме инъекций, который может вызвать дыхательный дистресс у недоношенных детей. Исходя из инструкции, лоразепам является плохо растворимым в воде, поэтому каждый 1 мл стерильного раствора содержит 2 % бензинового спирта в качестве консерванта, последний может являться причиной дистресса.

Наличие консервантов представляет проблемы для новорожденных в Нидерландах: около половины жидких *off label* препаратов для применения *per os*

и 7 % парантеральных препаратов содержат потенциально вредные консерванты [6, 9].

Одно из самых трагических последствий назначения *off label* препаратов было в 1960-е годы, когда врачи начали назначать седативное средство талидомид беременным женщинам для облегчения утренней тошноты. Вскоре было обнаружено, что препарат вызывает серьезные врожденные дефекты.

FDA одобрило препараты фентермина гидрохлорид и фенфлурамина гидрохлорид отдельно, но врачи рекомендовали пациентам использовать их *off label* вместе для быстрого снижения веса тела. Многие пациенты действительно похудели, но некоторые из них имели серьезные проблемы с клапанами сердца. В 1997 году FDA запретила фенфлурамин и фентермин, которые применялись в комбинации Fen-Phen вне утвержденных показаний для уменьшения массы тела [10].

В конце 2011 года во Франции разразился скандал, связанный с препаратом «медиатор», который изначально разрабатывался для больных сахарным диабетом и имеющих избыточную массу тела, а впоследствии широко стал применяться для подавления чувства голода желающими быстро похудеть. Как выяснилось, в состав препарата входили вещества, которые вызывают нарушения сердечно-сосудистой системы, вплоть до летального исхода [7].

Телитромицин (Ketek) был одобрен FDA в 2004–2008 годах для лечения острого бактериального, хронического бронхита, бактериального синусита и внебольничной пневмонии. Из-за уникального механизма и спектра действия телитромицин рассматривался как потенциально ценный для терапии инфекций верхних дыхательных путей и других заболеваний. Однако проблема безопасности привела к более очевидному отрицательному соотношению риска и пользы телитромицина. Использование телитромицина сократилось существенно после получения сообщения о серьезных его побочных эффектах (гепатотоксичности) [3].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что в системе здравоохранения назначение *off label* препаратов вызывает серьезную озабоченность из-за их безопасности, особенно когда ЛС широко используется независимо от того, что регуляторные органы не определили для него соотношение польза–риск. При решении о назначении любых лекарств и, особенно, *off label* всегда должны быть взвешены потенциальная польза и воз-

можность вреда. Необходимо помнить, что назначение лекарства является одним из самых рискованных действий, которые осуществляет врач в интересах пациента. Существуют две ключевые концепции безопасности лекарств: первая – минимизация потенциального вреда. Другая концепция – это мнение сторонника доказательной медицины: «Хорош врач тот, кто знает, когда нужно назначать ЛС, но более важно знать, когда и нельзя».

1. Increasing Off-Label Use Of Antipsychotic Medications In The United States, 1995-2008 / G. C. Alexander et al. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2011. V. 20 (2). P. 177–84.
2. Kimland E., Odland V. Off-label drug use in paediatric patients. *Nature.* 2012. V. 91 (5). P. 796–801.
3. Drug labelling and exposure in neonates / M. M. Laughon et al. *JAMA Pediatr.* 2014. V. 168 (2). P. 130–136.
4. Leveque D. Off label use of anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2008. V. 9 (11). P. 1102–1107.
5. Mason J., Pirmohamed M., Nunn T. Off-label and unlicensed medicine use and adverse drug reactions in children: a narrative review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012. V. 68 (1). P. 21–28.
6. Mukattash T., Hawwa A. F., Trew K., McElroy J. C. Healthcare professional experiences and attitudes on unlicensed/off-label paediatric prescribing and paediatric clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011. V. 67. P. 449–461.
7. Palcevski G., Skocibusic N., Palcevski V. Unlicensed and off-label drug use in hospitalized children in Croatia: A cross-sectional survey. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012. P. 122–125.
8. Бунятян Н. Д., Кротов Н. В., Утешев Д. Б., Яворский А. Н. Некоторые аспекты назначения и продвижения лекарственных препаратов «вне инструкции». Политика и Управление в Здравоохранении. 2010. № 2. С. 49–53.
9. Кутехова В., Лепехин В. К., Романов Б. К. Выявление назначения лекарственных средств с нарушениями предписаний инструкции (*off label*) в педиатрической практике. 2012. № 23 (66).
10. Грацианская А. Н., Бологов А. А., Костылева М. Н., Постников С. С. Применение лекарственных средств *off label* в педиатрической практике. Опыт многопрофильного педиатрического стационара. Заместитель Главного Врача. 2012. № 8. С. 46–52.
11. Корман Д. Б. Перепрофилирование лекарств для онкологии. Практическая онкология. 2017. № 18 (1). С. 139–158.
12. Титова А. Р., Асеева И. Л., Зырянов С. К., Поливанов В. А. Нерегламентированное (*off label*) применение лекарственных препаратов в педиатрической практике: нерешенные проблемы. Педиатрическая Фармакология. 2015. № 12 (3). С. 304–308.

С. М. Дроговоз, Е. В. Матвеева, Ю. О. Лукиничук, П. В. Ракеев **Факторы, способствующие побочным эффектам *off label* препаратов**

По данным ВОЗ половина всех лекарственных средств назначается по показаниям, которых нет в инструкции, и такое использование ЛС называется *off label*. Стиль терапии *off label use* (анг. от *off* – за пределами, *label* – инструкция, этикетка, *use* – применение) означает, что применение препарата для лечения какого-либо заболевания/состояния не было официально одобрено регуляторным органом, не было клинических испытаний его безопасности и эффективности для этого показания.

До тех пор, пока *off label* лекарства эффективны, безопасны, хорошо переносятся и относительно недороги, их использование не вызывает беспокойства.

Тем не менее, анализ данных литературы свидетельствует о том, что использование препаратов *off label* вызывает серьезную озабоченность органов здравоохранения из-за их безопасности, особенно в тех случаях, когда препараты имеют широкое применение, несмотря на то, что регуляторные органы не определили для них соотношение польза–риск.

Существует реальная вероятность того, что серьезный вред может возникнуть в результате использования неадекватной дозы *off label* лекарства, продолжительности лечения, которые могут привести к лекарственной резистентности и другим негативным последствиям.

Для принятия решения о назначении любых лекарств, особенно *off label*, всегда должны быть взвешены потенциальная польза и возможность вреда.

Ключевые слова: лекарственные средства *off label*, безопасность, регуляторные органы, риски

С. М. Дроговоз, О. В. Матвєєва, Ю. О. Лукіянчук, П. В. Ракєєв
Фактори, що сприяють побічним ефектам *off label* препаратів

За даними ВООЗ половина всіх лікарських засобів призначається за показаннями, яких немає в інструкції, й таке використання лікарських засобів називається *off label*. Стиль терапії *off label use* (анг. від *off* – за межами, *label* – інструкція, етикетка, *use* – застосування) означає, що застосування препарату для лікування якогось захворювання/стану не було офіційно схвалено регуляторним органом, не було клінічних випробувань його безпеки й ефективності за цим показанням.

До тих пір, поки *off label* ліки ефективні, безпечні, добре переносяться та відносно недорогі, їхнє використання не викликає занепокоєння.

Тим не менш, аналіз даних літератури свідчить про те, що застосування *off label* препаратів викликає серйозну пересторогу органів охорони здоров'я з приводу їхньої безпеки, особливо в тих випадках, коли препарат широко використовується, незважаючи на те, що регуляторні органи не визначили для нього співвідношення користь–ризик.

Існує реальна ймовірність того, що серйозна загроза може виникати в результаті використання неадекватної дози *off label* ліків, тривалості лікування тощо, які можуть призвести до лікарської резистентності й інших негативних наслідків.

Для прийняття рішення про призначення будь-яких ліків, особливо *off label*, завжди мають бути зважені потенційна користь і можливість шкоди.

Ключові слова: лікарські засоби off label, безпека, регуляторні органи, ризики

S. M. Drogozov, E. V. Matveeva, J. O. Lukianchuk, P. V. Rakeev
Factors which promote adverse effects *off label* drugs

According to WHO, half of all drugs are prescribing for indications that are not in the instruction on application, and such use of drugs is called *off label*. The style of therapy *off label* means that the use of the drug for the treatment of a disease/condition has not been formally approved by the regulatory authorities, there have been no clinical trials of its safety and effectiveness for this indication.

Until *off label* drugs are effective, safe, well tolerated and relatively inexpensive, their use is not a concern.

At the same time, the use of *off label* drugs raises serious concerns in the healthcare system as to their safety, especially when the drug is widely used despite the fact that regulatory authorities have not determined its benefit-risk relationship.

There is a real probability that serious harm can result from the use of an inadequate dose *off label* medications, the duration of treatment etc. that can lead to drug resistance and other negative consequences.

Decisions about the appointment of any medication, especially *off label*, should always be accepted after evaluation of the potential benefits and the possibility of harm.

Key words: off label drugs, safety, regulatory authorities, risks

Надійшла: 7 березня 2018 р.

Контактна особа: Дроговоз Світлана Мефодіївна, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків. 61002. Електронна пошта: drogovozsm@gmail.com

В. М. Брицун, Н. В. Останіна

Особливості кондуктометричного контролю якості дистильованої води для фармакопейних потреб

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

*Ключові слова: вода очищена, вода
дистильована, дистиляція,
аквадистилятор, питома
електропровідність, контроль якості води*

Вода очищена, вода високоочищена і вода для ін'єкцій використовуються як розчинники для приготування та аналізу лікарських засобів і повинні відповідати фармакопейним вимогам чистоти [1, 2]. Контроль якості води кондуктометричним методом є оперативним і точним підходом для первинного встановлення її придатності, тому що він дозволяє оцінити кількість існуючих у воді іонів. Саме тому в фармакопеях [1, 2], настановах і статтях [3–7] визначення питомої електропровідності (ПЕ) води є одним з перших пунктів її випробувань. Так, для води очищеної, яка може бути отримана з води питної дистиляцією, зворотним осмосом, деіонізацією та іншими методами, ДФУ встановлено граничне значення ПЕ 5,1 мкСм/см за 25 °С [1].

Проте процес отримання води очищеної дистиляцією зазвичай є циклічним (запуск обладнання, вихід на режим, багатогодинна робота та вимкнення). Очевидно, що на різних стадіях функціонування дистилятора електропровідність отриманої води може суттєво відрізнятися. До того ж ПЕ води не є постійною величиною, змінюється у разі контактів з атмосферним повітрям [6–8], дії слабких магнітних та електромагнітних полів і низькочастотних механічних коливань [8–10], розмноження мікроорганізмів [11, 12].

У науковій літературі, посібниках і фармакопеях не вказана частота перевірки якості води очищеної на працюючому обладнанні, тобто вирішення цього питання покладено на обслуговуючий персонал.

У Державній науково-дослідній лабораторії з контролю якості лікарських засобів ІГЗ НАМН України здійснюється перевірка медичних препаратів, субстанцій, лікарської сировини й предметів гігієни щодо відповідності вимогам нормативної документації та фармакопей (ДФУ, ЕР, ВР і USP). Ці процедури потребують значної кількості води очищеної, первинний контроль якої здійснюється кондуктометричним методом.

Мета дослідження – моніторинг ПЕ та визначення заходів для покращання якості дистильованої води, що використовується для фармакопейних потреб у лабораторіях, аптеках, на виробництвах тощо.

Матеріали та методи. Дистильовану воду отримували на аквадистиляторах GFL-2008 і ДЕ-10 з продуктивністю відповідно 8 і 10 л/год. Проби відбирали в ємкості з поліетилену високого тиску з кришкою. Вимірювання ПЕ дистильованої води проводили на кондуктометрі Hanna HI 2300 за температури $(25,0 \pm 0,5)$ °С і вимірювали в мікросименсах/сантиметр (мкСм/см). Калібрування кондуктометра здійснювали з використанням розчину «Conductivity Standart 84 mKSm/sm» (Mettler Toledo). Вимірювання в кожному випадку робили тричі й обчислювали середнє значення.

ПЕ вхідної водопровідної води: 362–384 мкСм/см $(25,0 \pm 0,5)$ °С.

Невизначеність вимірювань ПЕ отриманої дистильованої води дорівнювала $\pm 0,13$ мкСм/см (обчислювалась згідно з вимогами ДФУ [13]).

Температуру дистильованої води контролювали термометром TFA 30.1018 і підтримували на циркуляційному термостаті LOIP LT-112. Вимірювання ПЕ дистильованої води виконували одразу після її отримання (табл. 1, 2) або після

Таблиця 1

**Питома електропровідність дистильованої води,
отриманої з дистильатора GFL-2008**

Час роботи, год	Питома електропровідність, мкСм/см (25 °С)		
	Свіжоочищений від накипу	20 год роботи	37 год роботи
0,33	1,98	2,32	3,22
0,5	2,19	2,42	3,32
1,0	2,46	2,85	4,03
1,5	2,57	3,16	4,31
2,0	2,65	3,24	4,43
2,5	2,76	3,37	4,62
3,0	2,89	3,39	4,73
4,0	2,97	3,57	4,81
Різниця питомої електропровідності (ПЕ ₄ –ПЕ _{0,33})	0,99	1,25	1,59

Таблиця 2

**Питома електропровідність дистильованої води,
отриманої з дистильатора ДЕ-10**

Час роботи, год	Питома електропровідність, мкСм/см (25 °С)		
	18 год роботи	85 год роботи	150 год роботи
0,33	4,91	6,37	7,54
0,5	3,60	5,21	5,08
1,0	2,67	3,10	4,03
1,5	2,49	2,82	3,91
2,0	2,55	2,89	4,08
2,5	2,51	2,82	4,16
3,0	2,46	2,89	4,13
4,0	2,55	2,93	4,24
5,0	2,53	2,90	4,21
6,0	2,56	2,95	4,25
Різниця питомої електропровідності (ПЕ ₆ –ПЕ _{1,5})	0,07	0,13	0,34

збереження в ємкостях з поліетилену високого тиску з кришкою (табл. 3).

Результати та їх обговорення. Для покращання контролю якості було проведено погодинний моніторинг ПЕ води очищеної (води дистильованої), яку отримували дистиляцією води питної на аквадистильаторах GFL-2008 і ДЕ-10.

З таблиць 1, 2 і рис. 1 видно, що якість дистильованої води залежить від таких чинників: час роботи аквадистильатора в одному циклі (цикл – увімкнення, нагрівання, кипіння/перегонка, вимкнення), стан чистоти

контактних з киплячою водою поверхонь і конструкція аквадистильатора. На рисунку 1 нижні криві – дані ПЕ дистильованої води, отриманої з свіжоочищених перегонних кубів, верхні криві – дані ПЕ дистильованої води, отриманої з перегонних кубів, забруднених осадами за період експлуатації. Забруднення – (карбонати кальцію, магнію та інші домішки, що утворюються за дистиляції водопровідної води) наслідок роботи аквадистильатора GFL-2008 по 1,5–2,0 год/день (сумарно до 37 год) та аквадисти-

Питома електропровідність дистильованої води, отриманої з дистильаторів GFL-2008 і ДЕ-10, за умов зберігання протягом 8 годин

Час зберігання, год	Питома електропровідність, мкСм/см (при 25 °С)					
	GFL-2008			ДЕ-10		
	1	2	3	4	5	6
0	2,41	2,56	3,04	2,99	3,27	4,20
1	2,32	2,51	2,95	2,91	3,11	3,84
2	2,26	2,42	2,81	2,82	2,93	3,66
3	2,14	2,39	2,75	2,78	2,79	3,34
4	2,12	2,35	2,72	2,73	2,62	3,24
5	2,07	2,32	2,7	2,72	2,56	3,01
6	2,04	2,25	2,62	2,67	2,49	2,84
7	2,03	2,21	2,58	2,65	2,43	2,57
8	2,02	2,19	2,55	2,58	2,39	2,48
Різниця питомої електропровідності (ПЕ ₀ –ПЕ ₈)	0,39	0,37	0,49	0,59	0,88	1,72

лятора ДЕ-10 по 3,0–4,0 год/день (сумарно до 150 год).

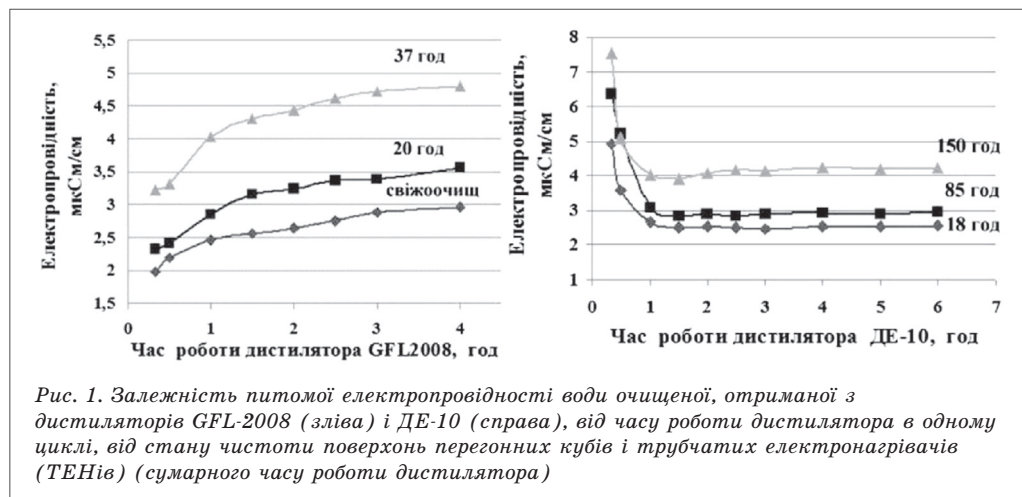
Графіки ПЕ води з аквадистильаторів GFL-2008 і ДЕ-10 (рис. 1) мають несхожі форми, тому що обладнання має різні конструкції та принципи роботи: у першому випадку вихідна водопровідна вода автоматично додається у відгонний куб по мірі випаровування, а після закінчення роботи залишається в кубі. У другому випадку – після закінчення роботи вода повністю зливається з кубу, а перед наступним циклом – заново набирається з водопроводу.

Таблиці 1, 2 і рисунок 1 ілюструють погіршення якості дистильованої води під час відгонки внаслідок шлакування

відгонних кубів і ТЕНів осадом, який складається в основному з карбонатів кальцію та магнію (природна тимчасова жорсткість води), гідроксиду заліза (ІІІ) (продукт окиснення заліза водопровідних труб) та інших домішок.

З графіка (рис. 1) можна зробити висновки, що в аквадистильаторі ДЕ-10 перші 4–5 л дистильованої води (передгон) зазвичай мають ПЕ $\geq 5,1$ мкСм/см за 25 °С, тобто не відповідають вимогам ДФУ і не можуть бути використані для фармакопейних цілей.

Аквадистильатор GFL-2008 є економішним щодо використання води для охолоджуючого контуру (до 50 л/год), тоді як ДЕ-10 характеризується зна-



чно більшим споживанням холодної води (до 100 л/год). Проте аквадистиллятор GFL-2008 у роботі швидше зашлаковується. Так, для GFL-2008 різниця ПЕ дистильованої води за 4 год роботи в разі початкової наробки 0, 20, 37 год складає відповідно 0,99, 1,25, 1,59 мкСм/см. Для ДЕ-10 різниця ПЕ дистильованої води за 4,5 год роботи при початковій наробці 18, 85 і 150 год складає 0,07, 0,13 і 0,34 мкСм/см відповідно. Тобто, у разі використання водопровідної води аквадистиллятор GFL-2008 потребує чистки в 5–10 разів частіше, ніж ДЕ-10.

На рисунках 2 і 3 наведено фотографії перегонних кубів аквадистилляторів GFL-2008 і ДЕ-10 до та після очистки.

Таким чином, зашлаковування внутрішніх поверхонь аквадистилляторів (рис. 2, 3) погіршує якість отримуваної дистильованої води. Тому виробником пропонується здійснювати технічне обслуговування аквадистилляторів не рідше ніж 1 раз у 3 міс. або ж з такою періодичністю, щоб товщина накипу на ТЕНах була $\leq 0,3$ мм [14]. Рекомендована [15] суміш для очищення перегонного куба аквадистилляторів від накипу наступна: 10 % мур-

шиної, 10 % оцтової кислот і 80 % дистильованої води. Її недоліком є різкий неприємний запах. Ефективним також є використання 3–5 % водного розчину сульфамінової кислоти [16]. Розчини слабких органічних кислот – лимонної та адипінової – діють набагато повільніше.

Хімічна інертність металічних сплавів ТЕНів і нержавіючої сталі перегонного та прийомного кубів аквадистилляторів GFL-2008 і ДЕ-10 також впливає на ПЕ отриманої дистильованої води. Аквадистиллятор GFL-2008 після очистки фактично зразу ж виходить на режим і продукує дистильовану воду з ПЕ $\geq 2,0$ мкСм/см, тоді як свіжоочищений від накипу ДЕ-10 потребує 5–10 год попередньої роботи для отримання води з ПЕ $\geq 2,3$ мкСм/см.

Слід зазначити, що ПЕ отриманої дистильованої води не є константою (табл. 3, рис. 4). У разі зберігання її в закритих поліетиленових контейнерах ПЕ зменшується за 8 год на 0,37–0,49 мкСм/см (вода, отримана з GFL-2008) і 0,59–1,72 мкСм/см (вода, отримана з ДЕ-10).

Зниження показника ПЕ дистильованої води обумовлено зменшенням

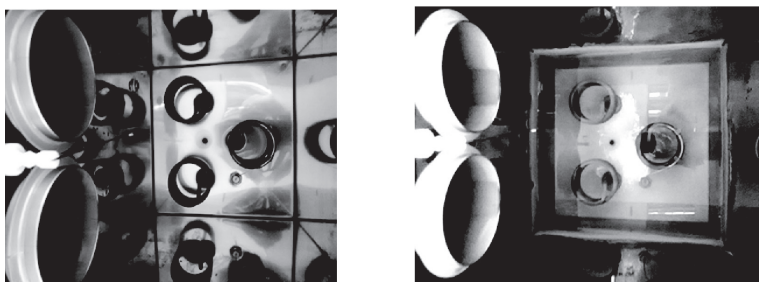


Рис. 2. Внутрішня поверхня перегонного куба дистиллятора GFL-2008 (зліва – свіжоочищена, справа – після 30 год роботи)



Рис. 3. Внутрішня поверхня перегонного куба дистиллятора ДЕ-10 (зліва – свіжоочищена, справа – після 150 год роботи)

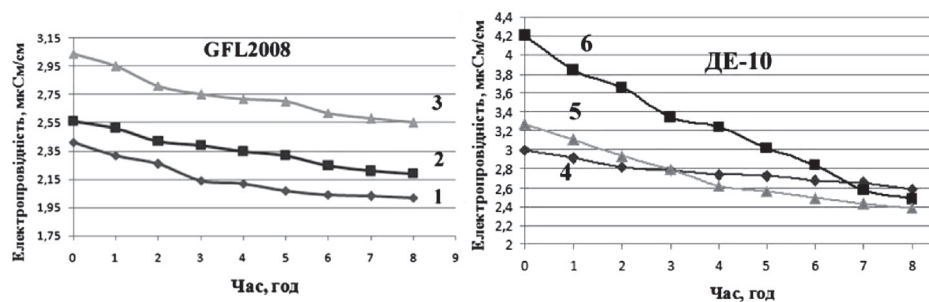


Рис. 4. Залежність питомої електропровідності води очищеної, отриманої на дистилляторі GFL-2008, від часу її зберігання

кількості іонів у ній, що, вірогідно, обумовлено як фізичними причинами (розчиненням атмосферних газів [6–8, 17], процесами сольватації, осадження, седиментації, агрегації та коагуляції [8–10]), так і біологічними (розмноженням мікроорганізмів [11, 12]).

Висновки

Таким чином, в організаціях та установах, що працюють з дистильованою

водою, для виконання фармакопейних вимог щодо чистоти води контроль якості кондуктометричним методом повинен вестись не спорадично, а погодинно чи безперервно. Внутрішні поверхні аквадистилляторів, які контактують з киплячою водою, повинні регулярно очищуватись від шламу, накопичення якого погіршує електропровідність отриманої дистильованої води.

1. Державна Фармакопея України, Т. 2. – Харків : Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2014. – 724 с.
2. European Pharmacopoeia, Eighth Edition, V. 2. – Nordlingen : Druckerei C. H. Beck, 2014. – 3555 p.
3. Patil P. N. Physico-chemical parameters for testing of water / P. N. Patil, D. V. Sawant, R. N. Deshmukh // Int. Journ. of Env. Sci. – 2012. – V. 3 (3). – P. 1194–1207.
4. Conductivity of water (based on ISO 7888:1985) – DOC316.52.93084, Ed.2. – 2015. – P. 4.
5. Conductivity. Theory and Practice. – Villeurbanne : Radiometer Analytical SAS, 2004. – P. 1–49.
6. Bruttel P. A. Conductometry – Conductivity Measurement / P. A. Bruttel. – Herisau : Metrohm Ltd, 2004. – 48 p.
7. Moore R. D. Electrical Conductivity as an Indicator of Water Chemistry and Hydrologic Process / R. D. Moore, G. Richards, A. Story // Streamline Watershed Manag. Bull. – 2008. – V. 11 (2). – P. 25–29.
8. Ageev I. M. Slow variations of the electroconductivity of distilled water / I. M. Ageev, Yu. M. Rybin, G. G. Shishkin // Mosc. Univers. Physics Bulletin. – 2016. – V. 71 (6). – P. 556–561.
9. Akopian S. N. A study of specific electrical conductivity of water by the action of constant magnetic field, electromagnetic field, and low-frequency mechanical vibrations / S. N. Akopian, S. N. Airapetian // Biofizika. – 2005. – V.50(2). – P.265–270.
10. Modeling Physical-Chemical Properties of High Dilutions: an electrical conductivity study / C. Holandino, R. Harduim, V. Veiga, S. Garcia // Int. J. High. Dilution Res. – 2008. – V. 7 (25). – P. 165–173.
11. Microbial activity influences electrical conductivity of biofilm anode / B. R. Dhar, J. Sim, H. Ryu, H. Ren // Water Res. – 2017. – V. 15 (127). – P. 230–238.
12. Influence of salinity and water content on soil microorganisms / N. Yana, P. Marschner, W. Cao, C. Zuo // Int. Soil and Water Conserv. Res. – 2015. – V. 3 (4). – P. 316–323.
13. Державна Фармакопея України, Т. 1. – Харків : Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2015. – 1128 с.
14. Аквадистиллятор электрический ДЭ-10°СПБ°. ОКП 94 5243 Модель 789 ИЮТЕ 942737.005 РЭ. Руководство по эксплуатации. – 28 с.
15. Wasserdessillierapparate 2002-2012 – Bedienungs-Anleitung. – Burgwedel, 2012. – 27 p.
16. Clapp L. B. Sulfamic acid and its uses / L. B. Clapp // J. Chem. Ed. – 1943. – V. 20 (4). – P.189–346.
17. Сычева Е. В. Влияние температуры и атмосферного давления на электропроводность воды / Е. В. Сычева, Н. А. Манаков, А. Д. Юрк // Материалы Всерос. науч.-метод. конференции «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры», Оренбург, 29-31 января 2014 г. – Оренбург, 2014. – С. 1493–1497.

В. М. Брицун, Н. В. Останіна

Особливості кондуктометричного контролю якості дистильованої води для фармакопейних потреб

Вода дистильована використовується як розчинник для приготування та аналізу лікарських засобів і повинна відповідати фармакопейним вимогам чистоти. Проте процес отримання води очищеної дистillaцією зазвичай є циклічним (запуск обладнання, вихід на режим, власне робота та вимкнення), і на різних стадіях функціонування аквадистиллятора якість отриманої води може суттєво відрізнитись.

Мета дослідження – моніторинг питомої електропровідності та визначення заходів для покращання якості дистильованої води, що використовується для фармакопейних потреб у лабораторіях, аптеках, на виробництвах тощо.

Кондуктометричним методом було проведено дослідження питомої електропровідності дистильованої води, свіжоотриманої з аквадистилляторів GFL-2008 і ДЕ-10. Встановлено, що якість дистильованої води залежить від таких факторів, як конструкція і час роботи аквадистиллятора в одному циклі (цикл – увімкнення, нагрівання, кипіння/перегонка, вимкнення), стан чистоти контактних з киплячою водою поверхонь і хімічна інертність нержавіючої сталі перегонних і прийомних кубів аквадистилляторів.

Таким чином, в організаціях та установах, що використовують дистильовану воду, для виконання фармакопейних вимог щодо її чистоти контроль якості отриманої води кондуктометричним методом повинен вестись не спорадично, а погoдинно чи безперервно. Внутрішні поверхні аквадистилляторів, які контактують з киплячою водою, повинні регулярно (не рідше 1 разу в 3 міс) очищуватися від шламу, накопичення якого погіршує питому електропровідність отриманої дистильованої води.

Ключові слова: вода очищена, вода дистильована, дистillaція, аквадистиллятор, питома електропровідність, контроль якості води

В. Н. Брицун, Н. В. Останина

Особенности кондуктометрического контроля качества дистиллированной воды для фармакопейных потребностей

Вода дистиллированная используется как растворитель для приготовления и анализа лекарственных средств и должна отвечать фармакопейным требованиям чистоты. Однако процесс получения воды очищенной дистillaцией обычно является циклическим (запуск оборудования, выход на режим, собственно работа и выключение), и на различных стадиях функционирования аквадистиллятора качество полученной воды может существенно отличаться.

Цель исследования – мониторинг удельной электропроводности и определение мероприятий для улучшения качества дистиллированной воды, которая используется для фармакопейных потребностей в лабораториях, аптеках, на производствах и т. п.

Кондуктометрическим методом было проведено исследование удельной электропроводности дистиллированной воды, свежеполученной из аквадистилляторов GFL-2008 и ДЕ-10.

Установлено, что качество дистиллированной воды зависит от таких факторов, как конструкция и время работы аквадистиллятора в одном цикле (цикл – включение, нагрев, кипение/перегонка, отключение), состояние чистоты контактных с кипящей водой поверхностей и химическая инертность нержавеющей стали перегонных и приемных кубов аквадистилляторов.

Таким образом, в организациях и учреждениях, использующих дистиллированную воду, для выполнения фармакопейных требований по ее чистоте – контроль качества полученной воды кондуктометрическим методом должен вестись не спорадически, а почасово или непрерывно. Внутренние поверхности аквадистилляторов, которые контактируют с кипящей водой, должны регулярно (не реже 1 раза в 3 мес) очищаться от шлама, накопление которого ухудшает удельную электропроводность полученной дистиллированной воды.

Ключевые слова: вода очищенная, вода дистиллированная, дистillaция, аквадистиллятор, удельная электропроводность, контроль качества воды

V. M. Britsun, N. V. Ostanina

Features of conductometric quality control of distilled water for pharmacopoeial needs

Distilled water is used as a solvent for the preparation and analysis of medicinal products. It must meet the pharmacopeia purity requirements. However, the process of obtaining purified water by distillation is usually cyclic (starting up the equipment, entering the mode, actually operating and shutting down), and the quality of the produced water can significantly differ on different stages of the aquadistillator functioning.

The purpose of the study is to improve the quality of distilled water, which is used for pharmacopoeial needs in laboratories, pharmacies, in industries, etc.

Conductometric method was used to investigate the specific electrical conductivity of distilled water freshly obtained from aquadistillers GFL-2008 and DE-10.

It has been established that the quality of distilled water depends on such factors as the design and operating time of the aquadistillator in one cycle (cycle-inclusion, heating, boiling/distillation, shutdown), the state of cleanliness of surfaces contacting with boiling water and the chemical inertness of the stainless steel of distilling and receiving cubes of aquadistillators.

Thus, in organizations and institutions which using distilled water, in order to fulfill the pharmacopoeial requirements for its purity, the quality control of the produced water by the conductometric method should be conducted not sporadically, but hourly or continuously. The internal surfaces of aquadistillers that come into contact with boiling water - must be cleaned regularly (at least every three months) from the sludge, the accumulation of which worsens the specific electrical conductivity of the obtained distilled water.

Key words: purified water, distilled water, distillation, aquadistiller, specific electrical conductivity, water quality control

Надійшла: 5 лютого 2018 р.

Контактна особа: Брицун Василь Миколайович, доктор хімічних наук, головний науковий співробітник, Державна науково-дослідна лабораторія з контролю якості лікарських засобів, ДУ «Інститут громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва Національної академії медичних наук України», буд. 50, вул. Попудренка, м. Київ, 02660. Тел.: + 38 0 44 559 77 11.
Електронна пошта: britsun167@ukr.net

Пам'яті вченого, колеги, друга Віктора Миколайовича Бобирьова



9 березня 2018 року після тривалої тяжкої хвороби пішов з життя відомий талановитий науковець, людина великої й щедрої на добро душі, улюблений Учитель кількох поколінь студентів-медиків, до останніх днів життя відданий своєму покликанню лікар, надійний товариш і мудрий радник, перший проректор ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», лауреат Державної премії України, заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор Віктор Миколайович Бобирьов.

Біографія В. М. Бобирьова на початку його життя в чомусь схожа на біографію інших його ровесників. Він народився 9 травня 1950 року в м. Валуйки Белгородської області в робітничій сім'ї. Срібним медалістом вступив до Харківського медичного училища. Навчався на відмінно, й отримавши диплом з відзнакою в 1969 році влився в лави студентів стоматологічного факультету Полтавського медичного

стоматологічного інституту. Закінчивши і його з відмінними оцінками, свій науковий шлях почав у 1975 році асистентом на кафедрі фармакології в рідному вузі. Потім працював старшим лаборантом, у 1981 році отримав науковий ступінь кандидата медичних наук, у 1985 році – вчене звання доцента. З 1988 року виконував обов'язки завідувача кафедри фармакології.

Цілеспрямованість, відповідальність, активна життєва позиція Віктора Миколайовича завжди були прикладом для колег і студентів. У все він вкладав частку своєї душі. Після присудження йому в 1991 році наукового ступеня доктора медичних наук і в 1992 році – звання професора, В. М. Бобирьов очолив деканат медичного факультету, а в 1992–2004 роках був проректором з навчальної роботи УМСА. З 2004 року й до останніх днів життя Віктор Миколайович був першим проректором ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Навчально-методична робота, яку він очолював в академії, завжди була провідним напрямом у її діяльності. Головними принципами на посаді першого проректора Віктор Миколайович вважав розумну жорсткість і відповідальність. Він завжди тримав дане слово й учив цьому студентів. Завдяки злагоженості діяльності науково-викладацького колективу та далекоглядній позиції ректорату академія досягла престижного 50-го рівня в рейтингу серед 200 вишів України. І в цьому є й звитязна праця її першого проректора В. М. Бобирьова. Він зробив вагомий внесок у підготовку науково-медичних кадрів, які працюють не тільки в Україні, а й далеко за її кордонами.

Сфера наукових інтересів Віктора Миколайовича сягала далеко за межі клінічної фармакології. Він був членом Президії Державного експертного центру МОЗ України, членом Президії Українських наукових громад фармакологів та геронтологів, головою Полтавського відділення Української громади геронтологів та регіонального відділення ВГО «Асоціація фармакологів України». Віктор Миколайович Бобирьов є автором понад 400 науково-педагогічних робіт, під його керівництвом захищено 3 докторських і 17 кандидатських дисертаційних робіт.

Держава і наукова спільнота високо оцінили внесок В. М. Бобирьова в меди-

цину. У 1992 році йому присуджено грант міжнародного фонду Сороса, у 1997 році – почесне звання заслуженого діяча науки і техніки України, у 1998 році Віктор Миколайович нагороджений медаллю освіти України. У 2004 році він став лауреатом премії АМН України. За підручник «Фармакологія» для студентів вищих навчальних медичних закладів В. М. Бобирьову в 2016 році присуджена Державна премія в галузі науки і техніки України.

Останні роки життя Віктор Миколайович довго й тяжко хворів. Але залишались незмінними його працелюбність і відданість медицині, яку він обрав справою всього свого життя. Не згасала його любов до дружини і близьких.

Численним колегам, учням, друзям і просто всім, хто знав В. М. Бобирьова важко повірити в те, що ця світла, сповнена кипучої енергії й любові до життя людина, ентузіаст нових досліджень і проектів у науці, пішов за недосяжний обрій...

Завжди пам'ятатимемо. Світла пам'ять!

*Ректорат і науково-викладацький колектив
ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»,
ВГО «Асоціація фармакологів
України»*