

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

Том 13, № 1/2019

ISSN 2524-2563 (Online)

ISSN 2227-7943 (Print)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Т. А. Бухтіарова (головний редактор)

Г. С. Григор'єва (заст. головного редактора)

А. І. Соловйов (заст. головного редактора,
науковий редактор)

Л. Б. Бондаренко
(м. Київ)

І. Ф. Беленічев
(м. Запоріжжя)

Н. О. Ветютнева
(м. Київ)

Г. М. Войтенко
(м. Київ)

В. В. Годован
(м. Одеса)

М. Я. Головенко
(м. Одеса)

А. М. Демченко
(м. Київ)

І. А. Зупанець
(м. Харків)

Т. К. Єфімцева
(м. Київ)

В. М. Коваленко
(м. Київ)

О. Ю. Коновалова
(м. Київ)

О. І. Коняєва
(м. Київ)

І. Г. Кудрявцева
(м. Київ)

О. В. Матвєєва
(м. Київ)

Н. В. Літвінова (науковий редактор)

С. О. Мисливець (відповідальний секретар)

В. І. Опришко
(м. Дніпропетровськ)

Г. І. Парамонова
(м. Київ)

С. Б. Парій
(м. Кишинів, Молдова)

О. М. Пархоменко
(м. Київ)

К. А. Посохова
(м. Тернопіль)

Н. М. Серединська
(м. Київ)

С. М. Тишкін
(м. Київ)

О. О. Цуркан
(м. Київ)

Н. І. Шарикіна
(м. Київ)

Л. М. Шеремета
(м. Івано-Франківськ)

О. К. Ярош
(м. Київ)

РЕДАКЦІЙНА РАДА

Ю. І. Губський
(м. Київ)

В. Й. Кресюн
(м. Одеса)

В. Д. Лук'янчук
(м. Луганськ)

В. Й. Мамчур
(м. Дніпропетровськ)

М. А. Мохорт
(м. Київ)

О. Р. Піняжко
(м. Львів)

Г. І. Степанюк
(м. Вінниця)

І. М. Трахтенберг
(м. Київ)

І. С. Чекман
(м. Київ)

Журнал зареєстрований Державною реєстраційною службою України

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації

Серія КВ № 19717-9517ПП від 25.02.2013

Журнал зареєстрований у серпні 2007 року (свідоцтво Серія КВ № 13093-1977Р від 23.08.2007 Міністерства юстиції України)

Журнал включено до Переліку наукових фахових видань України (біологічні, медичні, фармацевтичні науки)

Наказ Міністерства освіти і науки України від 04.07.2014 р. № 793

Журнал № 1 (62)/2019 рекомендований до друку вченою радою ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол від 26.02.2019 р. № 1)

Видавець ТОВ "Видавничий дім «Авіцена» – Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавців, виготовників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 2726 від 18.12.06.

Формат 70×108 1/16. Папір офсетний № 1. Ум. друк. арк. 7,0. Наклад 200 прим. Зам. № 14

Адреса редакції: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, 03057, м. Київ.

Тел.: + 38 0 44 456-42-56, 456-40-22. Електронна пошта: ift.regedit@gmail.com

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Бондаренко Л. Б. Міжнародна гармонізація номенклатурних і діагностичних критеріїв: сучасні проблеми та завдання	3
Сенюк І. В., Брюханова Т. О., Башар Джабар Аль Сахлані Етіопатогенез хронічного запору та основні шляхи фармакологічної корекції	11

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Супрун Е. В., Кабачна І. В., Кабачний В. І., Абрамов А. В., Бухтіярова Н. В. Модуляція процесів нейроапоптозу в щурів після кетамінового та пропофолового наркозів під впливом Гетерозиду	19
---	----

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Demchenko S. A., Bobkova L. S., Yadlovskiy O. E., Bukhtiarova T. A., Demchenko A. M. Synthesis of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and their effect on platelets aggregation	28
Demchenko A. M., Moskalenko O. V., Sukhoveev V. V., Barchyna A. I. Synthesis and antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides for Flu A H1N1 virus	35
Добреля Н. В., Паршиков О. В., Бойцова Л. В., Хромов О. С. Моделювання цукрового діабету II типу	42
Дукон І. Ф., Мазулін А. В., Беленичев І. Ф., Абрамов А. В. Экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности экстракта травы <i>Achillea micranthoides</i> Klok. et Krytzka	51
Зайченко Г. В., Равшанов Т. Б. Ефективність супозиторіїв з індол-3-карбінолом і мелоксикамом за тестостерон-індукованої гіперплазії передміхурової залози в щурів	58
Лук'янчук В. Д., Бухтіярова Т. А., Поліщук Є. М. Фармакокінетичний аналіз розподілу потенційного церебропротектора «Цереброгерм» з центральної камери в периферичні на моделі черепно-мозкової травми в щурів	66

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Bashar Jabbar Ali Sahlane, Senyuk I. V. Investigation of membrane stabilizing action of extracts from <i>Prunus domestica</i> fruits	71
--	----

ОСОБИСТОСТІ

До ювілею Світлани Мефодіївни Дроговоз	75
--	----

СОДЕРЖАНИЕ

77

CONTENT

78

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Бондаренко Л. Б.* Международная гармонизация номенклатурных и диагностических критериев: современные проблемы и задачи3
- Сенюк И. В., Брюханова Т. А., Башар Джабар Аль Сахлани* Этиопатогенез хронического запора и основные пути фармакологической коррекции 11

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

- Супрун Э. В., Кабачная И. В., Кабачный В. И., Абрамов А. В., Бухтиярова Н. В.* Модуляция процессов нейроапоптоза у крыс после кетаминowego и прополового наркозов под влиянием Гетерозида 19

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

- Демченко С. А., Бобкова Л. С., Ядловский О. Е., Бухтиярова Т. А., Демченко А. М.* Синтез производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазаацклопента[сd]азулена и их влияние на агрегацию тромбоцитов.....28
- Демченко А. М., Москаленко О. В., Суховеев В. В., Барчина Е. И.* Синтез и противовирусная активность 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов по отношению к вирусу FLU A H1N1.....35
- Добреля Н. В., Паршиков А. В., Бойцова Л. В., Хромов А. С.* Моделирование сахарного диабета II типа42
- Дуюн И. Ф., Мазулин А. В., Беленичев И. Ф., Абрамов А. В.* Экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka..... 51
- Зайченко А. В., Равшанов Т. Б.* Эффективность суппозиторий с индол-3-карбинолом и мелоксикамом при тестостерон-индуцированной гиперплазии предстательной железы у крыс58
- Лукьянчук В. Д., Бухтиярова Т. А., Полищук Е. Н.* Фармакокинетический анализ распределения потенциального церебропротектора «Цереброгерм» из центральной камеры в периферические на модели черепно-мозговой травмы у крыс66

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Башар Джабар Аль Сахлани, Сенюк И. В.* Изучение мембраностабилизирующей активности экстрактов из плодов *Prunus domestica* 71

ЛИЧНОСТИ

- К юбилею Светланы Мефодиевны Дроговоз..... 75

CONTENT78

CONTENT

REVIEWS

- Bondarenko L. B.* International harmonization of nomenclature and diagnostic criteria: modern problems and tasks 3
- Senyuk I. V., Briukhanova T.O., Bashar Jabar Al-Sahlan*i Etiopathogenesis of chronic constipation and common approaches to pharmacological correction..... 11

CONTEMPORARY ASPECTS OF NEUROPHARMACOLOGY

- Suprun E. V., Kabachnaya I. V., Kabachnyy V. I., Abramov A. V., Bukhtiyarova N. V.* Modulation of neuroapoptosis processes after ketamine and propofol anesthesia in rats under the influence of Heteroside 19

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

- Demchenko S. A., Bobkova L. S., Yadlovskiy O. E., Bukhtiarova T. A., Demchenko A. M.* Synthesis of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and their effect on platelets aggregation..... 28
- Demchenko A. M., Moskalenko O.V., Sukhoveev V.V., Barchyna A. I.* Synthesis and antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides for Flu A H1N1 virus 35
- Dobrelia N. V., Parshikov A. V., Boitsova L. V., Khromov O. S.* Experimental model type II diabetes mellitus 42
- Duyun I. F., Mazulin A. V., Belenichev I. F., Abramov A. V.* Experimental study of hepatoprotective and antioxidant activity of *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka grass extract..... 51
- Zaychenko G. V., Ravshanov T. B.* Effectiveness of suppositories with indole-3-carbinol and meloxicam in testosterone-induced prostate hyperplasia in rats 58
- Lukyanchuk V. D., Bukhtiarova T. A., Polishchuk Ye. M.* Pharmacokinetic analysis of the distribution of a potential cerebroprotector «Cerebrogerm» from the central chamber to the peripheral on the model of craniocerebral trauma in rats 66

SHORT COMMUNICATIONS

- Bashar Jabbar Ali Sahlanee, Senyuk I. V.* Investigation of membrane stabilizing action of extracts from *Prunus domestica* fruits 71

PERSONALITIES 75

Л. Б. Бондаренко

Міжнародна гармонізація номенклатурних і діагностичних критеріїв: сучасні проблеми та завдання

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

Ключові слова: гармонізація, діагностичні критерії, термінологія, патоморфологічні дослідження

Поглиблення процесів глобалізації в галузі медицини та фармакології, введення взаємовизнаних регуляторних положень GMP, GLP і GCP зумовили актуальність забезпечення не лише одержання загальноприйнятних результатів, але й їхнього загального адекватного розуміння [1]. На вирішення цієї мети спрямований міжнародний проект INHAND (Міжнародна гармонізація номенклатури та діагностичних критеріїв), що діє з 2005 року. Ще в 2005 році Товариство токсикологічної патології (STP) та Європейське товариство токсикологічної патології (ESTP) разом з Реєстром промислових токсикологічних даних на тваринах (RITA) розпочали спільний процес перегляду, оновлення та гармонізації існуючих номенклатурних документів і баз даних. Британське товариство токсикологічної патології (BSTP) й Японське товариство токсикологічної патології (JSTP) приєдналися до цього проекту в 2006 році, зробивши його дійсно глобальною ініціативою [2]. Всесвітній розпорядчий редакційний комітет (GESC) керує загальними напрямками проекту, а робочі групи (RG) формують термінологічні пропозиції для кожної системи органів [3]. І GESC, і RG включають експертів з товариств токсикологічної патології Північної Америки, Європи та Японії. Наразі значного прогресу досягнуто в даному напрямі стосовно 9 систем органів – респіраторної, гепатобіліарної, сечової, центральної та периферичної нервової, репродуктивних систем у жінок і чоловіків, а

також – молочних залоз, кліторальних і препітуальних залоз, шкірних покривів і м'яких тканин [1]. INHAND посібники з номенклатури пропонують стандартизовані діагностичні критерії та підходи до реєстрації уражень, які спостерігаються в ході проведення досліджень токсичності та канцерогенності хімічних сполук на гризунах. Вони надають репрезентативні фото – мікрофотографії морфологічних змін, інформацію щодо патогенезу та ключові посилання. Представники GESC INHAND постійно співпрацюють зі співробітниками Центру оцінки та дослідження лікарських засобів федерального агентства з вивчення безпечності продуктів харчування та ліків США (Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER), консорціуму з розробки стандартів щодо взаємообміну клінічних даних (Clinical Data Interchange Standards Consortium (CDISC) та служб промислової термінології Національного інституту раку США (National Cancer Institute (NCI) Enterprise Vocabulary Services (EVS) для сумісного пошуку підходів до включення гармонізованої термінології INHAND до стандарту взаємозамінності неклінічних даних (SEND – Standard for Exchange of Nonclinical Data), що використовується за реєстрації препаратів у FDA. Зацікавленість у використанні номенклатури INHAND, що зумовлена значним внеском у розробку даного проекту токсикологів, які працюють на фармацевтичному виробництві та у профільних державних закладах, а також фахівців з інформаційних технологій, свідчить, що ця номенклатура стає вже загальноприйнятною [1].

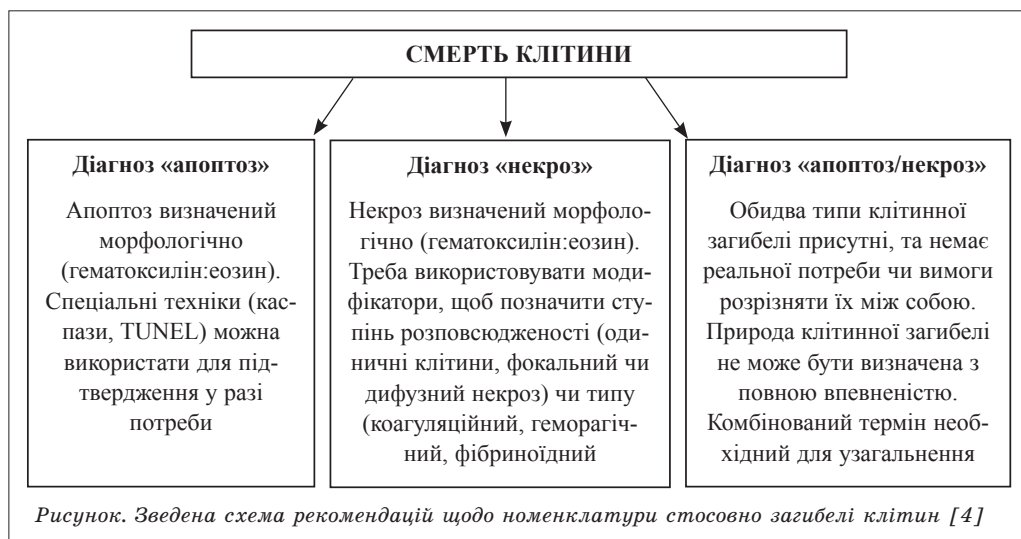
Однак на даному шляху постає багато значних проблем. Зокрема, стандартизація мікроскопічної номенклатури патологічних досліджень і діагностичних критеріїв, особливо стосовно щурів і мишей, триває вже багато років і є надзвичайно трудомістким процесом [2]. Досі лишаються неузгодженими номенклатури патологічних досліджень і діагностичних критеріїв стосовно таких систем органів гризунів, як травна, серцево-судинна, опорно-рухова, ендокринна, лімфоїдна/гематопоетична, а також органів чуття. Оскільки результатом напрацювань GESC INHAND є досить великі за об'ємом документи, то їхня публікація та міжнародне впровадження також потребують додаткових зусиль. Регулярно проводяться міжнародні регуляторні форуми, а основні напрацювання викладаються на спеціалізованих веб-сайтах, запроваджуються в наукових видавництвах, публікуються у вигляді посібників [1–3].

Крім того, паралельно з розробкою термінології для досліджень на гризунах у рамках GESC було видано нову директиву стосовно створення окремих комітетів з розробки видоспецифічної термінології (для досліджень на собаках, мавпах, кролях і міні-свинях). Комітети беруть за відправну точку вже затверджену номенклатуру для досліджень на гризунах, а потім розробляють додаткову термінологію, яка є унікальною для кожного виду, а також виключають з остаточного документа ту термінологію для досліджень на гризунах, яка не підходить для використання в даних видів тварин. Наразі робота лише розпочата, її результати поступово публікуються на спеціальних сайтах та в журналах у вигляді окремих статей чи доповнень до основних документів, які стосуються досліджень на гризунах [1–3].

Крім вирішення цих глобальних проблем у галузі патоморфології наразі надзвичайно актуальним є осучаснення досліджень відповідно до рекомендацій робочої групи INHAND з проблем апоптозу та некрозу [4]. Розроблені методичні рекомендації призначені для використання токсикологом-патомор-

фологом у процесі рутинної оцінки гістологічних зрізів, пофарбованих гематоксиліном та еозином з метою якісного розрізнення апоптозу та некрозу. Новостворений документ буде слугувати як поточне керівництво INHAND. Будь-які раніше опубліковані документи INHAND, які не узгоджуються з цим керівництвом, будуть у подальшому переглянуті. Важливо відзначити, що, на відміну від раніше прийнятих документів, у даному керівництві чітко зазначено, що апоптоз і некроз одиничних клітин не є синонімами, хоча токсикологи-патоморфологи часто використовували їх як взаємозамінні терміни. Також у документі підкреслюється та обставина, що, оскільки в ході рутинних токсикологічних випробувань далеко не всі ситуації вимагають однакового ступеня точності щодо розрізнення апоптозу від некротичної загибелі клітин, то можливим є застосування й комбінованого терміна – «апоптоз/некроз одиничних клітин». Він може бути використаний, коли встановлення відмінності між різними типами загибелі клітин не є необхідним або коли вона не може бути визначена ні забарвленням гематоксиліном та еозином, ні іншими барвниками, що наявні в патоморфологічній практиці. Рекомендації щодо використання термінів «апоптоз» і «некроз», а також «комбінований апоптоз/некроз одиничних клітин» підсумовані на рисунку.

Попередні вказівки щодо номенклатури в галузі процесів загибелі клітин були надані в 1999 році в публікації «Номенклатури клітинної смерті: рекомендації спеціального комітету Товариства токсикологічних патологів» [5]. У них рекомендувалося використовувати термін «некроз» для опису будь-яких морфологічних знахідок загибелі клітин у гістологічних зрізах, незалежно від шляху, за допомогою якого клітини померли. Крім того, терміни «апоптотичний», «онкотичний» або «змішаний апоптотичний і некротичний» дозволялось використовувати як модифікатори для визначення переважаючого шляху загибелі клітин у разі необхідності. Основна мета полягала в тому, щоб «патологоанатоми використовували



терміни, які точно та лаконічно передають рівень інформації, що відповідає потребам дослідження». Однак такий підхід до цих термінів не одержав широкого визнання в спільноті токсикологів-патоморфологів, можливо, через інтенсивні дослідження процесів апоптозу в останнє десятиріччя і тепер вже загальновизнаним розумінням того факту, що некроз і апоптоз клітин відбуваються за різними механізмами.

Тому, згодом, для вирішення проблеми номенклатури щодо процесів загибелі клітин у науковому співтоваристві була створена міжнародна група вчених, яка спочатку узгодила й опублікувала роботу «Смерть клітини та диференціація» у 2005 році, а потім через кілька років надала оновлену «Класифікацію загибелі клітин: рекомендації Комітету з номенклатури клітинної смерті 2009» [6–7]. Ними було запропоновано єдині критерії для визначення загибелі клітин і різних морфологій, надано визначення апоптозу, некрозу, автофагії та розмноження, а також обговорювалися орієнтовні визначення атипичних моделей загибелі клітин (мітотична катастрофа, аноїкіс, Валеріанівська дегенерація, парптоз, пірптоз, пірнекроз). Рекомендувалось не використовувати лише окремі біохімічні аналізи (тобто ДНК-фрагментацію, протеолітично активні каспази або продукти розщеплення їхніх субстратів) як ексклюзивні тести на апоптоз. Однак було зазначено, що ці тести в комплек-

сі з іншими діагностичними ознаками можуть бути корисними для діагностики апоптозу. У роботі відзначалось, що існують три різні шляхи клітинного катаболізму, які можна визначити за морфологічними критеріями: автофагія, некроз й апоптоз. Використання термінів, таких як «некроапоптоз» і «апонекроз» для опису загибелі клітин, де одночасно відбувається апоптоз і некроз, не рекомендувалось, настійно наголошувалося на використанні некрозу й апоптозу, виключно як окремих термінів.

Роботи ряду дослідників показали, що хоча механізми та морфологія апоптозу й некрозу розрізняються, є докази того, що вони мають подібні біохімічні схеми перебігу, описані як «континуум апоптозу-некрозу» [8]. Як приклад, зниження доступності каспаз і внутрішньоклітинного АТФ може перетворити поточний апоптотичний процес у некротичний [9].

Наразі розроблений INHAND документ дає осучаснені вказівки щодо ідентифікації та діагностики апоптозу та некрозу. Цей керівний документ також включає обговорення клітинних механізмів апоптозу та некрозу, коли й де відбувається апоптоз, опису морфологічних особливостей апоптозу та некрозу в гематоксилін:еозин-забарвлених зрізах тканин, додаткових методів, які можуть бути використані для підтвердження апоптозу, і деякі конкретні приклади тих органів, де розрізнення

між апоптозом і некрозом клітин може бути складним завданням.

Треба також мати на увазі, що існують інші форми загибелі клітин, описані та обговорені в літературі, такі як автофагія, некроптоз, ериптоз, апоптоз і піроптоз [10–16]. Такі форми загибелі клітин виходять за рамки даного регуляторного документа, робота над їхньою термінологією ще триває.

Не менш проблемними є й питання, що стосуються діагностичних критеріїв у ході скринінгу ендокринних дизрупторів [17]. Наприклад, Програма скринінгу ендокринних дизрупторів Агентства охорони навколишнього середовища США (EDSP) передбачає багатосторонній підхід для визначення потенціалу хімічних речовин стосовно впливу на певні ланки ендокринної системи. Розроблений INHAND документ надає детальну інформацію щодо міжнародно узгоджених стандартизованих процедур обробки, оцінки та номенклатури тканин з метою забезпечення стандартизації результатів аналізу в лабораторіях. Встановлюються стандартні кінцеві точки випробувань, що включають вагу органів, циклічність еструсу, клінічні прояви патології, визначення рівнів гормонів у біологічних рідинах і тканинах і гістологічну оцінку тканин та органів. Інколи адекватне розуміння одержаних результатів може потребувати врахування ефектів, потенційно пов'язаних з лікуванням, які можуть вказувати на порушення ендокринної системи. Для остаточного висновку стосовно дії сполуки-ендокринного дизруптора потрібно дослідити піхву, молочні залози та печінку. Ці результати можуть бути корисними за оцінки ендокринних порушень [17].

Розроблений INHAND у 2013 році документ передбачає одержання інформації для оцінки перипубертальних тканин у контексті окремих кінцевих точок випробувань, загального пубертатного аналізу та аналізів рівня I Програми скринінгу ендокринних дизрупторів Агентства охорони навколишнього середовища США. Рекомендації, описані в цьому документі, відповідають опублікованим керівним документам США (EPA). Залежність варіабель-

ності тонких морфологічних змін у перипубертальних тварин від численних внутрішніх (порода, лінія тварин, постачальник і темп росту) [18] і зовнішніх (харчування та стрес) факторів [19–20] детально проаналізована на конкретних прикладах з широким ілюстративним матеріалом з метою допомогти патологоанатомам, які власне проводять дослідження, а також рецензентам регуляторних органів (EPA та ін.) у правильній інтерпретації результатів випробувань та в подальшому поліпшенні гармонізації результатів патоморфологічних досліджень між лабораторіями [21].

Дослідження ендокринних дизрупторів на пубертатних тваринах обох статей специфічно перевіряють наявність реалізації ендокринних ефектів хімічних речовин під час ювенільного та перипубертального періодів розвитку, коли вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади (HPG) зазнає інтенсивних змін. Патологоанатоми повинні враховувати нормальні біологічні відмінності в разі оцінки та інтерпретації даних, одержаних на пубертатних тваринах, й утримуватися від «надінтерпретації» тонких відмінностей у морфологічних особливостях. Найпоширеніші випадки, що наведені та проаналізовані в розробленому INHAND у 2013 році документі, призначені для того, щоб забезпечити вироблення в дослідника-патологоанатома правильного підходу до оцінки перипубертальних тканин і більш глибокого розуміння впливу гістологічних результатів у загальному контексті даних, одержаних на пубертатних тваринах. Тести рівня 1 EDSP повинні передбачати проведення оцінки матеріалу паралельно рядом дослідників, використовуючи процес WoE, щоб визначити ступінь комплементарності даних не тільки в межах конкретного тесту, але й у всій батареї тестів. Кінцеві точки пубертатного аналізу входять до батареї з 11 індикаторів потенціалу хімічної речовини як ендокринного дизруптора.

Враховуючи інтенсивність і важливість пошуку нових протипухлинних препаратів, стає очевидною актуальність гармонізації діагностичних кри-

теріїв і тлумачної термінології стосовно проліферативних і непроліферативних уражень в експериментальних тварин [22]. Проект INHAND забезпечив розробку міжнародно визнаної номенклатури проліферативних і непроліферативних уражень у лабораторних тварин (щурів і мишей). Створено стандартизовану номенклатуру для класифікації мікроскопічних уражень, що спостерігаються в жіночому репродуктивному тракті лабораторних щурів і мишей, з кольоровими мікрофотографіями, що ілюструють приклади деяких уражень. Стандартизована номенклатура, що представлена в цьому документі, також доступна в електронному вигляді в Інтернеті (<http://www.goreni.org/>). Джерела, що стали основою для даного документа, включали бази даних гістопатологічних досліджень з урядових, наукових і промислових лабораторій у всьому світі. Документ описує спонтанні ураження та ті, що пов'язані з віковими змінами, а також ураження, викликані опроміненням дослідних тварин. Існує також розділ щодо нормальних циклічних змін, що спостерігаються в яєчнику, матці, шийці матки та піхві для порівняння нормальних фізіологічних змін з патологічними ураженнями. Широке поширення та застосування цієї міжнародної гармонізованої номенклатури дозволить суттєво зменшити плутанину між регуляторними та науково-дослідними організаціями в різних країнах і забезпечить спільну мову для збільшення та збагачення міжнародного обміну інформацією серед токсикологів і патологів.

У ході широкого світового прийняття INHAND номенклатури GESC стане постійно діючим комітетом, що об'єднає різні товариства токсикологів-патологів і висуватиме як інформаційний центр для коментарів і запитів щодо оновлення термінології INHAND від членів кожного товариства.

Хоча опублікована номенклатура INHAND для кожної системи органів

розробляється як всеохоплююча, однак уже нині спеціалісти визнають, що надалі виявлені додаткові ураження можуть потребувати включення до раніше створених документів. Так само необхідним буде постійне усунення помилок або виправлення неточностей, коли вони ставатимуть очевидними. Для вирішення цього питання ще в 2013 році було запроваджено офіційний процес контролю за змінами, який доступний на www.goreni.org. Науковцям пропонується подавати пропозиції щодо змін у номенклатурних системах і надавати обґрунтування таких змін через цей механізм. GESC продовжуватиме взаємодіяти з сайтом www.goreni.org і редакціями провідних міжнародних токсикологічних журналів, щоб підтримувати основну структуру майбутніх публікацій.

Висновки

Міжнародне впровадження та регулярний перегляд документів INHAND забезпечать міцну основу для їхнього використання патологоанатомами та регулюючими органами, які займаються оцінкою безпеки лікарських засобів, біопрепаратів і хімічних речовин у всьому світі.

На шляху приведення регуляторного законодавства та процесів функціонування системи охорони здоров'я України до міжнародних стандартів нагальним завданням є максимально широке запровадження напрацювань INHAND у медичну науку та практику нашої країни. Зокрема, необхідним є затвердження регуляторними органами нашої країни україномовного еквівалента міжнародних керівництв INHAND. Виконання досліджень відповідно до даних документів дозволить підвищити рівень міжнародного визнання вітчизняної наукової продукції та суттєво скоротити витрати виробників фармацевтичної промисловості України в разі виходу на ринки Північної Америки, Європи та Японії.

1. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) progress to date and future plans / C. M. Keenan, J. F. Baker, A. E. Bradley [et al.] // J Toxicol Pathol. – 2015. – V. 28. – P. 51–53.
2. The international nomenclature project: an update / J. Vahle, A. Bradley, T. Harada [et al.] // Toxicol Pathol. – 2009. – V. 37. – P. 694–697.

3. Keenan C. M. Regulatory Forum Commentary: Through the Looking Glass-SENDing the Pathology Data We Have INHAND / C. M. Keenan, D. G. Goodman // *Toxicol Pathol.* – 2013. – V. 42. – P. 807–810.
4. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group / S. A. Elmore, D. Dixon, J. R. Hailey [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2016. – V. 44. – P. 173–188. doi:10.1177/0192623315625859.
5. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists / S. Levin, T. J. Bucci, S. M. Cohen [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 1999. – V. 27. – P. 484–90.
6. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2005. – V. 12 (Suppl 2). – P. 1463–1467.
7. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – V. 16. – P. 3–11.
8. Zeiss C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice / C. J. Zeiss // *Vet Pathol.* – 2003. – V. 40. – P. 481–495.
9. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors / G. Denecker, D. Vercammen, W. Declercq, P. Vandenabeele // *Cell Mol Life Sci.* – 2001. – V. 58. – P. 356–370.
10. Bergsbaken T. Pyroptosis: host cell death and inflammation / T. Bergsbaken, S. L. Fink, B. T. Cookson // *Nat Rev Microbiol.* – 2009. – V. 7. – P. 99–109.
11. Elmore S. A. Editorial / S. A. Elmore // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – V. 39. – P. 1–2.
12. Gilmore A. P. Anoikis / A. P. Gilmore // *Cell Death Differ.* – 2005. – V. 12 (Suppl 2). – P. 1473–1477.
13. Lang F. Physiology and pathophysiology of eryptosis / F. Lang, E. Lang, M. Foller // *Transfus Med Hemother.* – 2012. – V. 39. – P. 308–314.
14. Linkermann A. Necroptosis / A. Linkermann, D. R. Green // *N Engl J. Med.* – 2014. – V. 370. – P. 455–465.
15. Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death / K. Newton // *Trends Cell Biol.* – 2015. – V. 25, № 6. – P. 347–353. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.001.
16. Ryter S. W. The impact of autophagy on cell death modalities / S. W. Ryter, K. Mizumura, A. M. Choi // *Int J. Cell Biol.* – 2014. – V. 2014. – Article ID 502676. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/502676>.
17. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Points to Consider*: Histopathology Evaluation of the Pubertal Development and Thyroid Function Assay (OPPTS 890.1450, OPPTS 890.1500) in Rats to Screen for Endocrine Disruptors / K. A. Keane, G. A. Parker, K. S. Regan [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2015. – V. 43, № 8. – P. 1047–1063. doi:10.1177/0192623315579943.
18. Best practices for use of historical control data of proliferative rodent lesions / C. Keenan, S. Elmore, S. Francke-Carroll [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2009. – V. 37. – P. 679–693.
19. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: A review of the biology, impact, and assessment / N. E. Everds, P. W. Snyder, K. L. Bailey [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2013. – V. 41. – P. 560–614.
20. Effects of altered food intake during pubertal development in male and female wistar rats / S. C. Laws, T. E. Stoker, J. M. Ferrell [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2007. – V. 100. – P. 194–202.
21. Foster P. M. D. Endocrine active agents: Implications of adverse and non-adverse changes / P. M. D. Foster, B. S. McIntyre // *Toxicol Pathol.* – 2002. – V. 30. – P. 59–65.
22. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System / D. Dixon, R. Alison, U. Bach [et al.] // *J. Toxicol Pathol.* – 2014. – V. 27. – P. 1S–107S. doi: 10.1293/tox.27.1s.

Л. Б. Бондаренко

Міжнародна гармонізація номенклатурних і діагностичних критеріїв: сучасні проблеми та завдання

Поглиблення процесів глобалізації в галузі медицини та фармакології, введення взаємовизнаних регуляторних положень GMP, GLP і GCP зумовили актуальність забезпечення не лише отримання загальноприйнятих результатів, але й їхнього загального адекватного розуміння. На вирішення цієї мети спрямований міжнародний проект INHAND (Міжнародна гармонізація номенклатури та діагностичних критеріїв), що діє з 2005 року. Всесвітній розпорядчий редакційний комітет (GESC) керує розробкою гармонізованої термінології, спираючись на експертів з Північної Америки, Європи та Японії. Регулярно проводяться міжнародні регуляторні форуми, а основні напрацювання викладаються на спеціалізованих веб-сайтах, запроваджуються в наукових видавництвах, публікуються у вигляді посібників. З 2011 року представники комітету почали розробку підходів до включення гармонізованої термінології INHAND до стандарту взаємозамінності неклінічних даних (SEND – Standard for Exchange of Nonclinical Data), що використовується за реєстрації препаратів FDA. Зацікавленість у використанні номенклатури INHAND, зумовлена значним внеском у розробку даного проекту токсикологів, що працюють на фармацевтичному виробництві та у профільних державних закладах, а також фахівців з інформаційних технологій, свідчить, що ця номенклатура стає вже загальноприйнятною. На шляху приведення регуляторного законодавства та процесів функціонування системи охорони здоров'я України до міжнародних стандартів нагальним завданням є максимально широке

запровадження напрацювань INHAND у медичну науку та практику. Зокрема, необхідним є затвердження регуляторними органами нашої країни україномовного еквівалента міжнародних керівництв INHAND. У галузі патоморфології наразі надзвичайно актуальним є осучаснення досліджень відповідно до рекомендацій робочої групи INHAND з проблем апоптозу та некрозу (Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group), а також стосовно скринінгу ендокринних дизрупторів (Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Points to Consider*: Histopathology Evaluation of the Pubertal Development and Thyroid Function Assay (OPPTS 890.1450, OPPTS 890.1500) in Rats to Screen for Endocrine Disruptors) та тлумачної термінології проліферативних і непроліферативних уражень в експериментальних тварин (Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System). Міжнародне впровадження та регулярний перегляд документів INHAND забезпечать міцну основу для їхнього використання патологоанатомами та регулюючими органами, які займаються оцінкою безпеки лікарських засобів, біопрепаратів і хімічних речовин у всьому світі. Виконання досліджень відповідно до даних документів дозволить підвищити рівень міжнародного визнання вітчизняної наукової продукції та суттєво скоротити витрати виробників фармацевтичної промисловості України в разі виходу на ринки Північної Америки, Європи та Японії.

Ключові слова: гармонізація, діагностичні критерії, термінологія, патоморфологічні дослідження

Л. Б. Бондаренко

Международная гармонизация номенклатурных и диагностических критериев: современные проблемы и задачи

Углубление процессов глобализации в области медицины и фармакологии, введение взаимопризнанных регуляторных положений GMP, GLP и GCP обусловили актуальность обеспечения не только получения общепризнанных результатов, но и их общего адекватного понимания. На решение этой цели направлен международный проект INHAND (Международная гармонизация номенклатуры и диагностических критериев), который действует с 2005 года. Всемирный распорядительный редакционный комитет (GESC) руководит разработкой гармонизированной терминологии, опираясь на экспертов из Северной Америки, Европы и Японии. Регулярно проводятся международные регуляторные форумы, а основные наработки выкладываются на специализированных сайтах, вводятся в практику научных издательств, публикуются в виде пособий. С 2011 года представители Комитета начали разработку подходов к включению гармонизированной терминологии INHAND в стандарт взаимозаменяемости неклинических данных (SEND – Standard for Exchange of Nonclinical Data), используемый при регистрации препаратов FDA. Заинтересованность в использовании номенклатуры INHAND, обусловленная значительным вкладом в разработку данного проекта токсикологов, работающих на фармацевтическом производстве и в профильных государственных учреждениях, а также специалистов по информационным технологиям, свидетельствует, что эта номенклатура становится уже общепринятой. На пути приведения регуляторного законодательства и процессов функционирования системы здравоохранения Украины к международным стандартам неотложной задачей является максимально широкое внедрение наработок INHAND в медицинскую науку и практику. В частности, необходимо утверждение регуляторными органами нашей страны україномовного еквівалента міжнародних керівництв INHAND. В области патоморфології сейчас чрезвычайно актуальным является осовременивание исследований в соответствии с рекомендациями рабочей группы INHAND по проблемам апоптоза и некроза (Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group), а также относительно скрининга эндокринных дизрупторов (Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Points to Consider *: Histopathology Evaluation of the Pubertal Development and Thyroid Function Assay (OPPTS 890.1450, OPPTS 890.1500) in Rats to Screen for Endocrine Disruptors) и толкования терминологии пролиферативных и непролиферативных поражений у экспериментальных животных (Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System). Международное внедрение и регулярный пересмотр документов INHAND обеспечат прочную основу для их использования патологоанатомами и регулирующими органами, которые занимаются оценкой безопасности лекарственных средств, биопрепаратов и химических веществ во всем мире. Выполнение исследований в соответствии с данными документами позволит повысить уровень международного признания отечественной научной продукции и существенно сократить расходы производителей фармацевтической промышленности Украины в случае выхода на рынки Северной Америки, Европы и Японии.

Ключевые слова: гармонізація, діагностичні критерії, термінологія, патоморфологічні дослідження

Л. В. Bondarenko

International harmonization of nomenclature and diagnostic criteria: modern problems and tasks

The deepening of the processes of globalization in the field of medicine and pharmacology, the introduction of mutually recognizable regulatory provisions GMP, GLP and GCP led to the relevance of ensuring not only the obtaining of commonly accepted results, but also their overall adequate understanding.

For this aim the international project INHAND (International Harmonization of the Nomenclature and Diagnostic Criteria), which has been in operation since 2005, has been started. The Global Editorial Editorial Committee (GESC) manages the development of harmonized terminology by experts from North America, Europe and Japan. International regulatory forums are held regularly, and the main achievements are laid out on specialized websites, introduced into practice by scientific publishing houses, published as manuals. Since 2011, Committee members have begun developing approaches to introduction the harmonized terminology INHAND into the Non-Clinical Data Interchange Standard (SEND – Standard for Exchange of Nonclinical Data) that is used when registering drugs by FDA. The interest in the use of the INHAND nomenclature, due to the significant contribution to the development of this project of toxicologists, working in the pharmaceutical industry and specialized state institutions, as well as IT specialists, shows that this nomenclature is becoming globally used. On the way to bringing regulatory legislation and processes to Ukraine's healthcare system to international standards, it is imperative to maximize the implementation of INHAND's practices in medical science and practice. In particular, approval by the regulatory authorities of our country of the Ukrainian equivalent of INHAND regulatory documents is necessary. In the field of pathomorphology, it is now highly urgent to modernize research in accordance with the recommendations of the INHAND working groups on apoptosis and necrosis, screening for endocrine disruptors and terminology interpretation as to nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse reproductive system. The international introduction and regular revision of INHAND documents will provide a solid basis for using their documents by pathologists and regulatory officers involved in the drugs safety assessment throughout the world. Execution of research in accordance with these documents will increase the level of international recognition of national scientific products and significantly reduce the costs of manufacturers of pharmaceutical industry of Ukraine in case of their entrance into the markets of North America, Europe and Japan.

Key words: harmonization, diagnostic criteria, terminology, pathomorphological research

Надійшла: 31 грудня 2018 р.

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

І. В. Сенюк, Т. О. Брюханова, Башар Джабар Аль Сахлані

Етіопатогенез хронічного запору та основні шляхи фармакологічної корекції

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: хронічний запор, проносні засоби, стеатогепатит, дисліпідемія, ендотоксин, Римські критерії

Запор або закреп (лат. *constipatio, obstipatio*) – це хронічна дисфункція кишечника, що характеризується більш тривалим (порівняно з індивідуальною фізіологічною нормою) інтервалом між актами дефекації та/або суб'єктивним відчуттям неповного випорожнення кишечника та/або зміною консистенції калових мас (найчастіше – збільшенням їхньої щільності). Обстипація є гетерогенною патологією й однією з найчастіших скарг серед пацієнтів загальнотерапевтичного та гастроентерологічного профілю [1–2].

Відповідно до даних офіційної статистики, приблизно 20 % населення індустріально розвинених країн страждають на запор, який виникає внаслідок порушень моторної функції кишечника. Важливо зазначити, що реальні цифри, ймовірно, значно вищі, оскільки кількість звернень до лікаря або провізора прямо корелює з соціокультурним рівнем населення. На користь цього припущення свідчить те, що в країнах Європи, США, Японії та Китаї частота звернень з приводу запору складає близько 30 %, у той час, як у країнах Південно-східної Азії не перевищує 5 %. Слід враховувати, що статистика не включає пацієнтів, що займаються самолікуванням [5].

Згідно з сучасними критеріями діагностики запору, виділяють первинні порушення (без органічної патології) та вторинні, які асоційовані зі структурними змінами шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Важливо також враховувати труднощі, що виникають за диференційної діагностики функціональних порушень кишечника, хронічного запору та

синдрому подразненого кишечника, які мають схожу клінічну картину та суб'єктивні скарги пацієнтів.

Запор може бути наслідком або симптомом низки патологічних процесів, зокрема: захворювань ендокринологічного профілю та метаболічних порушень: цукрового діабету, гіпотиреозу, гіперкальціємії, уремії; неврологічних захворювань: хвороби Паркінсона, пухлин і травм спинного мозку, наслідком психогенної анорексії, депресії; патологічних процесів тазового дна: ректоцеле, дизсинергії м'язів тазового дна; органічних патологічних процесів: поліпозу кишечника, стриктур, хвороби Гіршпрунга, ендометріозу; розвивається внаслідок прийому лікарських засобів (блокатори кальцієвих каналів, опіати, антациди, що містять алюміній, препарати заліза, транквілізатори, нестероїдні протизапальні засоби, антипсихотики та ін.) [2–3].

Натепер діагностичні критерії запору визначаються Римськими критеріями IV та, зокрема, включають: наявність твердих фекалій (за Бристольською шкалою – тип 1–2); необхідність натужування більше ніж у 25 % дефекацій; відчуття неповного випорожнення кишечника або перешкоди в прямій кишці та/або необхідність здійснення допоміжних дій за здійснення дефекації; кількість дефекацій менше 3 разів на тиждень [4].

Відповідно до Римських критеріїв IV, діагноз «хронічний запор» може бути встановлений у разі наявності та збереження двох і більше симптомів з перерахованих протягом 3 місяців і більше [4–5].

З етіологічної точки зору причини запорів можна поділити на первинні – які пов'язані зі зниженням перистальтики та порушенням транзиту калових мас у товстому кишечнику та прямій

кишці, та вторинні, які, переважно, є симптомом іншого основного захворювання.

Відповідно, запори можна розділити на органічні (обумовлені наявністю поза- або внутрішньокішечних захворювань) та функціональні. Зважаючи на різноманіття етіологічних причин органічних запорів, терапія насамперед має бути спрямована на корекцію основного захворювання [5–7].

Діагностування функціонального ідіопатичного запору можливе за умов виключення органічних патологічних процесів, змін характеру харчування та прийому низки лікарських засобів, що можуть провокувати виникнення констипації. Для клініциста важливо також виключити синдром подразненого кишечника з переважанням запорів, для якого характерний спастичний біль і скарги на різні за консистенцією фекалії (без прийому послаблюючих засобів) [6].

З огляду на патогенетичні особливості, хронічний ідіопатичний запор класифікують на «кологенний» і «проктогенний», що зумовлені порушенням транспорту калових мас у товстому кишечнику та їхньої евакуації з прямої кишки відповідно.

Залежно від типу порушень транзиту калових мас кологенний запор поділяють на декілька підтипів: інертний товстий кишечник – знижена скоротлива активність товстого кишечника на тлі нормальної активності аноректальної зони; затримка випорожнення – зниження скоротливої активності прямої кишки за збереженої моторної функції товстої кишки; дисинергічна дефекація: несинхронне скорочення сфінктерів, м'язів тазового дна з підвищенням внутрішньоочеревинного тиску [8].

Диференційна діагностика кологенного та проктогенного запорів є значно утрудненою, оскільки переважна більшість пацієнтів пред'являють скарги й на зниження частоти дефекацій (характерно для кологенного запору) і на порушення процесу дефекації (ознака проктогенного запору) [6].

Висока медико-соціальна значущість хронічного запору зумовлена не лише його значною поширеністю, але й асоціацією з метаболічними патологіями, серед

яких лідируючі позиції займають захворювання печінки (зокрема, неалкогольна жирова хвороба печінки), порушення ліпідного обміну й ожиріння.

Взаємозв'язок запорів з ураженнями печінки зумовлений формуванням у цієї категорії пацієнтів виразного дисбактеріозу, який є наслідком активного розмноження гнильних бактерій через затримку транзиту вмісту кишечника [9].

Як відомо, гнильна мікрофлора продукує ендотоксини, які здатні всмоктуватися крізь стінку ентероцитів і ворітною веною надходити до печінки. Це, у свою чергу, призводить до розвитку ендотоксемії та прозапального стану, який формується через активну продукцію прозапальних цитокінів і збільшення експресії рецепторів до медіаторів запалення під впливом ендотоксинів. Важливою ланкою патогенезу є також пригнічення функціонування ретикулоендотеліальної системи печінки за дії ендотоксинів, що супроводжується виснаженням антиоксидантної системи та прогресуванням окисного стресу. За таких умов відбувається активація Toll-подібних рецепторів у кишечнику, які стимулюються продуктами життєдіяльності гнильних бактерій. У цьому випадку активна продукція прозапальних молекул (у тому числі – у гепатоцитах) повинна розглядатися як захисна реакція організму для зменшення впливу ендотоксинів. Таким чином, за умов хронічного запору відбувається формування функціональних порушень гепатоцитів, що супроводжується поступовим розвитком стеатозу, який у подальшому трансформується на фіброз [10–12, 14].

Ураження печінки супроводжується формуванням порушень ліпідного обміну, що, зокрема, проявляється активною декон'югацією жовчних кислот (через порушення складу мікрофлори), які практично повністю реабсорбуються та надходять до печінки. Наслідком цього є пригнічення синтезу жовчних кислот *de novo*, відповідно значно зменшується використання холестеролу, який є попередником жовчних кислот. Це призводить до накопичення холестеролу в печінці, зважаючи на те, що пошкоджені гепатоцити не здатні син-

тезувати необхідну кількість ліпопротеїнів дуже низької щільності. Крім того, пригнічення антиоксидантного захисту призводить до активації перикисного окиснення ліпідів і ліпопротеїнів, що є важливим патогенетичним етапом проатерогенних змін [10, 13].

Підходи до корекції запору базуються на трьох основних складових: модифікації способу життя, зміні характеру харчування та застосуванні лікарських засобів [6].

Немедикаментозні методи корекції хронічного запору включають, перш за все, коригування аліментарної складової, зокрема, додавання рослинної клітковини. За даними ряду авторів, у певного числа пацієнтів з запорами застосування дієти з високим вмістом клітковини супроводжувалось здуттям живота та метеоризмом, але ці небажані ефекти можуть зменшуватися за умов градієнтного збільшення процентного вмісту клітковини в раціоні. Варто відмітити, що результати досліджень доцільності додавання клітковини мають низку методологічних недоліків, що унеможлиблює об'єктивну оцінку достовірності результатів [6, 15–17].

Не менш важливим фактором корекції запору є адекватна добова гідратація. У порівняльному клінічному дослідженні за участі 117 пацієнтів вивчали доцільність додавання до раціону 25 г клітковини або споживання води (1,5–2,0 л на добу) у поєднанні з клітковиною. У групі, що отримувала комбіновану корекцію, спостерігалось достовірне збільшення щотижневої кількості дефекацій, зменшення дози та кількості епізодів прийому проносних засобів [16–19].

Модифікація способу життя, перш за все, стосується усунення гіподинамії. У багатьох дослідженнях продемонстровано позитивний ефект збільшення фізичної активності щодо зменшення симптомів запору через зменшення часу, необхідного для транспорту вмісту кишечника [19–20].

У рандомізованому клінічному дослідженні збільшення фізичного навантаження в осіб з гіподинамією та хронічними запорами призводило до зменшення виразності симптомів, що підтверджувалось зменшенням актів дефекації,

що потребували натужування, або супроводжувались відчуттям неповного випорожнення кишечника. Необхідно зазначити, що достовірні результати досліджень (які відповідають вимогам GCP) щодо користі фізичної активності для корекції запорів на тепер відсутні [16, 18–20].

У випадку, коли немедикаментозні методи є недостатніми для корекції запору, згідно з діючими рекомендаціями щодо лікування запору, слід застосовувати фармакотерапію, яка включає застосування проносних засобів [19].

Виділяють декілька основних груп лікарських засобів, що застосовуються в схемах фармакологічної корекції запорів: баластні засоби – збільшують об'єм вмісту кишечника (висівки, клітковина, оболонки насіння подорожника); осмотичні проносні засоби – збільшують осмотичний тиск (лактuloза, макрогол, магнію сульфат, сорбітол, манітол); засоби, що викликають розм'якшення калових мас – рицинова та вазелінова олії, гліцерол; засоби подразнюючої дії – бісакодил, рицинова олія, пікосульфат натрію, похідні антрахінону; прокінетики – прукалоприд; секреторні проносні засоби – лубіпростон, лінаклотид [19].

Незважаючи на досить широкий асортимент проносних засобів, серед 68 % пацієнтів з хронічним запором, які їх застосовують, тільки в третині випадків вони задоволені результатом (за критеріями ефективності та безпечності) [21].

Фармакодинаміка баластних засобів полягає в збільшенні об'єму вмісту кишечника за рахунок надходження полісахаридів, що не абсорбуються, та за умов адекватного гідратування набухають, активуючи перистальтику [19, 22]. Засоби даної групи активують просування калових мас кишечником, полегшуючи випорожнення. Результати рандомізованих клінічних досліджень щодо оцінки ефективності оболонок насіння подорожника за хронічних запорів свідчать про достовірне збільшення, порівняно з плацебо, кількості актів дефекації, нормалізацію об'єму та консистенції фекалій, зменшення суб'єктивних скарг (біль, необхідність натужування тощо) та

скорочення кількості днів між актами дефекації. Систематичний огляд рандомізованих досліджень щодо вивчення порівняльної ефективності природних і синтетичних баластних засобів у терапії хронічного запору свідчить про достовірно більш високу ефективність засобів природного походження порівняно з метилцелюлозою та кальцію полікарбофілом [19, 22]. Протипоказаннями до застосування засобів, що збільшують об'єм вмісту кишечника, є інертна товста кишка та дизсинергічна дефекація. Важливою умовою ефективності даних засобів є споживання рідини не менше 1,5 л/добу. До особливостей фармакологічного профілю відноситься відтермінований клінічний ефект [19, 22–23].

Група осмотичних проносних засобів представлена речовинами, що містять іони або молекули, які не всмоктуються, що створює осмотичний градієнт, наслідком чого є затримка рідини в просвіті кишечника. Це супроводжується зміною консистенції фекалій, механічним розтягненням стінок кишечника за рахунок збільшення об'єму його вмісту, що загалом проявляється активацією моторної функції кишечника. У рандомізованих клінічних випробуваннях осмотичні проносні засоби за ефективністю достовірно перевищували плацебо [19, 23]. Аналіз Кохранівського систематичного огляду вказує на більш високу ефективність макроголу порівняно з лактулозою за наступними критеріями: щотижнева частота актів дефекації, консистенція фекалій, абдомінальний біль, потреба у включенні додаткових продуктів до раціону, що сприяють випорожненню кишечника [24]. Важливим критерієм безпечності осмотичних проносних засобів є їхнє епізодичне та/або короткотривале застосування, оскільки вони здатні провокувати розвиток дисбалансу електролітів й об'ємного перенавантаження, що може мати фатальні наслідки, особливо в пацієнтів з серцевою та нирковою недостатністю. Магнію сульфат, який також відноситься до осмотичних послаблюючих засобів, не досліджувався в клінічних випробуваннях, що унеможливило об'єктивну оцінку його ефективності та профілю безпеки [19].

Фармакодинаміка засобів, що викликають розм'якшення калових мас, полягає в зміні консистенції фекалій шляхом емульгування води, що знаходиться в порожнині кишечника, з масляною фазою. Незважаючи на досить добру переносимість, препарати цієї групи за тривалого застосування здатні провокувати розвиток гіповітамінозів жиророзчинних вітамінів і дефіцит незамінних жирних кислот, а також протипоказані під час вагітності та лактації, у пацієнтів з ризиком аспірації. Таким чином, застосування цих засобів є досить обмеженим [19].

Механізм дії контактних проносних засобів базується на взаємодії активних молекул (утворюються внаслідок гідролізу мікрофлорою глікозидів, які входять до складу препарату та не абсорбуються, – для пікосульфату натрію) з рецепторами ентероцитів, що супроводжується активацією перистальтики [23]. Систематичні огляди рандомізованих клінічних досліджень бісакодилу та пікосульфату натрію порівняно з плацебо свідчать про їхню достовірну ефективність. Профіль безпеки є досить сприятливим за умов дотримання рекомендацій до застосування, оскільки в разі збільшення терапевтичної дози спостерігалися діарея, абдомінальний біль, відчуття розпирання в черевній порожнині, спрага, блювання, запаморочення, гіпонатріємія та уролітіаз. Особливості механізму дії пікосульфату натрію обмежують його застосування в дітей і пацієнтів з дисбактеріозом, що пов'язано з порушенням перетворення його на активний метаболіт [23, 25–26].

Тривалу історію застосування мають антраглікозидовмісні препарати – на основі рослинної сировини сенни та крушини. У товстому кишечнику антраглікозиди розщеплюються кишковими бактеріями на антрони та антраноли, які подразнюють інтерорецептори товстої кишки та посилюють її перистальтику. Крім того, антрони та антраноли перешкоджають всмоктуванню води та електролітів, сприяють дифузії води в просвіт кишечника. При цьому збільшується об'єм калових мас, підвищується тиск наповнення, що сприяє стимуляції перистальтики. У низці

досліджень доведено, що за регулярно-го застосування фітопрепаратів, які містять антраглікозиди, розвиваються дегенеративні зміни іннервації товстої кишки, що призводить до обтяження перебігу запору та необхідності збільшення дози препаратів. Крім того, рослинні антраглікозиди проявляють мутагенний і генотоксичний вплив (доведений кореляційний зв'язок між тривалим застосуванням антраглікозидів і збільшенням ризику розвитку колоректального раку і карциноми сечового міхура), здатні провокувати розвиток дисбалансу іонів, зокрема, натрію та калію. Останнє компенсаторно супроводжується збільшенням продукції реніну й альдостерону, що призводить до активного виведення калію. Відповідно це може призводити до розвитку фатальних аритмій у пацієнтів з кардіоваскулярною патологією. Антраглікозиди також збільшують продукцію нітроген (II) оксиду, який знижує тонус кишечника. Автори систематичних оглядів щодо вивчення подразнюючих проносних засобів дійшли висновку про недостатню кількість досліджень, що підтверджують ефективність і безпеку застосування препаратів цієї групи, тому натепер вони не можуть бути рекомендовані до включення в міжнародні гайдлайни з лікування хронічного запору [19, 27].

Прукалоприд – селективний високоафінний агоніст 5-HT₄ серотонінових рецепторів належить до проносних засобів-прокінетиків, який стимулює моторику практично всіх відділів ШКТ (евакуаторну функцію шлунка та пасаж вмісту тонкого й товстого кишечника). Результати декількох рандомізованих досліджень свідчать, що в дозах 2 і 4 мг на добу прукралоприд достовірно збільшував частоту актів дефекації в пацієнтів з хронічним запором. У ході досліджень не було виявлено серйозних побічних реакцій, проте даних для прогнозів щодо довгострокової безпеки та ефективності натепер накопичено недостатньо [23]. Сьогодні Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) та Національний інститут з питань охорони здоров'я та медичної допомоги (The National Institute for Health and

Care Excellence) рекомендує застосування прукралоприду для лікування хронічного запору в жінок (> 18 років) як альтернативного методу терапії за умов неефективності інших препаратів [28].

До групи секреторних проносних засобів входять два препарати – лубіпростон і лінаклотид. Лубіпростон є селективним активатором хлорних каналів типу ClC-2 на апікальній мембрані ентероцитів, стимуляція яких супроводжується активною секрецією в просвіт кишечника рідини з розчиненими в ній хлоридами. Наслідком цього є розм'якшення калових мас і стимуляція перистальтики. Клінічні дослідження лубіпростону свідчать про його достовірно більш високу ефективність порівняно з плацебо, проте й достовірно більшу частоту розвитку нудоти, діареї, головного болю [23, 29].

Лінаклотид – пептидний агоніст рецепторів гуанілатциклази-С на поверхні ентероцитів, активація яких супроводжується активацією регулятора трансмембранної провідності за муковісцидозу (CFTR), що призводить до збільшення секреції хлоридів у розчиненому стані та бікарбонатів у просвіт кишечника, внаслідок чого відбувається зменшення щільності калових мас і стимуляція перистальтики. Лубіпростон і лінаклотид схвалені до застосування FDA, проте не включені до Європейських рекомендацій з лікування хронічного запору (за винятком лінаклотиду, який рекомендований у деяких випадках синдрому подразненого кишечника з запорами) [19].

Висновок

Таким чином, значна поширеність хронічних функціональних запорів, їхня асоціація з низкою патологічних процесів, зокрема, захворюваннями печінки та порушеннями обміну ліпідів свідчить про високу медико-соціальну значущість даної патології. Незважаючи на досить широкий арсенал проносних засобів, проблема фармакотерапії обстипації залишається актуальною, що свідчить про перспективність подальшого пошуку та дослідження препаратів для лікування запорів.

1. Stern T. Evaluation and treatment of patients with constipation / T. Stern, A. M. Davis // *Jama*. – 2016. – V. 315, № 2. – P. 192–193.
2. Wald A. Constipation: advances in diagnosis and treatment / A. Wald // *Jama*. – 2016. – V. 315, № 2. – P. 185–191.
3. Chronic constipation diagnosis and treatment evaluation: the «CHRO. CO. DI. TE» study / P. Bellini, M. Usai-Satta, A. Bove, R. Bocchini [et al.] // *BMC gastroenterology*. – 2017. – V. 17, № 1. – P. 11.
4. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria / C. W. Sobrado, I. J. F. C. Neto, R. A. Pinto [et al.] // *Journal of coloproctology*. – 2018. – V. 38, № 2. – P. 137–144.
5. Платошкин Э. Н. Функциональный запор (Сообщение 1: эпидемиология и диагностика) (обзор литературы) / Э. Н. Платошкин, С. А. Шут // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2013. – № 4 (38). – С. 63–66.
6. Wald A. Management of chronic constipation in adults / A. Wald, N. Talley // *J. Up To-Date*, Waltham, MA, 2017.
7. Two Etiological Reasons of Constipation: Anterior Rectocele and Internal Mucosal Intussusception / M. A. Bozkurt, A. Kocataş, M. Karabulut [et al.] // *Indian Journal of Surgery*. – 2015. – V. 77, № 3. – P. 868–871.
8. Вялов С. С. Хронический запор: этиология и возможности терапии / С. С. Вялов // *Доктор. Ру*. – 2015. – № 12. – С. 42–49.
9. Łokieć K. Estimation of small intestinal bacterial overgrowth in patients with constipation and diarrhea irritable bowel syndrome / K. Łokieć, G. Klupińska, E. Walecka-Kapica // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2014. – V. 36, № 215. – P. 307–310.
10. Успенский Ю. П. Стеатогепатит, функциональный запор, дислипидемия: от патогенетической сопряженности к лечению / Ю. П. Успенский, Е. В. Балукова, Н. В. Барышникова // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2011. – № 1. – С. 105–111.
11. Кучерявый Ю. А. Эпидемиологическая и патофизиологическая ассоциация неалкогольного стеатогепатита и функционального запора. Возможно ли избежать полипрагмазии в практике гастроэнтеролога? / Ю. А. Кучерявый, Е. А. Маевская // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. – 2016. – № 1–2. – С. 6–10.
12. Vajro P. Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease / P. Vajro, G. Paoletta, A. Fasano // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2013. – V. 56. – P. 461–468.
13. Петухов В. А. Нарушение функций печени и дисбиоз при липидном дистресс-синдроме Савельева и их коррекция пробиотиком Хилак-форте / В. А. Петухов // *PMЖ*. – 2002. – Т. 10, № 4. – С. 77–89.
14. Shanab A. A. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8 / A. A. Shanab, P. Scully, O. Crosbie // *Dig. Dis. Sci.* – 2011. – V. 56, № 5. – P. 1524–1534.
15. Improvement of functional constipation with kiwi fruit intake in a Mediterranean patient population: an open non-controlled and non-randomized longitudinal study / O. Cunillera, J. Almeda, J. J. Mascort [et al.] // *Rev Esp Nutr Hum Diet.* – 2015. – V. 19. – P. 58–67.
16. Eswaran S. Fiber and functional gastrointestinal disorders / S. Eswaran, J. Muir, W. D. Chey // *Am J Gastroenterol.* – 2013. – V. 108. – P. 718–725.
17. Breath methane in functional constipation: response to treatment with Ispaghula husk / A. B. Vega, A. Perelló, L. Martos [et al.] // *Neurogastroenterol Motil.* – 2015. – V. 27. – P. 945–953.
18. McRorie J. W. Jr. Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 2: What to look for and how to recommend an effective fiber therapy / J. W. Jr. McRorie // *Nutr Today*. – 2015. – V. 50. – P. 90–97.
19. Clinical practice guidelines for the management of constipation in adults. Part 2: Diagnosis and treatment / J. Serra, J. Mascort-Roca, M. Marzo-Castillejo [et al.] // *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*. – 2017. – V. 40, № 4. – P. 303–316.
20. Colon transit time according to physical activity level in adults / B. K. Song, K. O. Cho, Y. Jo [et al.] // *J Neurogastroenterol Motil.* – 2012. – V. 18. – P. 64–79.
21. Consensus statement AIGO/SICCR: diagnosis and treatment of chronic constipation and obstructed defecation (part I: diagnosis) / A. Bove, F. Pucciani, M. Bellini [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2012. – V. 18. – P. 1555–1564.
22. Suares N. C. Systematic review: the effects of fibre in the management of chronic idiopathic constipation / N. C. Suares, A. C. Ford // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2011. – V. 33. – P. 895–901.
23. Task force on the management of functional bowel disorders. American College of Gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation / A. C. Ford, P. Moayyedi, B. E. Lacy // *Am J Gastroenterol.* – 2014. – V. 109. – P. S2–26.
24. Lactulose versus polyethylene glycol for chronic constipation / H. Lee-Robichaud, K. Thomas, J. Morgan, R. L. Nelson // *Cochrane Database Syst Rev*. 2010:CD007570.
25. Oral bisacodyl is effective and well-tolerated in patients with chronic constipation / M. A. Kamm, S. Mueller-Lissner, A. Wald [et al.] // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – V. 9. – P. 577–583.

-
26. Multicenter, 4-week, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of sodium picosulfate in patients with chronic constipation / S. Mueller-Lissner, M. A. Kamm, A. Wald [et al.] // *Am J Gastroenterol.* – 2010. – V. 105. – P. 897–903.
 27. Лузина Е. В. Безопасность использования слабительных средств / Е. В. Лузина // *Российский медицинский журнал.* – 2014. – № 5. – С. 41–44.
 28. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Prucalopride for the treatment of chronic constipation in women. NICE technology appraisal guidance 211. Manchester: NHS, NICE; 2010. December, NICE // <http://guidance.nice.org.uk/>
 29. Long-term safety and effectiveness of lubiprostone, a chloride channel (ClC-2) activator, in patients with chronic idiopathic constipation / A. J. Lembo, J. F. Johanson, H. P. Parkman [et al.] // *Dig Dis Sci.* – 2011. – V. 56. – P. 2639–2645.

І. В. Сенюк, Т. О. Брюханова, Башар Джабар Аль Сахлани

Етіопатогенез хронічного запору та основні шляхи фармакологічної корекції

Огляд літератури узагальнює сучасні дані щодо етіології, патогенезу, епідеміології та диференціальної діагностики хронічного функціонального запору. Висока медико-соціальна значущість даного захворювання зумовлена не лише значною поширеністю в популяції, але й асоціацією з низкою патологічних процесів, зокрема, гепатобіліарної системи та ліпідного обміну. Одним з тригерних факторів взаємозв'язку запорів і уражень печінки є формування виразного дисбактеріозу, який супроводжується хронічним прозапальним станом внаслідок продукції ендотоксинів, активацією Toll-подібних рецепторів, пригніченням антиоксидантної системи та порушеннями метаболізму ліпідів, результатом чого є розвиток стеатогепатиту.

Сучасні підходи до корекції хронічного запору включають модифікацію дієти та фізичної активності, застосування проносних засобів. Натепер відсутні дані клінічних досліджень, що підтверджують ефективність немедикаментозних методів за хронічного запору. Систематичні огляди рандомізованих клінічних досліджень свідчать про те, що баластні та осмотичні проносні засоби (крім магнію сульфату) виявляють достовірно більш високу ефективність порівняно з плацебо та мають досить сприятливий профіль безпеки. Прукалоприд і секреторні проносні засоби з позицій доказової медицини мають високу ефективність, але даних щодо їхньої переносимості накопичено сьогодні недостатньо. Похідні антраглікозидів можуть рекомендуватися тільки для епізодичного застосування внаслідок розвитку звикання та низки небажаних побічних реакцій. Засоби, що викликають розм'якшення калових мас, можуть провокувати розвиток гіповітамінозів жиророзчинних вітамінів і знижувати якість життя хворих, що обмежує їхнє застосування. Важливо відмітити, що незважаючи на широкий арсенал проносних засобів тільки третина пацієнтів задоволена результатом з точки зору ефективності та безпечності. Зазначене свідчить про перспективність подальшого дослідження лікарських засобів для терапії хронічного функціонального запору.

Ключові слова: хронічний запор, проносні засоби, стеатогепатит, дисліпідемія, ендотоксин, Римські критерії

И. В. Сенюк, Т. А. Брюханова, Башар Джабар Аль Сахлани

Этиопатогенез хронического запора и основные пути фармакологической коррекции

Обзор литературы обобщает современные данные об этиологии, патогенезе, эпидемиологии и дифференциальной диагностике хронического функционального запора. Высокая медико-социальная значимость данного заболевания обусловлена не только значительным распространением в популяции, но и ассоциацией с патологическими процессами, в частности, гепатобилиарной системы и нарушениями липидного обмена. Одним из триггерных факторов взаимосвязи запоров и патологии печени является формирование дисбактериоза, который сопровождается хроническим провоспалительным состоянием вследствие продукции эндотоксинов, активацией Toll-подобных рецепторов, угнетением антиоксидантной системы и нарушениями метаболизма липидов, результатом чего является развитие стеатогепатита.

Современные подходы к коррекции хронического запора включают модификацию диеты, физической активности и применение слабительных средств. В настоящее время отсутствуют данные клинических исследований, подтверждающие эффективность немедикаментозных методов при хроническом запоре. Систематические обзоры рандомизированных клинических исследований свидетельствуют о том, что балластные и осмотические слабительные средства (кроме магния сульфата) демонстрируют достоверно более высокую эффективность по сравнению с плацебо и имеют достаточно благоприятный профиль безопасности. Прукалоприд и секреторные слабительные средства с позиций доказательной медицины проявляют высокую эффективность, но данных о переносимости накоплено на сегодняшний день недостаточно. Производные антраглицозидов могут рекомендоваться только для эпизодического применения вследствие развития привыкания и ряда нежелательных побочных реакций. Средства, вызывающие размягчение каловых масс, могут провоцировать развитие гиповитаминозов жирорастворимых витаминов и снижать качество жизни больных, что ограничивает их применение. Важно отметить, что несмотря на широкий

арсенал слабительных средств, только треть пациентов удовлетворена результатом с точки зрения эффективности и безопасности. Это свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования лекарственных средств для терапии хронического функционального запора.

Ключевые слова: хронический запор, слабительные средства, стеатогепатит, дислипидемия, эндотоксин, Римские критерии

I. V. Senyuk, T. O. Briukhanova, Bashar Jabar Al-Sahlan

Etiopathogenesis of chronic constipation and common approaches to pharmacological correction

The current review summarizes modern data on etiology, pathogenesis, epidemiology and differential diagnosis of chronic functional constipation. Significant medical and social importance of this disease is due to its dramatic prevalence in the population. Moreover, chronic constipation is also associated with metabolic pathologies, in particular, of hepatobiliary system and lipid metabolism. Dysbiosis is one of the trigger factors of constipation and liver damage comorbidity, which is accompanied by a chronic pro-inflammatory process caused by endotoxins production, activation of Toll-like receptors, inhibition of the antioxidant system, and lipid metabolism disorders, which result in the development of steatohepatitis.

Modern approaches to chronic constipation correction include modification of diet, physical activity and laxatives intake. Currently, there are no data from clinical trials confirming the effectiveness of non-drug methods for chronic constipation treatment. Systematic review of randomized clinical trials suggests that ballast and osmotic laxatives (except magnesium sulfate) are significantly more effective than placebo and have favorable safety profile. In accordance to the evidence-based medicine principles, prukaloprid and secretory laxatives have high efficacy, but on this moment there are not enough data about their tolerability. Derivatives of antraglycosides may be recommended only for episodic use because of addiction development and wide range of side effects. Stool softener medications may provoke fat-soluble vitamins hypovitaminosis and reduce patients' quality of life, that limits their use. It is important to note that despite a wide arsenal of laxatives, only a third part of patients are satisfied with the treatment result in terms of effectiveness and safety. The information mentioned above indicates the prospect of further research of medicines for the chronic functional constipation treatment.

Key words: chronic constipation, laxatives, steatohepatitis, dyslipidemia, endotoxin, Rome criteria

Надійшла: 9 січня 2019 р.

Контактна особа: Брюханова Тетяна Олександрівна, кандидат біологічних наук, науково-дослідний відділ з клінічної роботи, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Куликівська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 50 211 21 11.
Електронна пошта: tatiana.briukhanova@gmail.com

Е. В. Супрун¹, І. В. Кабачна¹, В. І. Кабачний¹,
А. В. Абрамов², Н. В. Бухтіярова²

Модуляція процесів нейроапоптозу в щурів після кетамінового та пропофолового наркозів під впливом Гетерозиду

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: Кетамін, Пропофол, нейропротекція, апоптоз, *c-fos*-позитивні клітини, *bcl-2*-білок

Мільйони пацієнтів щорічно звертаються до хірургів і піддаються впливу загальних анестетиків (ЗА) під час проведення діагностичних процедур і хірургічних втручань. Раніше вважалося, що ефекти анестезії швидко виникають і так само швидко зникають, тому після видалення анестетиків з організму головний мозок повертається до передопераційного стану й пацієнт пробуджується, отже негативні ефекти ЗА на центральну нервову систему (ЦНС) у віддаленому постнаркозному періоді відсутні. Однак останніми роками з накопиченням даних епідеміологічних й експериментальних досліджень з впливу ЗА на головний мозок стало очевидним, що центральні анестетики крім основної анальгезуючої та гіпногенної дії викликають перманентні ішемічно/гіпоксичні нейрональні та неврологічні зміни, низку побічних нейротоксичних ефектів шляхом запуску запрограмованої загибелі нейронів – апоптозу [1]. Показано, що на частоту та тяжкість побічної дії наркозу на ЦНС впливають доза анестетиків і тривалість загальної анестезії [2, 3]. Ранньою маніфестацією нейронального uszkodження, зумовленого ЗА, є порушення вищих коркових функцій, у першу чергу, пам'яті та когнітивних процесів, розвиток післяопераційної когнітивної дисфункції (ПОКД, *postoperative cognitive dysfunction*) [4]. Найуразливішими до дії ЗА є функція уваги, короткострокова пам'ять, швидкість психомоторних і когнітивних реакцій. Разом з тим у

літературі лише деякі роботи присвячені застосуванню нейропротективних препаратів для профілактики та лікування нейрокогнітивних розладів у післяопераційному періоді [5, 6].

Профілактична нейропротективна терапія, поряд з вибором адекватного варіанту анестезії, своєчасною корекцією порушень гемодинаміки, газообміну та гомеостазу, набуває найважливішого значення для запобігання ушкоджень нейронів або усунення когнітивної дисфункції, яка вже виникла в ранньому післяопераційному періоді, коли ці зміни ще є потенційно зворотними [7]. Впливаючи на церебральний метаболізм, вона попереджає або перериває патологічні каскади, що викликають дисфункцію або загибель нейронів. Для отримання максимального протективного ефекту щодо ішемічно/гіпоксичних ушкоджень тканин головного мозку, у тому числі під час ЗА, необхідно домогтися переривання патогенетичного постгіпоксичного каскаду на більш ранніх етапах, у тому числі на етапі активації некрозо/апоптотичних процесів у зонах ішемічно/гіпоксичних пошкоджень тканин [8].

З метою поліпшення анестезіологічної безпеки під час оперативних втручань перспективним напрямом також може бути розширення асортименту засобів первинної та вторинної нейропротекції шляхом цілеспрямованого синтезу потенційних нейропротекторів з аналептичною дією, що діють на ті самі структури, які остаточно пригнічені самим центральним анестетиком або його активними метаболітами [5]. У зв'язку з цим обґрунтованим і перспективним є пошук серед похідних сірко- та

нітрогеновмісних гетероциклів (гетерозидів) універсальних, нешкідливих нейропротекторів з аналептичною дією, які здатні швидко й ефективно прискорювати реанімацію життєвоважливих функцій організму, загальну детоксикацію, переривати наркоз, вирішувати одразу широкий спектр медико-соціальних проблем невідкладних станів [9].

Обґрунтованим може стати застосування нейротрофічного церебропротектора Цереброкуруину (нейропептидвміщуючий препарат нового покоління, отриманий з ембріонів великої рогатої худоби) [10]. Також як перспективний ноотроп для корекції післяопераційної когнітивно-мнестичної дисфункції можна розглядати Ноопепт, нейропротекторна дія якого має комплексний механізм, здатний протидіяти глутаматній ексайтотоксичності за ішемії головного мозку, тривалих впливах стресових факторів, розумовому й емоційному перенапруженні, інтоксикаціях [10].

Мета дослідження – порівняти нейропротективну активність Гетерозиду і референс-препаратів Цереброкуруину та Ноопепту за умов експериментального наркозу Кетаміном і Пропофолом за впливом на вміст у тканинах головного мозку щурів проапоптотичного білка c-Fos й антиапоптотичного bcl-2-білка.

Матеріали та методи. У досліджах використовували білих безпородних щурів масою 180–200 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях» та Європейської конвенції «Про захист тварин, що використовуються для наукових та інших цілей». Тварин утримували на стандартному раціоні віварію за природної зміни дня та ночі. Доступ тварин до води був вільним. Усі маніпуляції, які можуть завдати болю, проведені під етамінал-натрієвим наркозом. Комітетом з біоетики НФаУ (протокол від 17 травня 2017 р. № 5/1) встановлено, що проведені дослідження не суперечать загальноприйнятим біо-

етичним нормам з дотримання відповідних міжнародних рекомендацій стосовно проведення експериментальних досліджень.

Оригінальне похідне сірко- та нітрогеновмісних гетероциклів Гетерозид (2 R, 5-(1,3-тіазоліл) амід етилендикарбонової кислоти натрієва сіль) було синтезовано на кафедрі фізичної та колоїдної хімії Національного фармацевтичного університету (лабораторний зразок), визначено ED₅₀ за аналептичною активністю на рівні 2 мг/кг і LD₅₀ експрес-методом Т. В. Пастушенко – 1350 мг/кг, що за класифікацією Hodge та Sterner дозволило віднести її до IV класу малотоксичних речовин [11].

Дослідження проведено на 90 білих безпородних щурах віком 6 міс., масою 220–290 г. Кетамінову та пропофову анестезії проводили шляхом уведення 100 мг/кг відповідно Кетаміну/Пропофолу внутрішньоочеревинно (в/о). Після виходу тварин з наркозу їм одноразово вводили: Гетерозид – в/о 2 мг/кг, Цереброкуруин (ТОВ «НІР», Україна) – в/о 0,2 мг/кг, Ноопепт (ЗАТ «Мастерклон», вироблено ВАТ «Щолківський вітамінний завод») – інтраназально 10 мкг/кг. Тварини були розподілені на 9 груп по десять тварин у кожній. Перша група – інтактні тварини (контроль), друга та третя – тварини з експериментальним наркозом Кетаміном/Пропофолом (контрольна патологія – КП), четверта та п'ята – тварини з наркозом, яким вводили Гетерозид (група КП + Гетерозид); з шостої по дев'яту – тварини з наркозом, яким вводили Цереброкуруин (група КП + Цереброкуруин) або Ноопепт (група КП + Ноопепт). Інтактна група отримувала одноразово в/о фізіологічний розчин, 1 мл на 100 г ваги, а контрольна група після введення Кетаміну/Пропофолу одноразово – в/о фізіологічний розчин в аналогічному дозуванні. Тварин виводили з експерименту через 48 год після проведення наркозу.

Для проведення гістоімунохімічних досліджень головний мозок тварин розміщали у фіксаторі Буена (18 год), і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парапласт. На ротаційному мікротомі виготовлялися

15-мікронні зрізи гіпокампа, які депарафінували за стандартною методикою. Для виявлення експресії c-fos в CA1 зоні гіпокампа використовували імуногістохімічний метод непрямой імунофлюоресценції. Спершу на зрізи наносили первинні антитіла до білка c-fos (Sigma Chemical, USA), інкубували за + 400 °C 24 год і після інкубації зрізи тричі промивали 0,1 моль/л фосфатним буфером pH 7,4. Потім на зразки наносили вторинні антитіла (флюоресцент кон'югований козячий IgG) (Sigma Chemical, USA), інкубували за кімнатної температури 60 хв і після інкубації зрізи промивали 0,1 моль/л фосфатним буфером. Fos-імунопозитивні нейрони CA1 зони гіпокампа досліджували на флюоресцентному мікроскопі Axioskop (Zeiss, Germany) – зображення, одержані на мікроскопі, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS.

Концентрацію bcl-2 у цитоплазматичній фракції головного мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу. Білки розділяли в 10 % поліакриламідному гелі. Поділ білкових фракцій проводили шляхом електрофорезу – для ущільнення гелю за напруги 100 V, коли проби досягали межі розділу гелів за напруги 200 V і до того часу, доки проби не досягнуть закінчення гелю. Білки з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за напруги 100 V і сили струму 0,35 A протягом 1 год. Після перенесення мембрану поміщали в блокуючий буфер, що містив 1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну (Sigma, USA, кат. № A2153) на 20 год. Відмиту на шейкері протягом 5 хв у розчині 0,1 моль/л фосфатного буферу pH 7,4 мембрану поміщали в розчин первинних антитіл проти bcl-2 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), інкубували 2 год за кімнатної температури та відмивали на шейкері 4 рази по 5 хв у 0,1 моль/л фосфатному буфері. Після цього мембрану поміщали в розчин вторинних антитіл (1:1000) (біотинильований анти-мишачий IgG, Sigma, USA, кат. № 051M4885), інкубували 2 год і відмивали на шейкері

4 рази по 5 хв у розчині 0,1 моль/л фосфатного буфера. Поміщали мембрану в розчин ExtrAvidin-пероксидази (Sigma, USA, кат. № 051M4885) у 1 % розчині бичачого сироваткового альбуміну (1:1000), інкубували 1 год і промивали. Для візуалізації мембрану обробляли розчином АЕК: 1 таблетка 3-аміно-9-етилкарбазолу (Sigma, USA, кат. № a6926), розчинена в 2,5 мл ДМФА, що містить 47,5 мл 0,05 моль/л ацетатного буфера, pH 5,0, 25мкл 30 % H₂O₂. Мембрану інкубували в субстратній суміші 5–10 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло в блоті. Мембрану промивали в дистильованій воді кілька разів. Висушували смужки між листами фільтрувального паперу під потоком холодного повітря. Детекцію bcl-2 здійснювали за допомогою денситометрії за програмою Adobe Photoshop.

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

Результати та їх обговорення. Натепер є загально визнаним, що ключовий фактор патогенезу захворювань нервової системи – загибель нейрона – може бути двох видів: програмована клітинна смерть (апоптоз) і патологічна клітинна смерть (некроз). Механізми загибелі нервової клітини за нейродегенеративних захворювань реалізуються

переважно за механізмом апоптозу, а в разі гострих захворювань і ушкоджень нервової системи – в основному за шляхом некрозу. Апоптоз як програмований процес клітинної загибелі знищує приблизно половину всіх нейронів, що утворилися в період нейрогенезу, зберігаючи нейрони, що мають важливі функціональні зв'язки з іншими нейронами. Основний процес нейронального некрозу має місце в період загибелі клітин навіть протягом кількох наступних днів після ішемічного ушкодження. Отже, корекція активності процесу апоптозу має розглядатися як нейропротекторна стратегія.

Результати дослідження підтверджують активацію процесів апоптозу в тканині мозку в умовах експериментальної анестезії (табл. 1).

У СА1 зоні гіпокампа мозку щурів контрольної групи на моделі кетамінового наркозу відзначено зростання експресії c-fos (c-fos-позитивних клітин) практично в 10 разів ($p < 0,01$), що відображає прогресуючу активацію апоптотичних процесів у ранньому постнаркозному періоді. У головному мозку щурів групи Кетамін + Гетерозид відзначено зниженням вмісту c-fos-позитивних клітин уже в гострому постішемічному періоді на 38 % відносно контрольної групи ($p < 0,05$), що відображає стабілізацію апоптотичних процесів. За кетамінового наркозу та введення експериментальним щурам Цереброкуруину та Ноопепту також відзначено зниження c-fos-позитивних

клітин відповідно на 19 і 6 % порівняно з контрольною групою в ранньому постнаркозному періоді.

На моделі наркозу Пропофолом вміст c-Fos-позитивних клітин у головному мозку щурів є подібним до кетамінової анестезії – підвищення значень у тварин контрольної групи в 7 разів ($p < 0,01$). Максимальний стабілізуючий вплив на рівень білка c-fos-позитивних клітин виявив Гетерозид (зниження на 29 %, $p < 0,05$). У групах Цереброкуруину та Ноопепту вміст c-fos-позитивних клітин виявився достовірно нижчим відносно контрольних показників відповідно на 22 і 20 %.

В умовах експериментального наркозу також виявлено зміни активності антиапоптотичного bcl-2-білка (табл. 2).

У контрольній групі щурів з кетаміновим наркозом відмічено зниження рівнів білка bcl-2 відносно групи інтакту на 48 %, що відображає переважання процесів некрозу нейронів у гострій стадії постнаркозних нейрональних змін. За введення Гетерозиду вміст bcl-2-білка досяг 78 % від рівня інтакту, що на 49 % перевищує показник контрольної патології. Введення Цереброкуруину в постнаркозному періоді більш позитивно вплинуло на вміст білка bcl-2, рівень якого був вищий за контрольні показники на 71 % ($p < 0,01$). У групі Ноопепту відновлення рівня bcl-2-позитивних клітин у постнаркозному періоді не виявлено.

На моделі пропофолового наркозу відзначено значне зниження рівня білка

Таблиця 1

Щільність c-fos-позитивних клітин у головному мозку щурів з наркозом Кетаміном і Пропофолом за впливу Гетерозиду, Цереброкуруину та Ноопепту ($M \pm m$, $n = 10$)

	Щільність c-fos позитивних клітин, у. о.	
	Кетамін	Пропофол
Інтактні тварини	12,5 $\pm$ 2,1	12,5 $\pm$ 2,1
Контроль – тварини з наркозом Кетаміном/Пропофолом	124,6 $\pm$ 5,0*	90,3 $\pm$ 2,1*
Тварини з наркозом + Гетерозид	77,5 $\pm$ 3,3* ^{к,ц,н}	64,9 $\pm$ 3,2* ^{к,н}
Тварини з наркозом + Цереброкуруин	101,1 $\pm$ 5,2* ^к	70,2 $\pm$ 2,3* ^к
Тварини з наркозом + Ноопепт	117,5 $\pm$ 4,3*	72,1 $\pm$ 3,1* ^к

Примітки. Тут і в табл. 2: *достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно інтактних тварин, ^кдостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи контролю, ^цдостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Цереброкуруину, ^ндостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Ноопепту, n – кількість тварин у групі.

**Концентрація bcl-2-білка в головному мозку щурів з наркозом
Кетаміном і Пропофолом за впливу Гетерозиду, Цереброкурини
та Ноопепту ($M \pm m, n = 10$)**

	Концентрація bcl-2-білка, у. о.	
	Кетамін	Пропофол
Інтактні тварини	45,0 $\pm$ 2,5	45,0 $\pm$ 2,5
Контроль – тварини з наркозом Кетаміном/Пропофолом	23,5 $\pm$ 1,4*	27,1 $\pm$ 2,0*
Тварини з наркозом + Гетерозид	35,0 $\pm$ 2,4*, ^{К,Н}	47,6 $\pm$ 3,7 ^{К,Н}
Тварини з наркозом + Цереброкурин	40,2 $\pm$ 2,4*, ^{К,Н}	45,3 $\pm$ 2,6 ^{К,Н}
Тварини з наркозом + Ноопепт	24,4 $\pm$ 2,7*	36,3 $\pm$ 1,6*, ^К

bcl-2 відносно групи інтакту – на 40 %, яке практично повністю коригується Гетерозидом і Цереброкурином відповідно 105 і 101 % порівняно з групою інтактних тварин. Уведення експериментальним тваринам Ноопепту також позитивно впливає на експресію bcl-2-білка – підвищує його вміст на 34 % відносно контрольних показників.

Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що на моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів відтворено нейродеструктивні зміни тканини мозку внаслідок ішемічного постнаркозного ушкодження, які супроводжувались активізацією процесів апоптозу (зростанням кількості c-fos-позитивних клітин, зниженням вмісту bcl-2-білка) і мали відмінності на цих експериментальних моделях.

Для дії ЗА на мозок людини характерно те, що вони мають численні мішені дії (різні відділи головного мозку, спинний мозок); дія визначається фізико-хімічними властивостями агента; різні клінічні ефекти досягаються дією на різні мішені. Досліджені препарати для наркозу мають різний механізм дії – Пропофол потенціює ГАМК-ергічні механізми нейротрансмісії в ЦНС, а Кетамін пригнічує активацію NMDA-рецепторів.

Перші вказівки на те, що крім можливих позитивних ефектів Кетамін як неконкурентний антагоніст фенілциклідинового (PCP) рецептора NMDA рецепторного комплексу може викликати патологічні зміни в ЦНС, з'явилися на основі спостережень, коли підшкірне введення PCP дорослим

щурам викликало цитопатологічні зміни (вакуолізацію цитоплазми нейронів) у цереброкортикальних нейронах [12]. У цьому дослідженні вказані ефекти визначалися протягом 2 год після застосування препарату, а морфологія нейронів відновлювалася до нормального стану, якщо застосовувалася тільки одноразова доза PCP. Також Кетамін симулював ефект PCP за підшкірного введення в дозі 40 мг/кг, хоча більш низькі дози не викликали вакуолярну дегенерацію нейронів [12]. Анестезія Кетаміном у вагітних щурів може збільшити частоту автофагії та апоптозу в гіпокампі плода, і механізм може полягати в пригніченні антиоксидантної активності та накопиченні АФК [13]. Доведено, що PCP-індукована рання експресія генів, у тому числі c-fos, може бути основою поведінкових і/або психотоміметичних ефектів PCP й швидким і чутливим індикатором нелетальних ушкоджень нейронів. Ці дані було підтверджено в приматів: Кетамін викликав значну загибель нейронів у корі головного мозку плодів макак-резус, коли матерям протягом 24 год застосовували цей анестетик [14]. Подальші експерименти показали, що навіть відносно помірною дозою Кетаміну (анестетична або субанестетична – 40 і 10 мг/кг відповідно) може запустити апоптоз у головному мозку мишей, які розвиваються [15]. Також доведено, що Кетамін індукує виражену експресію c-Fos у задній поясній звивині та ретроспленіальному кортикальному шарі, у цьому разі кетамін-індукована експресія c-Fos опосередкована не тільки

NMDA-рецепторами, але також сигма-рецепторами [16]. Фізіологічний і кетамін-індукований апоптоз мають подібні паттерни розвитку, але характер ламінування та залежна від типу клітин уразливість до кетамін-індукованого апоптозу залежать від віку й активності [17]. Отже, враховуючи необхідність подальших експериментів для пояснення впливу одноразової дози Кетаміну на нейронні реакції, ці результати підтверджують, що навіть короткий апоптичний стимул може змінювати активність нейронів.

Відносно Пропофолу також відсутні беззаперечні проспективні дослідження впливу препарату на нейрональну структуру й когнітивну функцію в пацієнтів [18]. Крім того, у сучасних дослідженнях отримано морфологічні докази потенційно шкідливих ефектів Пропофолу на диференціювання нейронів та їхнє виживання – Пропофол викликає дозо-залежну втрату ГАМК-ергічних нейронів, що розвиваються, кори головного мозку новонароджених щурів [19], у тому числі в низьких, але клінічно значущих концентраціях (50 мкг/мл або більше).

В експерименті встановлено, що виразність процесів апоптозу під дією досліджених анестетиків має відмінності – уміст c-fos-позитивних клітин на 28 % нижчий, а вміст bcl-2-позитивних клітин на 15 % вищий на моделі пропофолового наркозу порівняно з кетаміновим. Ефективність експериментальної нейропротективної терапії Гетерозидом, Цереброкурином і Ноопептом також має відмінності на цих моделях. Доведено, що на експресію генів раннього реагування c-fos, який має проапоптотичні властивості (зниження щільності c-fos-позитивних клітин) – більше впливав Гетерозид, а на експресію антиапоптотичного білка

bcl-2 (підвищення концентрації bcl-2 білка) – Цереброкурин.

Таким чином, у подальшому спосіб інтраопераційної нейропротекції з використанням оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів Гетерозиду може становити безсумнівний інтерес для практичного застосування з метою профілактики ускладнень загальної анестезії.

Висновки

1. На моделях кетамінового та пропофолового наркозів у щурів (100 мг/кг) відтворено постнаркозну активізацію процесів апоптозу зі зростанням щільності c-fos-позитивних клітин і зниженням вмісту антиапоптотичного bcl-2-білка, більш виразні за умов кетамінової анестезії.
2. Введення щурам на моделях кетамінового та пропофолового наркозів потенційних нейропротекторів інтраопераційного періоду – оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів з аналептичною активністю Гетерозиду, нейротрофічного церебропротектора Цереброкурину та ноотропу Ноопепту – призвело до зниження щільності c-fos-позитивних клітин та збільшення експресії bcl-2-білка, отже, на цих моделях доведено наявності у них апоптозомодуючої активності.
3. На моделях кетамінового та пропофолового наркозів у щурів (100 мг/кг) апоптозомодуючий ефект Гетерозиду та Цереброкурину були співвідносними, Гетерозид більш активно впливав на експресію c-Fos (зниження щільності c-fos-позитивних клітин за умов кетамінового та пропофолового наркозів) і вміст bcl-2-білка (збільшення експресії за кетамінового наркозу).

1. Perouansky M. Neurotoxicity of general anesthetics / M. Perouansky, H. C. Hemmings // *Anesthesiology*. – 2009. – V. 111, № 6. – P. 1365–1371.
2. Propofol vs Sevoflurane anaesthesia on postoperative cognitive dysfunction in the elderly. A randomized controlled trial / G. Micha, P. Tzimas, I. Zalonis [et al.] // *Acta Anaesthesiol Belg*. – 2016. – V. 67 (3). – P. 129–137.
3. Zhong X. Mood and neuropsychological effects of different doses of ketamine in electroconvulsive therapy for treatment-resistant depression / X. Zhong // *J Affect Disord*. – 2016. – V. 39, 201. – P. 124–130.
4. Perioperative cognitive evaluation / A. Borozdina, E. Qeva, M. Cinicola, F. Bilotta // *Curr Opin Anaesthesiol*. – 2018. – V. 31 (6). – P. 756–761.

5. Effects of resveratrol pretreatment on endoplasmic reticulum stress and cognitive function after surgery in aged mice / B. Wang, S. Ge, W. Xiong, Z. Xue // *BMC Anesthesiol.* – 2018. – V. 18 (1). – P. 141–147.
6. Intraoperative ketamine administration to prevent delirium or postoperative cognitive dysfunction: A systematic review and meta-analysis / F. Hovaguimian, C. Tschopp, B. Beck-Schimmer, M. Puhon // *Acta Anaesthesiol Scand.* – 2018. – V. 62 (9). – P. 1182–1193.
7. Губіна-Вакулік Г. І. Морфологічна оцінка дії кетаміну та нейропротективних властивостей пірацетаму та сульфату магнію на нейрони гіпокампа у щурів / Г. І. Губіна-Вакулік, У. А. Фесенко, В. В. М'ясоєдов // *Український морфологічний альманах.* – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 29–34.
8. Radtke F. M. Monitoring depth of anaesthesia in a randomized trial decreases the rate of postoperative delirium but not postoperative cognitive dysfunction / F. M. Radtke // *Br J Anaesth.* – 2013. – V. 110 (Suppl. 1). – P. 98–105.
9. Kabachna I. Mechanisms of analeptic and antihypoxic effects of heterosides – derivatives for sulfur and nitrogen containing heterocycles / I. Kabachna, E. Suprun, V. Kabachnyy // *World Science.* – 2018. – V. 1, № 12 (40). – P. 29–34.
10. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. рекомендации / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Л. А. Громов [и др.]. – Киев, 2016. – 80 с.
11. Кабачна І. В. Дослідження аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів на моделі кетамінового наркозу / І. В. Кабачна, С. М. Дроговоз, В. І. Кабачний, Н. Ю. Палагіна // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2017. – № 4–5 (55). – С. 27–32.
12. Olney J. W. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs / J. W. Olney, J. Labruyere, M. T. Price // *Science.* – 1989. – V. 244. – P. 1360–1362.
13. Administration of Ketamine Causes Autophagy and Apoptosis in the Rat Fetal Hippocampus and in PC12 / Li Xinran, Yanan Li, Jinghua Zhao [et al.] // *Cells. Front Cell Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 21–29.
14. Ketamine-induced neurotoxicity in prenatal rhesus monkeys: distribution of neuronal damage / A. C. Scallet, R. Divine, C. Wang [et al.] // *Soc Neurosci Abst.* – 2005. – V. 251. – P. 15–23.
15. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain / C. Young, V. Jevtovic-Todorovic, Y. Q. Qin [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2005. – V. 146. – P. 189–197.
16. Ketamine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated not only via NMDA receptors but also via sigma receptors / S. Nakao, E. Miyamoto, M. Masuzawa [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – V. 926 (1–2). – P. 191–196.
17. Ketamine-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristic of physiological apoptosis and can be regulated by neuronal activity / Qi Wang, Feng-yan Shen, Rong Zou [et al.] // *Mol Brain.* – 2017. – V. 10. – P. 24–31.
18. Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures / P. Honegger, J. M. Matthieu // *J Neurosci Res.* – 1996. – V. 45. – P. 631–636.
19. Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures / I. Spahr-Schopfer, L. Vutskits, N. Toni [et al.] // *Anesthesiology.* – 2000. – V. 92. – P. 1408–1417.

Е. В. Супрун, І. В. Кабачна, В. І. Кабачний, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова
Модуляція процесів нейроапоптозу в щурів після кетамінового та
пропофолового наркозів під впливом Гетерозиду

З метою поліпшення анестезіологічної безпеки під час оперативних втручань перспективним напрямом може бути розширення асортименту засобів первинної та вторинної нейропротекції шляхом цілеспрямованого синтезу потенційних нейропротекторів з аналептичними властивостями, що діють як аналептики на ті самі структури, які остаточно пригнічені самим центральним анестетиком або його активними метаболітами. У зв'язку з цим обґрунтованим і перспективним є пошук серед похідних сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів (гетерозидів) універсальних, нешкідливих нейропротекторів з аналептичною дією.

Мета дослідження – порівняти нейропротективну активність Гетерозиду і референс-препаратів – нейротрофічного церебропротектора Цереброкуруну та ноотропу Ноопепту за умов експериментального наркозу Кетаміном і Пропофолом за впливом на вміст у головному мозку щурів проапоптотичного білка c-Fos й антиапоптотичного bcl-2-білка.

Дослідження проведено на 90 білих безпородних щурах віком 6 міс. масою 220–290 г. Кетамінову та пропофолову анестезії проводили шляхом введення 100 мг/кг відповідно Кетаміну/Пропофолу внутрішньочеревинно (в/о). Після виходу тварин з наркозу їм одноразово вводили препарати в таких дозах: Гетерозид – в/о 2 мг/кг, Цереброкурин – в/о 0,2 мг/кг, Ноопепт – інтраназально 10 мкг/кг. Для виявлення експресії c-Fos в CA1 зоні гіпокампа використовували імуногістохімічний метод непрямой імуофлюоресценції. Концентрацію bcl-2 у цитоплазматичній фракції головного мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу.

Аналіз отриманих результатів показав, що на моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів (100 мг/кг) відтворено постнаркозну активізацію процесів апоптозу зі зростанням щільності

c-fos-позитивних клітин і зниженням умісту антиапоптотичного bcl-2-білка, більш виразні в умовах кетамінової анестезії. Введення наркотизованим щурам потенційних нейропротекторів інтраопераційного періоду – оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів з аналептичною активністю Гетерозиду, референтних препаратів Цереброкурину та Ноопепту – призвело до зниження щільності c-fos-позитивних клітин і збільшення експресії bcl-2-білка в мозку, отже, на цих моделях доведено наявність у Гетерозиду, Цереброкурину та Ноопепту апоптозомодулюючої активності. На моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів апоптозомодулюючий ефект Гетерозиду та Цереброкурину були співвідносними, Гетерозид більш активно впливав на експресію c-Fos (зниження щільності c-fos-позитивних клітин за умов кетамінового та пропофолового наркозу) і вміст bcl-2-білка (на моделі кетамінового наркозу).

Ключові слова: Кетамін, Пропофол, нейропротекція, апоптоз, c-fos-позитивні клітини, bcl-2-білок

Э. В. Супрун, И. В. Кабачная, В. И. Кабачный, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтиярова **Модуляция процессов нейроапоптоза у крыс после кетаминowego и пропофолового наркозов под влиянием Гетерозидов**

С целью улучшения анестезиологической безопасности во время оперативных вмешательств перспективным направлением может быть расширение ассортимента средств первичной и вторичной нейропротекции путем целенаправленного синтеза потенциальных нейропротекторов с аналептическим действием, действующих как аналептики на те же структуры, которые подавлены непосредственно центральным анестетиком или его активными метаболитами. В связи с этим обоснованным и перспективным является поиск среди производных серо- и азотсодержащих гетероциклов (гетерозидов) универсальных, безвредных нейропротекторов с аналептическим эффектом.

Цель исследования – сравнить нейропротективную активность Гетерозидов и референс-препаратов церебропротектора Цереброкурина и ноотропа Ноопепта в условиях экспериментального наркоза Кетамином и Пропофолом по влиянию на содержание в тканях головного мозга крыс проапоптотического белка c-Fos и антиапоптотического bcl-2-белка.

Исследование проведено на 90 белых беспородных крысах 6 мес. возраста массой 220–290 г. Кетаминую и пропофоловую анестезии проводили путем введения 100 мг/кг соответственно Кетамина/Пропофола внутривенно (в/в). По выходу животных из наркоза им однократно вводили препараты в следующих дозах: Гетерозид – в/в 2 мг/кг, Цереброкурин – в/в 0,2 мг/кг, Ноопепт – интраназально 10 мг/кг. Для выявления экспрессии c-Fos в CA1 зоне гиппокампа использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию bcl-2 белка в цитоплазматической фракции головного мозга определяли методом Вестерн-блот анализа.

Анализ полученных результатов показал, что на моделях кетаминowego и пропофолового наркоза у крыс (100 мг/кг) воспроизведена постнаркозная активизация процессов апоптоза по показателям роста плотности c-fos-позитивных клеток и снижению содержания антиапоптотического bcl-2-белка, более выраженные в условиях кетаминовой анестезии. Введение наркотизированным Кетамин и Пропофолом крысам потенциальных нейропротекторов интраоперационного периода – оригінального производного серо- и азотсодержащих гетероциклов с аналептической активностью Гетерозидов и референтных препаратов Цереброкурина и Ноопепта – привело к снижению плотности c-fos-позитивных клеток и увеличению экспрессии bcl-2-белка в мозге, следовательно, на этих моделях доказано наличие у Гетерозидов, Цереброкурина и Ноопепта апоптозомодулирующей активности. На моделях кетаминowego и пропофолового наркоза у крыс апоптозомодулирующий эффект Гетерозидов и Цереброкурина были сопоставимыми, Гетерозид более активно влиял на экспрессию c-Fos (снижение плотности c-fos-позитивных клеток в условиях кетаминowego и пропофолового наркоза) и содержание bcl-2-белка (на модели кетаминowego наркоза).

Ключевые слова: Кетамин, Пропофол, нейропротекция, апоптоз, c-fos-положительные клетки, bcl-2-белок

E. V. Suprun, I. V. Kabachnaya, V. I. Kabachnyy, A. V. Abramov, N. V. Bukhtiyarova **Modulation of neuroapoptosis processes after ketamine and propofol anesthesia in rats under the influence of Heteroside**

In order to improve anaesthetic safety during surgical interventions, a promising direction may be the expansion of the range of primary and secondary neuroprotection drugs by means of targeted synthesis of potential neuroprotectors with analeptic action. It is reasonable and promising to search an universal, harmless neuroprotectors with analeptic action among the derivatives of sulfur- and nitrogen-containing heterocycles (Heteroside).

The purpose of the research was to compare the neuroprotective activity of Heteroside and reference medications – the neurotrophic cerebroprotector Cerebrocurin and nootropic Noopept after experimental anesthesia with Ketamine and Propofol by its effect on the content of proapoptotic c-Fos protein and antiapoptotic bcl-2 protein in the rat brain tissue.

The research was carried out on 90 white outbred rats of 6 months age, with weight of 220–290 g. Ketamine/Propofol anesthesia was performed by intraperitoneal (i/p) injection of anesthetic at a dose 100 mg/kg.

After recovery from anesthesia animals were once administered with drugs in the following doses: Heterosides 2 mg/kg (i/p), Cerebrocurin 0,2 mg/kg (i/p), Noopept 10 mg/kg intranasally. To detect the expression of c-Fos in the CA1 zone of the hippocampus an immunohistochemical indirect immunofluorescence method was used. The concentration of bcl-2 in the cytoplasmic fraction of the brain was determined by western blot analysis.

The analysis of results obtained proved that models of ketamine and propofol anesthesia on rats reproduced postanesthesia activation of apoptosis processes by increasing the density of c-fos-positive cells and reducing the content of anti-apoptotic bcl-2 protein, more pronounced in ketamine anesthesia. Neuroprotectors administration (Heteroside, Cerebrocurin, Noopept) at postanesthesia period led to lowering of c-fos-positive cells density and increasing of bcl-2 protein expression. Thus, the experiment on these models proved the presence of apoptosis-modulating activity of Heteroside, Cerebrocurin and Noopept. On the models of Ketamine and Propofol anesthesia in rats apoptosis-modulating effect of Heteroside and Cerebrocurin were comparable. Heteroside was found to be more active influencing the expression of c-Fos (by reducing the density of c-fos-positive cells after Ketamine and Propofol anesthesia) and the content of bcl-2 protein (on the model of Ketamine anesthesia).

Key words: Ketamine, Propofol, neuroprotection, apoptosis, c-fos-positive cells, bcl-2-protein

Надійшла: 10 січня 2019 р.

Контактна особа: Супрун Єліна Владиславівна, доктор медичних наук, професор, Національний фармацевтичний університет МОЗ України, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002.
Тел.: + 38 0 67 972 96 77.

S. A. Demchenko¹, L. S. Bobkova¹, O. E. Yadlovskiy¹,
T. A. Bukhtiarova¹, A. M. Demchenko^{1,2}

Synthesis of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and their effect on platelets aggregation

¹Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

²Nizhyn Mykola Gogol State University

Key words: platelets aggregation,
5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-
triazacyclopenta[cd]azulenes

In our previous studies derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes were synthesized and their antitumor, analgesic and anti-inflammatory activities were studied *in vivo* [1–7]. It is well known that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are able to inhibit cyclooxygenase enzymes activity (COX-1 and/or COX-2). COX isozymes participate in prostaglandins and thromboxanes synthesis which are involved in inflammation and in blood clotting respectively [8]. It is suggested the effect of the derivatives 5,6,7,8-tetra-

hydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes on blood coagulation system. It's known that a series of novel azulene-1 carboxylic acid derivatives and azulene-1 sulfonic acid sodium salts show TXA₂ receptor antagonistic activity [9, 10].

The aim of this study – to synthesize novel derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and to evaluate their effects on platelets aggregation.

Materials and methods. Test compounds – derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes were synthesized in department of medical chemistry, SI «Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS of Ukraine» (Fig.1, Fig. 2).

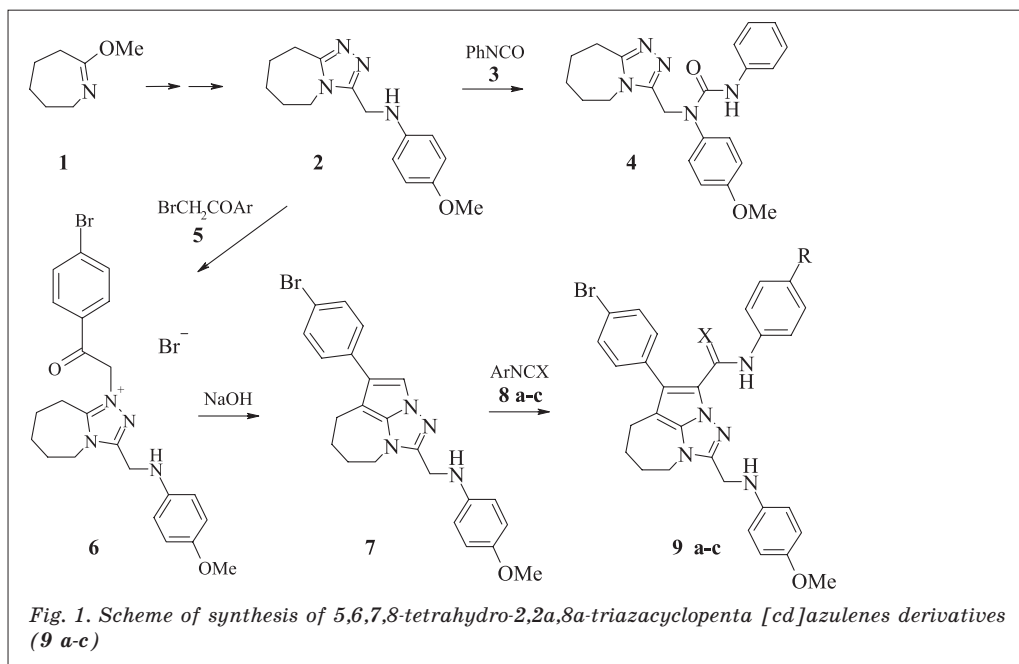
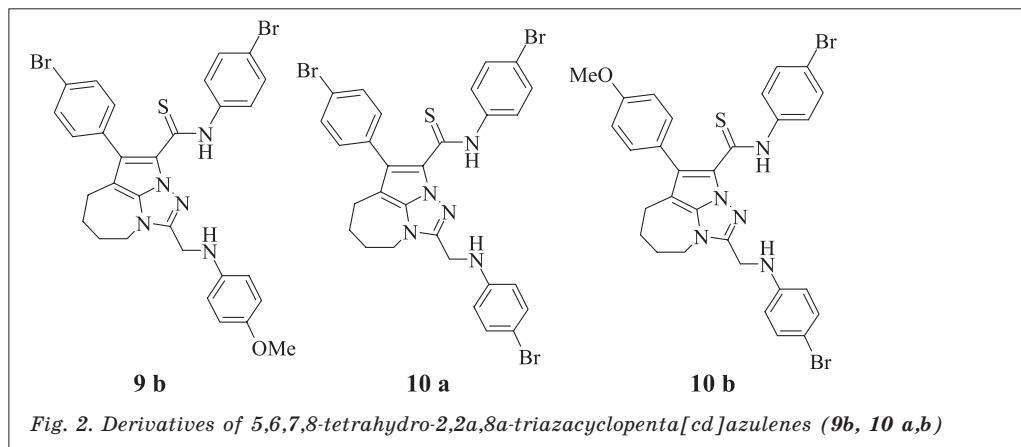


Fig. 1. Scheme of synthesis of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta [cd]azulenes derivatives (9 a-c)



2-Methoxy-3,4,5,6-tetrahydro-7H-azepine **1** was obtained by alkylating caprolactam with dimethyl sulfate using the method [11]. 3-(4¹-Methoxyphenyl)-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepine-3-yl-methyl)-amine **2** was obtained by condensation of 2-methoxy-3,4,5,6-tetrahydro-7H-azepine **1** with (4-methoxyphenylamino)acetic acid hydrazide and further cyclization of the intermediate product by the method [12].

¹H-NMR spectra were recorded on the Bruker DAX500MHz (Germany) in DMSO-d₆ using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Chemical shifts are reported in ppm units with use of the δ scale.

Purity control of novel compounds was conducted by thin-layer chromatography in the system chloroform – methanol 9:1. The melting points were measured on a small-sized heating table with the observation device RNMK 05 (VEB Analytik, Dresden).

Synthesis 1-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepine-3-yl-methyl)-urea 4. To solution of 2.72 g (0.01 M) 3-(4¹-methoxyphenyl)-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepine-3-yl-methyl)-amine **2** in 25 ml dry benzene with stirring added 1.19 g (0.01 M) isocyanatobenzene **3** and was refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried. Yield 3.05 g (78 %). M. p. = 190–192 °C (from ethanol). Anal. Calc. for C₂₂H₂₅N₅O₂, %: N 17.9. Found, %: N 17.6. NMR ¹H (DMSO-d₆, δ): 1.56–1.62 (m, 4H, CH₂CH₂), 2.84 (m, 2H,

CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 4.07 (m, 2H, CH₂), 4.94 (s, 2H, CH₂), 6.94 – 7.38 (m, 9H, C₆H₅+C₆H₄), 7.69 (s, 1H, NH).

Synthesis of 1-[2-(4¹-bromophenyl)-2-oxoethyl]-3-(4²-methoxyphenylamino)-methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepin-1-ium bromide 6. A mixture of 5.45 g (0.02 M) 3-(4¹-methoxyphenyl)-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepine-3-yl-methyl)-amine **2** and 5.56 g (0.02 M) 4-bromophenacylbromide **5** in 100 ml of ethylacetate was refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried. Yield 8.91 g (81 %). Anal. Calc. for C₂₃H₂₆Br₂N₄O₂, %: Br = 29.0, N = 11.4. Found, %: Br = 28.7, N = 11.6. NMR ¹H (DMSO-d₆, δ): 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.87 (m, 4H, 6,7-CH₂CH₂), 3.24 (m, 2H, 5-CH₂), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 4.46 (m, 2H, 8-CH₂), 4.60 (m, 2H, NHCH₂), 6.09 (s, 1H, NH), 6.38 (m, 2H, N⁺CH₂CO), 6.65 and 6.74 (d-d, 4H, C₆H₄), 7.87 and 8.02 (d-d, 4H, C₆H₄).

Synthesis of [4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-1-yl-methyl]-(4²-methoxyphenyl)-amine 7. Solution 40 ml 5 % NaOH was added into the suspension of 5.50 g (0.01 M) 1-[2-(4¹-bromophenyl)-2-oxoethyl]-3-(4²-methoxyphenylamino)-methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]azepin-1-ium bromide **6** in 50 ml water and refluxed for 3 hours. After cooling, the precipitate formed is filtered off, washed with water, dried and crystallized from benzene. Yield 2.21 g (49%). M. p. = 172–174 °C. Anal. Calc. for C₂₃H₂₃BrN₄O, %: Br = 17.7, N = 12.4. Found, %: Br = 17.5, N = 12.6.

NMR ^1H (DMSO- d_6 , δ): 1.97 (m, 4H, 6,7- CH_2CH_2), 2.74 (m, 2H, 5- CH_2), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 4.03 (m, 2H, 8- CH_2), 4.34 (d, 2H, NHCH_2), 5.86 (t, 1H, NHCH_2), 6.67 and 6.75 (d-d, 4H, C_6H_4 $J = 9.2$ Hz), 7.25 (s, 1H, 3-H), 7.39 and 7.51 (d-d, 4H, C_6H_4 $J = 8.5$ Hz).

Synthesis of 1-[(4²-methoxyphenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carboxylic acid phenylamide 9 a. 0.596 g (0.005 M) Phenyl isocyanate was added to solution of 2.26 g (0.005 M) [4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd] azulene-1-yl-methyl]-(4²-methoxyphenyl)-amine 7 in 40 ml of dry benzene with stirring and refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried and crystallized from DMFA. Yield 2.34 r (82 %). M. p. = 210–211 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{BrN}_5\text{O}_2$, %: Br = 14.0, N = 12.3. Found, %: Br = 13.7, N = 12.1. NMR ^1H (DMSO- d_6 , δ): 1.91 (m, 2H, CH_2), 2.07 (m, 2H, CH_2), 2.52 (m, 2H, 5- CH_2), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 4.16 (m, 2H, 8- CH_2), 4.58 (d, 2H, NHCH_2), 6.00 (t, 1H, NHCH_2), 6.77 (s, 4H, C_6H_4), 6.99–7.57 (m, 9H, $\text{C}_6\text{H}_5 + \text{C}_6\text{H}_4$), 9.65 (s, 1H, NH).

Synthesis of 1-[(4²-methoxyphenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carbothioic acid (4-bromophenyl)amide 9 b. 1.07 g (0.005 M) 4-Bromophenyl isothiocyanate was added to solution of 2.26 r. (0.005 M) [4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-1-yl-methyl]-(4²-methoxyphenyl)-amine 7 in 40 ml of dry benzene with stirring and reflux for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried and crystallized from DMFA. Yield 2.83 r (85 %). M. p. = 212–213 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{Br}_2\text{N}_5\text{OS}$, %: Br = 24.0, N = 10.5. Found, %: Br = 23.8, N = 10.3. NMR ^1H (DMSO- d_6 , δ): 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.40 (m, 2H, 5- CH_2), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 4.17 (m, 2H, 8- CH_2), 4.55 (d, 2H, NHCH_2), 5.97 (t, 1H, NHCH_2), 6.72 and 6.78 (d-d, 4H, C_6H_4), 7.23 and 7.59 (d-d, 4H, C_6H_4), 7.47 and 7.51 (d-d, 4H, C_6H_4), 10.9 (s, 1H, NH).

Synthesis of 1-[(4²-methoxyphenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-

tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd] azulene-3-carbothioic acid (4-ethoxyphenyl)amide 9 c. 0.896 g (0.005 M) 4-Ethoxyphenyl isothiocyanate was added to solution of 2.26 g (0.005 M) [4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-1-yl-methyl]-(4²-methoxyphenyl)-amine 7 in 40 ml of dry benzene with stirring and refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried and crystallized from DMFA. Yield 2.83 g (85%). M. p. = 216–218 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{BrN}_5\text{O}_2\text{S}$, %: Br = 12.7, N = 11.1. Found, %: Br = 12.9, N = 11.3. NMR ^1H (DMSO- d_6 , δ): 1.32 (t, 3H, CH_3), 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.40 (m, 2H, 5- CH_2), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 4.01 (q, 2H, CH_2), 4.17 (m, 2H, 8- CH_2), 4.54 (s, 2H, NHCH_2), 6.01 (t, 1H, NHCH_2), 6.75 (s, 4H, C_6H_4), 6.87 and 7.51 (d-d, 4H, C_6H_4), 7.24 and 7.47 (d-d, 4H, C_6H_4), 10.8 (s, 1H, NH).

Synthesis of 1-[(4²-bromophenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd] azulene-3-carbothioic acid (4-bromophenyl)amide 10 a. 1.07 g (0.005 M) 4-Bromophenyl isothiocyanate was added to solution of 2.50 g (0.005 M) [4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-1-yl-methyl]-(4²-bromophenyl)-amine in 50 ml of dry benzene with stirring and refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried and crystallized from DMFA. Yield 2.83 r (85 %). M. p. = 224–226 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{Br}_3\text{N}_5\text{S}$, %: Br = 33.6, N = 9.80. Found, %: Br = 33.2, N = 9.66. NMR ^1H (DMSO- d_6 , δ): 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.40 (m, 2H, 5- CH_2), 4.14 (m, 2H, 8- CH_2), 4.61 (d, 2H, NHCH_2), 6.59 (t, 1H, NHCH_2), 6.74 and 7.28 (d-d, 4H, C_6H_4), 7.22 and 7.57 (d-d, 4H, C_6H_4), 7.44 and 7.55 (d-d, 4H, C_6H_4), 10.8 (s, 1H, NH).

Synthesis of 1-[(4²-bromophenylamino)methyl]-4-(4¹-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carbothioic acid (4-bromophenyl)amide 10b. 1.07 g (0.005 M) 4-Bromophenyl isothiocyanate was added to solution of 2.26 g (0.005 M) [4-(4¹-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-

triazacyclopenta[cd]azulene-1-yl-methyl]-(4²-bromophenyl)-amine **7** in 50 ml of dry benzene with stirring and refluxed for 1 hour. After cooling the precipitate formed is filtered off, dried and crystallized from DMFA. Yield 2.63 g (79 %). M. p. = 245–247 °C. Anal. Calcd. for C₃₀H₂₇Br₂N₅OS, %: Br = 24.0, N = 10.5. Found, %: Br = 24.3, N = 10.6. NMR ¹H (DMSO-d₆, δ): 1.93 (m, 2H, CH₂), 2.10 (m, 2H, CH₂), 2.45 (m, 2H, 5-CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.16 (m, 2H, 8-CH₂), 4.58 (d, 2H, NHCH₂), 6.41 (t, 1H, NHCH₂), 6.71 and 7.16 (d-d, 4H, C₆H₄), 6.83 and 7.20 (d-d, 4H, C₆H₄), 7.38 and 7.55 (d-d, 4H, C₆H₄), 10.7 (s, 1H, NH).

The effect of novel derivatives on rat platelets aggregation was studied *in vitro*. Blood samples were taken from jugular vein of rats under pentobarbital (50 mg /kg) anesthesia. For experiments in which aggregation were studied, blood samples were stabilized by sodium citrate (3.8 %, in a ratio 9:1) and poured into silicone cuvettes. Test compounds were added into cuvettes at the concentration (1 · 10⁻⁵–1 · 10⁻⁶) mg/l. Cuvettes were at 37 °C for 15 minutes in thermostat. Blood samples were taken from the cuvettes (20 µl) and the initial number of platelets was counted. After that in cuvettes was added ADP (Reanal, Hungary) to the final concentration (5 · 10⁻⁵) M. Blood samples were take from the cuvette (20 µl) after 90 seconds. Samples were placed in ammonium oxalate (1 % sol.). Single platelets were counted in the Hemocytometer. Platelets

aggregation was calculated in accordance with the formula:

$$[(A_{\text{base.}} - B)/A_{\text{base.}}] \cdot 100 \%,$$

where: A_{base.} – base number of platelets, B – number of single platelets (90 seconds after ADP add).

The statistical analysis of the data obtained was performed by the method of variation 0 statistics (t-test) OriginPro 8.0 (originLab Corporation, USA) [13].

Results and discussion. There were studied *in vitro* the effects of base compounds (derivatives of 5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]azepines **4**, **6** and 2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene **7**) and target compounds (derivatives of 2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carbothioic acid **9 a-c** and **10 a, b**) on platelets aggregation at whole rat's blood samples. Analysis of base compounds activities shows that salt **6** and 2,2a,8a-triazacyclopenta [cd] azulene **7** had no significant effect on the ADP-induced platelets aggregation (relation to control) (Table 1).

Compound with triazolo-azepine fragment **4** significantly increases the platelets aggregation in whole blood by 21 % at concentration of 1 · 10⁻⁶ M (P < 0.05) and by 12 % at 1 · 10⁻⁵ M. It is possible that these compounds are characterized by agonist-antagonist action as to the blood coagulation system [14].

The compounds **9 a-c** and **10 a,b** exhibited similar activity for both concentrations (Table 2).

Table 1

ADP-induced platelets aggregation under the effect of base compounds 4–7

Compound	Concentration, M	Aggregation, % n = 6	Aggregation (+)/ antiaggregation (–) effect, Δ %
Control (0.9 % NaCl)		36.0 ± 4.52	
4	1 · 10 ⁻⁵	40.2 ± 3.87	+ 12 %
4	1 · 10 ⁻⁶	43.6 ± 3.79	+ 21 %*
6	1 · 10 ⁻⁵	33.8 ± 2.87	- 6 %
6	1 · 10 ⁻⁶	37.0 ± 4.97	+ 3 %
Control (0.9 % NaCl)		43.4 ± 5.13	
7	1 · 10 ⁻⁵	45.4 ± 2.71	+ 5 %
7	1 · 10 ⁻⁶	41.4 ± 2.48	- 5 %

Note. *P < 0.05 compared to the control.

*ADP-induced platelets aggregation under the effect of target compounds
9 a-c and 10 a,b*

Compound	Concentration, M	Aggregation (+)/ antiaggregation (–) effect, Δ %
9 a	$1 \cdot 10^{-5}$	+ 15
	$1 \cdot 10^{-6}$	+ 5
9 b	$1 \cdot 10^{-5}$	- 22*
	$1 \cdot 10^{-6}$	- 24*
9 c	$1 \cdot 10^{-5}$	+ 3
	$1 \cdot 10^{-6}$	+ 1
10 a	$1 \cdot 10^{-5}$	+ 13
	$1 \cdot 10^{-6}$	+ 32*
10 b	$1 \cdot 10^{-5}$	+ 4
	$1 \cdot 10^{-6}$	+ 23*

Note. * $P < 0.05$ compared to the control.

Compound **9 b** showed significant anti-aggregation effect 22–24 % in both investigated concentrations. Compounds **9 a**, **9 c** did not reveal anti-aggregation effect in both study concentrations. It was shown, that replacement of the (4¹-methoxyphenyl)-substituent in the first position (**9 b**) of the heterocyclic system to (4¹-bromophenyl) (**10 a,b**) changes the anti-aggregation effect to the aggregation. The similar tendency were observed for compounds **9b** and **9a** with the same substituents in the first and fourth positions of the heterocyclic system. However, these compounds had differ structure of the amide fragment: 4-bromophenylthioamide (**9 b**) and phenylamide (**9 a**) respectively.

Conclusion

1. New derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carboxylic acid phenylamide and arylthioamides were synthesized by the reaction of 4-aryl-5,6,7,8-tetrahydro-

2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-1-ylmethyl]-arylamines with the corresponding isocyanate or isothiocyanates at 79–85% yield.

2. 1-[(4²-Methoxyphenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carbothioic acid (4-bromophenyl)amide **9 b** demonstrates anti-aggregation activity *in vitro*. Compound **9 b** showed the highest anti-aggregation effect (22–24 %) at concentrations of $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ M.

3. It was shown, that replacement of the (4¹-methoxyphenyl)- substituent in the first position (**9 b**) of the heterocyclic system to (4¹-bromophenyl) (**10 a,b**) changes the anti-aggregation effect to the aggregation effect.

Authors are grateful to the Head of department Toxicology Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Ph.D. Nasek V. M. for realization of biological studies.

1. Патент на корисну модель № 119422 Україна, МПК (2017.01) C07D 487/04, C07B 43/00. 3-Ариламінометил-6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло [4,3-а]азепіни, що проявляють анальгетичну активність // Демченко С. А., Серединська Н. М., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Бершова Т. А., Демченко А. М. – № у 2017 03262; Заявл. 05.04.2017; Опубл. 25.09.2017, Бюл. № 18.
2. Патент на корисну модель № 121780 Україна, МПК (2006) C07D 487/00, A07B 43/00. 1-Ариламінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-триазациклопента[cd]азулені, що проявляють анальгетичну активність // Демченко С. А., Серединська Н. М., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Демченко А. М. – № у 2017 07646; Заявл. 19.07.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

3. Патент на винахід № 115756 Україна, МПК (2006): C07D 487/04, A61K 31/4196 (2006.01), A61P 29/00. Застосування 3-ариламінометил-6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-a]азепінів, як анальгетиків // Демченко С. А., Серединська Н. М., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Бершова Т. А., Демченко А. М. – № а 2017 03263; Заявл. 05.04.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
4. Патент на винахід №115750 Україна, МПК (2006): C07D 487/06 (2006.01), A61K 31/343 (2006.01), A61P 35/00, C07C 13/52 (2006.01). 1-Феніл-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-триазаціклопента[с,d]азулені, що мають протипухлинну активність // Демченко С. А., Колесніков О. В., Демченко А. М., Бобкова Л. С. – № а 2017 01124; Заявл. 07.02.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
5. Патент на корисну модель № 121779 Україна, МПК (2006) C07D 487/00, A 61P 35/00. 1-(2¹-Метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-триазаціклопента[сd]азулен, що має протипухлинну активність // Демченко С. А., Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А., Демченко А. М. – № у 2017 07644; Заявл. 19.07.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
6. Патент на корисну модель № 120100 Україна, МПК (2017.01) C07D 487/00, A 61P 35/00. 4-Арил-1-феноксиметил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-триаза-циклопента[сd]азулені, що мають протипухлинну активність // Демченко С. А., Волочнюк Д. М., Демченко А. М., Бобкова Л. С. – № у 2017 03603; Заявл. 13.04.2017; Опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20.
7. Патент на корисну модель № 123896 Україна, МПК (2006) C07D 487/00, A61P 35/00. 1-(4¹-Бромфеніл)-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-триазаціклопента[сd]азулені, що проявляють протипухлинну активність // Демченко С. А., Артемчук Л. П., Демченко А. М., Бобкова Л. С. – № у 2017 09889; Заявл. 12.10.2017; Опубл. 12.03.2018, Бюл. № 5.
8. Rainsford K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century / K. D. Rainsford // Subcell Biochem. – 2007. – № 42. – Р. 3–27.
9. Design, synthesis, and pharmacology of 3-substituted sodium azulene-1-sulfonates and related compounds: non-prostanoid thromboxane A2 receptor antagonists / T. Tomiyama, M. Yokota, S. Wakabayashi [et al.] // J Med Chem. – 1993 – V. 2, № 36 (7). – Р. 791–800.
10. Azulene derivatives: new non-prostanoid thromboxane A2 receptor antagonists / T. Tomiyama, S. Wakabayashi, K. Kosakai, M. Yokota // J Med Chem. – 1990. – V. 33, № 9. – Р. 2323–6.
11. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом / Граник В. Г., Жидкова А. М., Курятов Н. С. [и др.] // ХГС. – 1973. – № 11. – С. 1532–1535.
12. Синтез, противокоррозионная и биоцидная активность производных триазолоазепина / А. М. Демченко, К. Г. Назаренко, А. П. Макей [и др.] // Журнал прикладной химии. – 2004. – Т. 77, Вып. 5. – С. 794–797.
13. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2002. – 640 с.
14. Katzung B. G., Mesters S. B., Trevor J. A. Basic & clinical pharmacology Katzung B. G., Mesters S. B., Trevor J. A. 12th Edition. by The McGraw-Hill Companies. 2012 – 1229 p.

S. A. Demchenko, L. S. Bobkova, O. E. Yadlovskiy, T. A. Bukhtiarova, A. M. Demchenko

Synthesis of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta [cd]azulenes and their effect on platelets aggregation

The derivatives of triazacyclopenta[cd]azulenes have great interest as biologically active compounds. In our previous studies the analgesic, anti-inflammatory activities of 2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes derivatives were shown. The anti-inflammatory activity of derivatives 2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and antiaggregant activity other azulene derivatives suggested the presence of antiaggregant action of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd] azulene derivatives.

The aim of this study – to synthesize novel derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and to evaluate their effects on platelets aggregation.

A series of novel derivatives of phenylamide and arylthioamides of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene-3-carboxylic acid were synthesized. The structure and purity of compounds were confirmed by NMR ¹H spectroscopy and TLC at Silufol UV-254 plates.

The effect of new compounds on ADP-induced platelets aggregation was studied on the whole blood of Wistar male rats *in vitro*. Blood was collected from the jugular vein of anesthetized animals. Test compounds were added to samples at concentrations of 10⁻⁵ M and 10⁻⁶ M. The number of single platelets was counted at the Hemocytometer and than the changes in the degree of platelet aggregation compared with the control.

It was shown, that 1-[(4²-methoxyphenylamino)methyl]-4-(4¹-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulen-3-carboxylic acid (4-bromophenyl)amide (**9 b**) showed a significant anti-aggregation effect at concentrations of 10⁻⁵ M and 10⁻⁶ M. It was also shown, that replacement of the (4¹-methoxyphenyl)- substituent in the first position (**9 b**) of the heterocyclic system to (4¹-bromophenyl) (**10 a,b**) changes the anti-aggregation effect to the aggregation heterocyclicly. Other compounds did not show anti-aggregation activity in the experiment *in vitro*.

Key words: platelets aggregation, 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes

**С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О. Е. Ядловський, Т. А. Бухтіарова,
А. М. Демченко**

Синтез похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену та їхній вплив на агрегацію тромбоцитів

Як біологічно активні сполуки великий інтерес викликають похідні триазациклопента[сd]азулену. У наших попередніх дослідженнях показано анальгезуючу та протизапальну активність похідних 2,2а,8а-триазациклопента [сd]азулену. Протизапальна активність похідних 2,2а,8а-триазациклопента [сd]азулену та антиагрегантна активність інших похідних азулену припускають наявність антиагрегантної дії в похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену.

Мета дослідження – синтезувати та вивчити вплив похідних 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену на агрегацію тромбоцитів у цільній крові на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Синтезовані нові похідні – феніламід та арилтіоаміди 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен-3-карбонової кислоти. Будова та чистота отриманих сполук підтверджена за допомогою ЯМР ¹H спектроскопії та ТШХ на пластинках Silufol UV-254.

Вплив досліджених сполук на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів вивчали *in vitro* в зразках цільної крові щурів-самців лінії Вістар. Кров відбирали у наркотизованих тварин з яремної вени та стабілізували 3,8 %-ним розчином цитрату натрію. У проби додавали досліджувані сполуки в концентраціях 10⁻⁵ і 10⁻⁶ моль/л. Про активність судили за зміною ступеня агрегації тромбоцитів порівняно з контролем.

Показано, що сполука – (4-бромфенілітіоаміду)-1-[(4²-метоксифеніламіно)метил]-4-(4¹-бромфеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен-3-карбонової кислоти у концентраціях 10⁻⁵ і 10⁻⁶ моль/л проявила достовірну антиагрегаційну дію. Для 4-бромфенілітіоамідів-3-карбонової кислоти заміна (4-метоксифеніламіно) метильного замісника на (4-бромфеніламіно) – метильний призводила до агрегаційного ефекту. Інші цільові сполуки достовірно не впливали на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів порівняно з контролем.

Ключові слова: агрегація тромбоцитів, 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен

**С. А. Демченко, Л. С. Бобкова, О. Е. Ядловский, Т. А. Бухтиарова,
А. М. Демченко**

Синтез производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена и их влияние на агрегацию тромбоцитов

В качестве биологически активных соединений большой интерес вызывают производные триазациклопента[сd]азулена. В наших предыдущих исследованиях показана анальгезирующая и противовоспалительная активность производных 2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена. Противовоспалительная активность производных 2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена и антиагрегантная активность других производных азулена позволили предположить наличие антиагрегантного действия у производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена.

Цель исследования – синтезировать и изучить влияние производных 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулена на агрегацию тромбоцитов в цельной крови на этапе первичного фармакологического скрининга.

Синтезированы новые производные – фениламид и арилтиоамиды 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен-3-карбоновой кислоты. Строение и чистота полученных соединений подтверждены при помощи ЯМР ¹H спектроскопии и ТСХ на пластинках Silufol UV-254.

Определено влияние исследованных соединений на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в цельной крови крыс-самцов линии Вистар в опытах *in vitro*. Кровь отбирали у наркотизированных животных из яремной вены и стабилизировали 3,8 %-ным раствором цитрата натрия. В пробы прибавляли исследуемые соединения в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ моль/л. Количество тромбоцитов в образцах определяли с помощью гемоцитометра. Об активности судили по изменению степени агрегации тромбоцитов в сравнении с контролем.

Показано, что соединение - (4-бромфенилтиоамид) -1 - [(4²-метоксифениламино)метил]-4-(4¹-бромфенил)-5,6,7,8-тетрагидро-2,2а, 8а-триазациклопента[сd] азулен-3-карбоновой кислоты в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ моль/л проявляет достоверную антиагрегантную активность. Для 4-бромфенилтиоамидов-3-карбоновой кислоты замена (4-метоксифениламино) метильного заместителя на (4-бромфениламино) – метильный, приводит к агрегационному эффекту. Другие целевые соединения практически не меняли АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов по сравнению с контролем.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, 5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента [сd]азулен

Надійшла: 16 січня 2019 р.

Контактна особа: Демченко А. М., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18.

A. M. Demchenko^{1,2}, O. V. Moskalenko¹, V. V. Sukhoveev^{1,3},
A. I. Barchyna²

Synthesis and antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides for Flu A H1N1 virus

¹Nizhyn Mykola Gogol State University

²Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv

³V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Key words: antiviral activity, virus Flu A (H1N1) California / 07/2009, Ribavirin, Amizon, derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides

Nowadays the influenza A virus (subtype H1N1) has become epidemic and pandemic worldwide spread and is about 95% of all infectious diseases.

The most widespread virus strain was California/07/2009 IVA/H1N1/, which was formed as a result of the reassortment of human A virus (subtype H1N1) and several strains of the virus that was spread only in pigs (influenza swine). The newly formed strain of the influenza virus is characterized by specific epidemiological and clinical features of the disease, such as: a large contagious infection in the range of 22–33 % (the seasonal flu contagious is 5–15 %), a rapid deficiency of the respiratory tract, a predisposition to the incidence of all age groups [1].

According to the statistics of the World Health Organization (WHO), these annual epidemics result up to 5 million cases of severe illness and up to 500 000 deaths every year around the world. All these factors like high infectivity, constant mutation of the virus as a result of antigenic drift or gene reassortment lead to the existence of new virus subtypes and most people don't have immune defenses against them. As a result, there are pandemics causing high mortality [1, 2].

Bacterial infections during influenza can significantly affect the processes of the disease and lead even to lethality. Thus, severe acute respiratory syndrome (SARS) was diagnosed in more than 70 % of patients with H1N1, and mortality rates ranged from 17 % to 46 % [3].

Effective ways such as immune-regulating, pathogenetic, symptomatic therapy, virilidic and antiviral etiotropic drugs are used nowadays for the treatment of influenza. They are divided into several generations. Among the drugs of the first generation we can admit drugs of adamantane series: amantadine (the USA and Western Europe), rimantadine (the USA, Canada, the RF). The use of these drugs is limited by their lack of activity in relation to the B virus, side effects and the rapid onset of drug resistance [3]. Adamantane drugs are blockers of the M2 ion channels protein of the influenza A virus, but their constant use leads to the loss of antiviral properties. This fact is associated with a mutation in the transmembrane domain of the M2 protein of the influenza virus [3]. The second generation drugs (zenamivir, oseltamivir) are effective against influenza A and B viruses by inhibition of neurominidase. It should be mentioned that the use of neurominidase inhibitors is effective only at an early stage of infection [4]. An alternative way was the creation of drugs in which the active substance showed interferonogenic effect acting as an inducer of endogenous interferon [5].

Thus, the current mainstream view in medical chemistry is the development

and practical implementation of new high-performance pharmaceutical products for the treatment of influenza. One of the main solutions to this problem is the synthesis of derivatives of triazines that exhibit antioxidant [6, 7] and antiviral activity, which leads to a violation of the virus replication and, as a result, the ability to detect a therapeutic effect in the treatment of influenza caused by the H1N1 virus.

The aim of research is to synthesize the derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamide and to study the antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(4-ethoxyphenyl)-hydrazine-carbothioamide for Flu A H1N1 California/07/2009 at primary pharmacological screening stage.

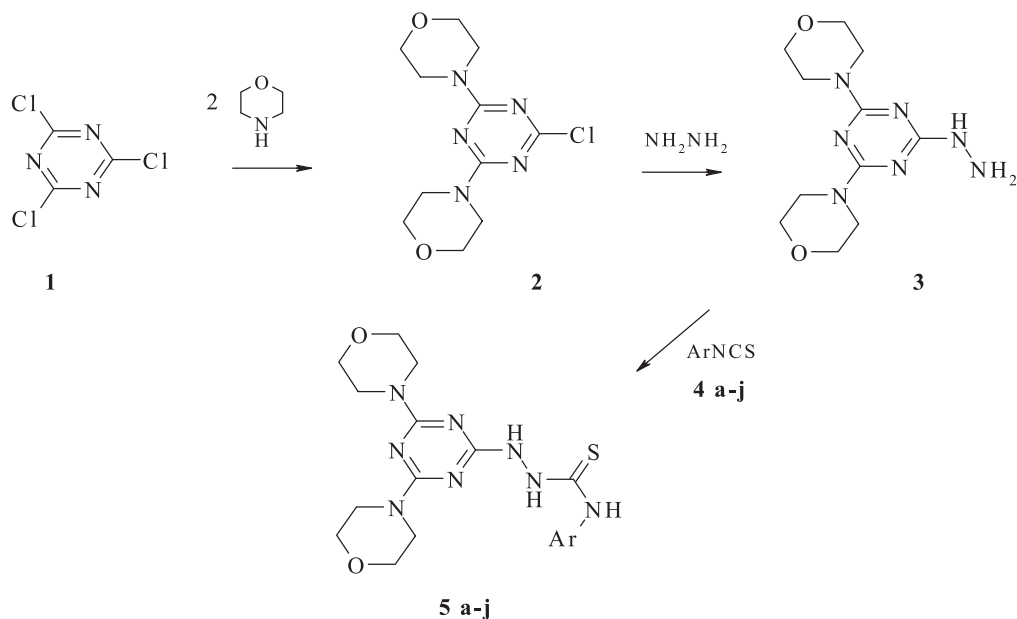
Materials and methods. Investigated compounds that are derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides and the substance of the drug «Amizon» were synthesized in the department of medical chemistry of State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology NMAS of Ukraine». We have synthesized compounds (**5a-j**) according to next scheme:

2-Chlor-4,6-dimorpholine-4-yl-[1,3,5] triazine **2** was obtained by the interaction of cyanuric chloride **1** with a double amount of morpholine in acetone solution according to the method [8].

It was found earlier [6, 7] that the derivatives of 2-R-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-methylhydrazine-carbothioamide containing a substituent R in n-position possesses a more distinct biological activity than if it is in the *ortho*- or *meta*- position. Therefore, a substance **5 e** – 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-ethoxyphenylhydrazine-carbothioamide was selected for the study of antiviral activity.

¹H-NMR spectra were recorded on the Varian Gemini 400 MHz (Germany) in DMSO-d₆ using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Chemical shifts are reported in ppm units with use of the δ scale.

Synthesis of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-phenylhydrazine-carbothioamide 5 a. 1.35 g (0.01 M) Phenylisothiocyanate was added to 2.81 g (0.01M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 **3** in 50 ml of ethanol. Stirred for one hour at a temperature of 75–78 °C, cooled to room temperature and left out overnight. The fallen-out



where **4** and **5** Ar: **a**) Ph, **b**) 2CH₃C₆H₄, **c**) 2CH₃OC₆H₄, **d**) 3ClC₆H₄, **e**) 4CH₃CH₂OC₆H₄, **f**) 2,3Me₂C₆H₃, **g**) 2,4Me₂C₆H₃, **h**) 2,5Me₂C₆H₃, **i**) 2,6Me₂C₆H₃, **j**) 3,4Me₂C₆H₃.

precipitate was filtered off and recrystallized from ethanol. Yield – 3.54 g (85 %). Mp = 188–190 °C. Found %: N 27.1; S 7.61. $C_{18}H_{24}N_8O_2S$. Calculated, % N 26.9; S 7.68. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 3.56 (m, 8H, morpholine), 3.60 (m, 8H, morpholine), 7.10 – 7.46 (m, 5H, Ph), 8.85 (c, 1H, NH), 9.47 (c, 1H, NH), 9.61 (c, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2-methylphenyl)-hydrazine-carbothioamide 5b was prepared analogously to the substituted hydrazine-carbothioamide 4a from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.49 g (0.01M) of ortho-tolylisothiocyanate 4 b. Yield 3.40 g (79 %). Mp = 200–201 °C. Found%: N 26.3; S 7.59. $C_{19}H_{26}N_8O_2S$. Calculated, % N 26.0; S 7.43. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 2.13 (c, 3H, CH_3), 3.57 (m, 8H, morpholine), 3.61 (m, 8H, morpholine), 7.01–7.17 (m, 4H, C_6H_4), 8.86 (s, 1H, NH), 9.39 (s, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2-methoxyphenyl)hydrazine-carbothioamide 5c was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.65 g (0.01 M) of 2-methoxyphenylisothiocyanate 4 c. Yield 3.62 g (81 %). Mp = 209–211 °C. Found%: N 25.3; S 7.28. $C_{19}H_{26}N_8O_3S$. Calculated, % N 25.1; S 7.17. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 3.55 (m, 8H, morpholine), 3.60 (m, 8H, morpholine), 3.75 (c, 3H, OCH_3), 6.86–7.12 (m, 4H, C_6H_4), 8.08 (s, 1H, NH), 8.94 (s, 1H, NH), 9.55 (s, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(3-chlorophenyl)-hydrazine-carbothioamide 5d was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.70 g (0.01 M) of 3-chlorophenylisothiocyanate 4 d. Yield 3.97 g (88%). Mp = 186–188 °C. Found%: N 24.5; S 7.27. $C_{18}H_{23}ClN_8O_2S$. Calculated, % N 24.8; S 7.10. NMR spectrum (DMSO- d_6 , TMS): 3.60 (m, 8H, morpholine), 3.66 (m, 8H, morpholine), 7.14–7.59 (m, 4H, C_6H_4), 8.89 (s, 1H, NH), 9.65 (s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(4-ethoxyphenyl)-hydrazine-carbothioamide 5e was prepared analogously to the substituted hydrazine carbonylamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.79g (0.01 M) of 4-ethoxyphenylisothiocyanate. Yield 4.24 g (92 %). Mp = 181–183 °C. Found %: N 24.3; S, 7.11 $C_{20}H_{28}N_8O_3S$ Calculated, % N 24.3; S 6.92. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 1.31 (t, 3H, CH_3), 3.56 (m, 8H, morpholine), 3.63 (m, 8H, morpholine), 4.00 (q, 2H, CH_2), 6.83 and 7.24 (d-d, 4H, C_6H_4), 8.82 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, NH), 9.49 (s, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2,3-dimethylphenyl)-hydrazine-carbothioamide 5f was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.63 g (0.01 M) of 2,3-dimethylphenyl isothiocyanate 4 f. Yield 3.25 g (73 %). Mp = 198–199 °C. Found %: N 25.5; S 7.31. $C_{20}H_{28}N_8O_2S$. Calculated, % N 25.2; S 7.20. NMR spectrum (DMSO- d_6 , TMS): 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.24 (s, 3H, CH_3), 3.59 (m, 8H, morpholine), 3.64 (m, 8H, morpholine), 6.84–7.06 (m, 3H, C_6H_3), 8.81 (s, 1H, NH), 9.33 (s, 2H, 2NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2,4-dimethylphenyl)-hydrazine-carbothioamide 5g was prepared analogously to the substituted hydrazine carbonylamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.63 g (0.01 M) of 2,4-dimethylphenyl isothiocyanate 4 g. Yield 3.42 g (77 %). Mp = 214–215 °C. Found %: N 24.9; S 7.11. $C_{20}H_{28}N_8O_2S$. Calculated, % N 25.2; S 7.20. NMR spectrum (DMSO- d_6 , TMS): 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.24 (s, 3H, CH_3), 3.59 (m, 8H, morpholine), 3.68 (m, 8H, morpholine), 6.92–6.98 (m, 3H, C_6H_3), 8.82 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH), 9.35 (s, 1H, NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2,5-dimethylphenyl)-hydrazine-carbothioamide for 5h was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide 4 a and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 3 and 1.63 g (0.01 M) of

2,5-dimethylphenyl isothiocyanate for 4 h. Yield 3.16 g (71%). Mp = 233–235 °C. Found %: N 25.4; S 7.33. $C_{20}H_{28}N_8O_2S$. Calculated, % N 25.2; S 7.20. NMR spectrum (DMSO- d_6 , TMS): 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.24 (s, 3H, CH_3), 3.59 (m, 8H, morpholine), 3.68 (m, 8H, morpholine), 6.83–7.07 (m, 3H, C_6H_3), 8.85 (s, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, 1NH), 9.39 (s, 1H, 1NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(2,6-dimethylphenyl)-hydrazine-carbothioamide **5i** was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide **4a** and from 2.81 g (0.01M) of 2-hydrazino-4,6-dimorpholinotriazine-1,3,5 **3** and 1.63 g (0.01 M) of 2,6-dimethylphenyl isothiocyanate **4i**. Yield 2.85 g (64 %). Mp = 205–207 °C. Found %: N 25.0; S 7.15. $C_{20}H_{28}N_8O_2S$. Calculated, % N 25.2; S 7.20. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 2.10 (s, 6H, 2 CH_3), 3.56 (m, 8H, morpholine), 3.67 (m, 8H, morpholine), 6.95–7.04 (m, 3H, C_6H_3), 8.83 (s, 1H, NH), 9.21 (s, 1H, 1NH), 9.35 (s, 1H, 1NH).

2-(4,6-Dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(3,4-dimethylphenyl)-hydrazine-carbothioamide **5j** was prepared in a similar manner to the substituted hydrazine carbothioamide **4a** and from 2.81 g (0.01 M) of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinotriazine-1,3,5 **3** and 1.63 g (0.01 M) of 3,4-dimethylphenyl isothiocyanate **4j**. Yield 2.85 g (64 %). Mp = 177–179 °C. Found %: N 25.4; S 7.33. $C_{20}H_{28}N_8O_2S$. Calculated, % N 25.2; S 7.20. The spectrum of NMR (DMSO- d_6 , TMS): 2.14 (s, 6H, 2 CH_3), 3.57 (m, 8H, morpholine), 3.66 (m, 8H, morpholine), 7.05–7.14 (m, 3H, C_6H_3), 8.81 (s, 1H, NH), 9.37 (s, 1H, 1NH), 9.46 (s, 1H, 1NH).

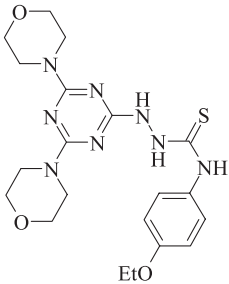
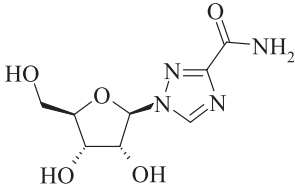
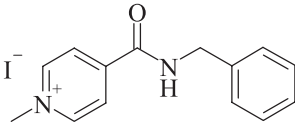
Antiviral activity research. Antiviral activity against the Flu A H1N1 California/07/2009 virus was conducted at the Southern Research Institute (SRI, Birmingham, Alabama, USA) within the framework of an international program to find new antiviral drugs and according to the agreement on cooperation with SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine». There were determined the antiviral activity of compound **5e** – 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-eth-

oxyphenylhydrazine-carbothioamide and the active substance of the drug Amizon - iodide 4-(N-benzyl)aminocarbonyl-1-methylpyridinium, an original development of the SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine» [5, 9], which is widely used in Ukraine for the treatment of influenza [10].

The antiviral activity of the tested compounds was evaluated *in vitro* using a MDCK cell culture [11]. According to the procedure Ribavirin is always used at the stage of primary antiviral activity screening as positive control in this test. The cultural medium was grown in a 96-well microplate until the bottom of each well was covered with cells. The residual cultural medium was completely removed and each well was washed twice with phosphate buffer. A solution of Flu A H1N1 in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well, adjusted to the required concentration. Then, a compound **5e** or Amizon, or Ribavirin (Sigma), dissolved in DMSO, was added to each well to a final concentration of 0.1 to 10 μ g / ml. After 48 h cultivation the state of the culture of MSCK cell was observed in a microscope. Then 100 μ l of 70% acetone was added and each well was kept at –20 °C for 1 h. After drying 100 μ l of 0.4 % (w/v) solution of SRB (sulfodoamine B) dissolved in 1% (v/v) acetic acid was added. After 30 minutes of staining, the non-binding SRB was removed and each well was washed 4 times with 1% (v/v) acetic acid. After drying 100 μ l 10 mM Tris solution (pH 10.5) was added to each well to dissolve the colored substance at the bottom of the well. Optical density was measured to evaluate antiviral activity. Cells treated with DMSO only and cells treated with DMSO and the Flu A H1N1 virus were used for control.

Results and discussion. Analysis of the results of antiviral activity against the Flu A H1N1 California/07/2009 virus indicates that compound **5e** is effective at a concentration lower than 116 times than such of Ribavirin and 626.7 times that compared with Amizon. According to the selectivity index, the test compound (SI > 1300) significantly exceeds Ribavirin and Amizon (SI > 37 and SI > 2.1 respec-

Antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-ethoxyphenylhydrazine-carbothioamide 5 e against the Flu A (H1N1) virus California / 07/2009

Compound	Structure	Type of virus	EC ₅₀ , µg /ml	IC ₅₀ , µg /ml	SI
5 e		Flu A (H1N1) California/07/2009	0.075	> 100	> 1300
Ribavirin		Flu A (H1N1) California/07/2009	8.7	> 320	> 37
Amizon		Flu A (H1N1) California/07/2009	47	> 100	> 2.1

Notes. 1) The EC₅₀ represents the concentration of a compound where 50 % of the population exhibit a response, after a specified exposure duration. Expressed in µg/ml. 2) IC₅₀ is the concentration of a drug that is required for 50% inhibition *in vitro*. Expressed in µg/ml. 3) SI is an index of selectivity, which is an indicator of the effectiveness of the drug, and is expressed by the ratio of IC₅₀ to EC₅₀.

tively) at IC₅₀ > 100 µg/ml [12]. Consequently, if the IC₅₀ of the test substance and Ribavirin were the same, the selectivity index for compound 5e would be even three times higher.

Under this test system Amizon substance showed much less antiviral activity against the Flu A H1N1 California/07/2009 virus compared with compound 5 e and was lower than Ribavirin (Table).

Thus, new compound, 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-ethoxyphenylhydrazine-carbothioamide, provides high antiviral activity against Flu A H1N1 California / 07/2009. The data obtained substantiate the expediency of further studies of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-arylhydrazine-carbothioamides as potential antiviral agents.

Acknowledgement. The authors express their appreciation to the Southern

Research Institute (SRI, Birmingham, Alabama) for screening antiviral activity of compounds.

Conclusions

1. Under *in vitro* assay on MDCK cell culture 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-ethoxyphenylhydrazine-carbothioamide exhibits high antiviral activity against the Flu A H1N1 California/07/2009, with an effective concentration (EC₅₀) of 0.075 µg / ml (116 times less than that of Ribavirin and 626.7 times that of Amizon) and selectivity index (SI) > 1300 that significantly exceeds such indicators for Ribavirin and Amizon (SI > 37 and SI > 2.1, respectively).
2. The data obtained indicate the expediency of further study of derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides as potential antiviral agents.

1. Emergence of novel swine–origin influenza A (H1N1) virus in human. Novel swine–origin influenza A (H1N1) virus investigation team. The New England // Journal of Medicine. – 2009. – V. 10. – P. 1–10.
2. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Update: drug susceptibility of swine–origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009 // Centers for Disease Control and Prevention (CDC). – 2009. – V. 58. – P. 433–435.
3. Smith J. R. The use of antiviral agents for the management of severe influenza / J. R. Smith, R. E. Ariano, S. J. Toovey // Crit. Care Med. – 2010. – V. 3, № 38. – P. 31–39.
4. Hayden F. WHO Guidelines on the Use of Vaccines and Antivirals during Influenza / F. Hayden // Annex 5–Considerations for the Use of Antivirals during an Influenza pandemic, Geneva, 2–4 October, 2002.
5. Патент на винахід UA 6752. 4-(п-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид – знеболюючий засіб з інтерферогенними, протизапальними та жарознижжувальними властивостями / Трінус Ф. П., Даниленко В.П., Бухтіарова Т.А. та ін. Опубл. 29.12.1994. Бюл. № 8.
6. Синтез похідних 2-R-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-метилгідразинкарботіоаміду та дослідження їх антиоксидантної активності / Ю. В. Ренькас, В. В. Суховєєв, А. М. Демченко [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2010. – № 4 – С. 68–75.
7. Синтез та антиоксидантні властивості похідних 2-R-(4,6-дипіролідін-1-іл)-[1,3,5]-триазин-2-іл)-N-гідразинкарботіоамідів / А. М. Демченко, О. І. Барчина, В. В. Суховєєв [та ін.] // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Хімія, Вип. 18. –2011. – С. 18–24.
8. Synthesis and anti-hepatitis C virus activity of morpholino triazine derivatives / T. Misawa, M. T. A. Salim, M. Okamoto [et al.] // Heterocycles. – 2010. – V. 81, № 6. – P. 1419–1428.
9. Эффективность Амизона в лечении и профилактике вирусных инфекций (к 10-летию применения препарата в клинической практике). Режим доступа: <http://farmak.ua/publication/effektivnost-amizona-v-lechenii-i-profilaktike-virusnyh-infektsiy-k-10-etiyeu-primeneniya-preparata-v-klinicheskoy-praktike>
10. Нормативно-директивні документи МОЗ України, Амизон. – Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=20298>
11. Standard Operating Procedure for *In Vitro* Antiviral Screening Institute for Antiviral Research, Utah State University. Available at http://arbidol.org/sidwell/NIH_SOP_03-2006.pdf
12. Патент (на корисну модель) № 75511 України, МПК (2012.01) C07 D 251/00, A61K 31/53 (2006.01) 2-(4,6-Диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-(4-етокси-феніл)гідразинкарботіоамід, що проявляє антивірусну активність по відношенню до вірусу IVA(H1N1) / Демченко А. М., Барчина О. І., Бобкова Л. С. та ін. – № у 2012 03791; Заявл. 28.03.2012; Опубл. 10.12.2012, Бюл. № 23.

A. M. Demchenko, O. V. Moskalenko, V. V. Sukhoveev, A. I. Barchyna

Synthesis and antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides for FLU A H1N1 virus

The problem of acute respiratory viral infections (ARI) and influenza A (H1N1 subtype) has become very current with their epidemic and pandemic worldwide spread. Therefore, the current mainstream view of medical chemistry is the development and practical implementation of new high-performance pharmaceutical products for the treatment of influenza.

The aim of research is to synthesize the derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamide and to study the antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-(4-ethoxyphenyl)-hydrazine-carbothioamide for Flu A H1N1 California/07/2009 at primary pharmacological screening stage.

The investigated compounds – derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides were synthesized by the interaction of 2-hydrazine-4,6-dimorpholinetriazine-1,3,5 with arylisothiocyanates.

The antiviral activity of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-4-ethoxyphenylhydrazine-carbothioamide against the virus Flu A H1N1 California/07/2009 was evaluated on MDCK cell culture test *in vitro*.

It has been shown that the test substance exhibits high antiviral activity against the influenza A virus H1N1 California/ 07/2009 with the effective concentration of EC₅₀ 0,075 µg/ml and the selectivity index SI > 1300 (for Ribavirin SI > 37 and Amizone SI > 2,1).

The data obtained substantiate the expediency of further study of derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N-arylhydrazine-carbothioamides as potential antiviral agents.

Key words: antiviral activity, Flu A virus (H1N1) California/07/2009, Ribavirin, Amizon, derivatives of 2-(4,6-dimorpholine-4-yl-1,3,5-triazine-2-yl)-N- arylhydrazine-carbothioamides

A. М. Демченко, О. В. Москаленко, В. В. Суховєєв, О. І. Барчина

Синтез і противірусна активність 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-арилгідразин-карботіоамідів відносно вірусу FLU A H1N1

Проблема гострих респіраторних вірусних інфекцій і грипу А (підтип H1N1) сьогодні зумовлена епідемічним розповсюдженням їх у світі. Тому актуальним напрямом медичної хімії є розробка та практичне впровадження нових високоефективних препаратів для лікування грипу.

Мета дослідження – синтез та вивчення протівірусної активності похідних 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-арилгідазин-карботіоамідів відносно вірусу Flu A H1N1 California/07/2009 на етапі первинного фармакологічного скринінгу.

Досліджувані сполуки – похідні 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-арилгідазин-карботіоамідів було синтезовано шляхом взаємодії 2-гідазин-4,6-диморфолінтриазину-1,3,5 з арилізотіоціанатами. Оцінено протівірусну активність 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-4-етоксифенілгідазинкарботіоаміду *in vitro* на культурі клітини MDCK з рибавирином як позитивним контролем у цьому тесті.

Показано, що досліджувана речовина виявляє високу протівірусну активність відносно вірусу Flu A H1N1 California/07/2009 за показниками ефективної концентрації EC_{50} 0,075 мкг/мл та індексом селективності $SI > 1300$ (для Рибавіріну $SI > 37$, Амізону $SI > 2,1$).

Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення похідних 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-арилгідазин-карботіоамідів як потенційних протівірусних засобів.

Ключові слова: протівірусна активність, вірус Flu A H1N1 California/07/2009, Рибавірин, Амізон, похідні 2-(4,6-диморфолін-4-іл-1,3,5-триазин-2-іл)-N-арилгідазинкарботіоамідів

А. М. Демченко, О. В. Москаленко, В. В. Суховеев, Е. И. Барчина **Синтез и противовирусная активность 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов по отношению к вирусу FLU A H1N1**

Проблема острых респираторных вирусных инфекций и гриппа А (подтип H1N1) на сегодняшний день обусловлена эпидемическим распространением в мире. Поэтому актуальным направлением медицинской химии является разработка и практическое внедрение новых высокоэффективных лекарственных препаратов для лечения гриппа.

Цель исследования – синтез и изучение противовирусной активности производных 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов по отношению к вирусу Flu A H1N1 California/07/2009 на этапе первичного фармакологического скрининга.

Исследуемые соединения – производные 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов синтезированы путем взаимодействия 2-гидразин-4,6-диморфолинтриазина-1,3,5 с арилзотиоцианатами.

Оценена противовирусная активность 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-4-этоксифенилгидразинкарботиоамида *in vitro* на культуре клеток MDCK с рибавирином в качестве позитивного контроля в этом тесте.

Показано, что исследуемое вещество проявляет высокую антивирусную активность по отношению к вирусу Flu A H1N1 California/07/2009 по показателям эффективной концентрации EC_{50} – 0,075 мкг/мл и индексу селективности – $SI > 1300$ (для Рибавирина $SI > 37$, а Амизона $SI > 2,1$).

Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейшего изучения производных 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов в качестве потенциальных противовирусных средств.

Ключевые слова: противовирусная активность, вирус Flu A H1N1 California/07/2009, Рибавирин, Амизон, производные 2-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)-N-арилгидразинкарботиоамидов

Надійшла: 3 грудня 2018 р.

Контактна особа: Демченко А.М., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18.

Н. В. Добреля, О. В. Паршиков, Л. В. Бойцова, О. С. Хромов

Моделювання цукрового діабету II типу

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

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотцин, толерантність до глюкози, резистентність до інсуліну

Дослідження складної взаємодії факторів розвитку цукрового діабету (ЦД) II типу створює підґрунтя для розробки стратегій попередження, лікування, запобігання ускладненням, врешті зменшення інвалідизації та смертності від цього захворювання. Для цього розробляють різноманітні моделі ЦД на тваринах, спадкові або з застосуванням хімічного чи хірургічного пошкодження підшлункової залози [1–3]. Панкреатектомія дозволяє зменшити продукування інсуліну без пошкодження інших органів токсичними засобами, але суттєвим недоліком цього методу є зменшення екзокринної та, частково, ендокринної функції залози, що супроводжується розладами травлення, зниженням виділення глюкагону, греліну та інших гормонів острівцями Лангергансу [4]. Тому частіше застосовують хімічні чинники, цитотоксичні аналоги глюкози – стрептозотцин (STZ) та алоксан, які направлено пошкоджують β -клітини підшлункової залози. Загалом, надається перевага STZ як стабільнішому та менш токсичному агенту [5, 6]. Високі дози STZ використовуються для знищення всіх β -клітин, що дає змогу моделювати ЦД I типу, а нижчі – частково пошкоджують цей тип клітин, що схоже на ЦД II типу. Найпоширеніший підхід до моделювання ЦД II типу включає перебування тварин на дієті з високим вмістом жирів (High-Fat Diet, HFD) певний період та введення STZ в дозі 30–40 мг/кг. Найбільшою перевагою цієї моделі є можливість відтворити повільний розвиток ЦД, включаючи порушення толерантності до глюкози, розвиток резистентності до інсуліну (IP) та вивільнення інсуліну, викликане руйнуванням

β -клітин, як перехід від переддіабетичного стану до маніфестації захворювання [7].

Мета дослідження – відтворення та характеристика моделі ЦД II типу на щурах.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на 30 дорослих білих щурах-самцях лінії Wistar масою (180 ± 15) г, яких утримували на стандартному раціоні віварію, що складається з сухих брикетованих комбікормів (віварій ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»). Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [8] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [9].

Усі тварини методом випадкової вибірки були розподілені на три групи. Перша група була контрольною (8 щурів), тварини другої групи (10 щурів) перебували на HFD протягом усього часу спостереження, а у тварин третьої групи (12 щурів) викликали ЦД II типу (HFD + STZ).

З метою отримання корму з високим вмістом жирів до стандартного гранульованого корму віварію, що містить 6 % рослинного жиру (масова частка), був доданий тваринний жир у кількості 10 % від загальної маси корму.

Моделювання ЦД у щурів. Розвиток патологічного процесу викликали утриманням щурів на HFD протягом 21 дня та одноразовим внутрішньоочеревинним (в/о) введенням STZ в дозі 40 мг/кг. STZ розчиняли в буферному розчині pH = 4,6. Щурам першої та другої груп в/о вводили цитратний буфер, що використовували для розведення STZ. Період розвитку ЦД II типу – 11 днів після введення STZ [10].

Реєстрували масу тіла, уміст глюкози в крові, артеріальний тиск (АТ), проводили тести на толерантність до глюкози та ІР.

Реєстрація АТ. За допомогою комплексу SPHYGMOMANOMETER S-2 (HSE, Німеччина) проводили вимірювання АТ у хвостовій артерії щурів усіх груп перед початком дослідів і через 31 добу. Накопичення та оцифрування даних здійснювалося аналогово-цифровим конвертором Power Lab 4/30 (ADInstruments; Австралія). Обробку сигналів, що одержували, проводили за допомогою програми «Chart 5» (ADInstruments, Австралія).

Визначення вмісту глюкози в крові щурів. Концентрацію глюкози в плазмі крові вимірювали безпосередньо перед початком дослідів та на 33 добу експерименту за допомогою глюкометра Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

Тест на толерантність до глюкози. Пероральний тест на толерантність до глюкози проводили в щурів усіх груп на 33 день експерименту за відповідною методикою [11, 12]. Перед тестом щурів піддавали 6-год голодуванню. За допомогою зонда щурам *per os* вводили розчин глюкози з розрахунку 2 г/кг маси тварини. Кров брали з хвостової вени натщесерце та через 30, 60, 90 і 120 хв після введення глюкози. За результатами тесту будували глікемічні криві.

Тест на ІР. Тест на ІР проводили в щурів усіх груп на 31 день експерименту за відповідною методикою [12]. Перед тестом щурів піддавали 6-год голодуванню. Кров брали з хвостової вени перед введенням інсуліну та через 30, 60, 90 і 120 хв після нього. Інсулін вводили в/о в дозі 0,175 МО/кг. За результатами тесту будували глікемічні криві.

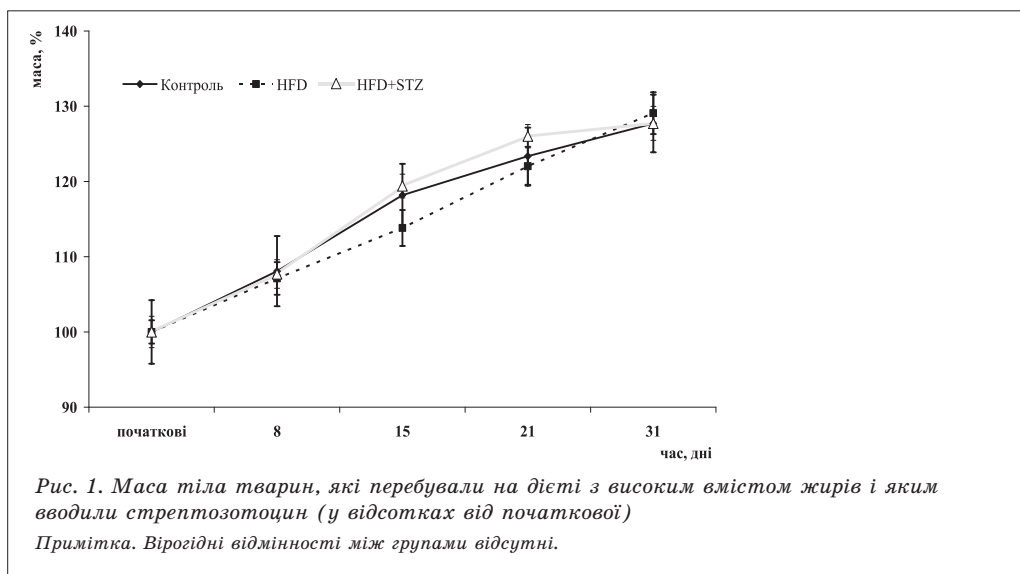
Використані реактиви та розчини. У ході дослідження були використані STZ (Sigma, США), глюкоза (Sigma, США), інсулін (Фармсулін Н, ПАТ «Фармак»), моногідрат лимонної кислоти (Sigma, США), тринатрієва сіль лимонної кислоти (Sigma, США).

Аналіз та статистична обробка отриманих даних. Нормальність розпо-

ділу визначали за тестом Шапіро-Уїлка. Дані представлені в такий спосіб: за нормального розподілу у вигляді середнього $\pm$ похибки середнього ($M \pm m$); інших випадках – медіани (Med), першого та третього квартилей (Q1; Q3). Порівняння величин проводили за допомогою U-тесту Манна-Уїтні. Для порівняння залежних вибірок використовували парний критерій Вілкоксона. Для множинних порівнянь використовували тест Краскела-Уолліса. Апостеріорне порівняння проводили за допомогою критерію Ньюмана-Кейлса. Відмінності вважалися статистично достовірними, якщо величина p була менше ніж 0,05.

Результати та їх обговорення. Харчування тварин кормом з високим умістом жирів протягом 21 дня не супроводжувалося змінами динаміки збільшення маси тіла порівняно з аналогічним показником у тварин контрольної групи, що знаходилися на стандартному раціоні віварію (рис. 1). Ведення STZ в дозі 40 мг/кг також не впливало на динаміку змін маси тіла. Таким чином, приріст маси тіла тварин, що знаходилися на HFD, та тих, на яких відтворена модель ЦД II типу, достовірно не відрізнявся від приросту маси тіла тварин контрольної групи протягом усього періоду спостереження. Ці дані підтверджують, що розвиток ЦД II типу не завжди супроводжується ожирінням, та відповідають даним літератури [13–15]. Можна припустити, що перебування на цій дієті не було достатньо тривалим для надмірного набору маси. Для моделювання ожиріння щурів утримують на висококалорійних дієтах триваліший час: якщо для виникнення ІР та порушення толерантності до глюкози достатньо утримувати щурів 2–3 тижні на HFD [10, 16], то для вірогідної різниці в масі необхідно годувати тварин модифікованими дієтами від 5 тижнів, але й за цих умов не завжди виявляють збільшення приросту маси тіла [17, 18].

Використання саме HFD має суттєві переваги для якнайточнішого відтворення ЦД і тісно пов'язане з поняттям «ліпотоксичність». Традиційно вважалося, що ІР визначається метаболізмом



глюкози. Однак усе більше уваги приділяється обміну жирних кислот в організмі, підвищення рівня яких має суттєве значення в патофізіологічних механізмах, пов'язаних з ІР [19]. Р. J. Randle у 1963 році висунув гіпотезу щодо об'єднання метаболізму глюкози та ліпідів. Цикл «глюкоза – жирні кислоти» ґрунтується на взаємозв'язку патофізіологічних процесів, у результаті яких під впливом вільних жирних кислот (ВЖК) відбувається погіршення метаболізму глюкози, що призводить до ІР [20].

Поняття «ліпотоксичність» у першу чергу стосується згубного впливу ектопічної надмірної акумуляції реактивних форм ліпідів у нежировій тканині. Однак цей термін включає й токсичність, яка реалізується ще й за рахунок синтезу ендогенних ліпідів у процесі ліпогенезу *de novo* [21].

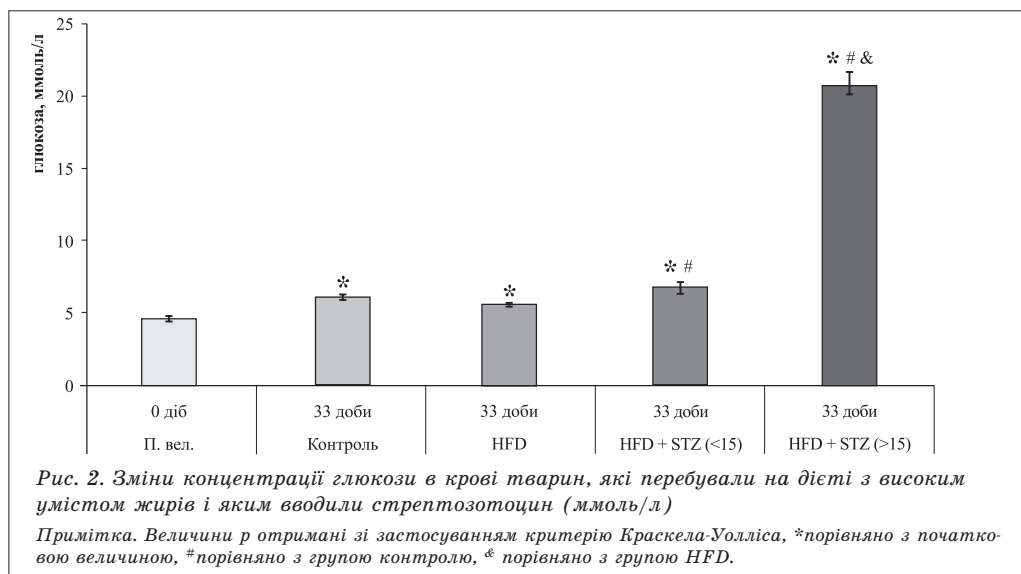
Хронічна гіперглікемія запускає каскад патологічних реакцій, основу яких складає окисний стрес та призводить до проявів глюкозотоксичності [22–24].

Поєднання виражених глюкозо- та ліпотоксичності є небезпечнішим, ніж дія кожного чинника окремо. Термін «глюкозоліпотоксичність» (ГЛТ) був запропонований у 2002 році М. Prentki як відображення більшого пошкоджуючого впливу ліпотоксичності на функції β-клітин в умовах гіперглікемії порівняно з нормоглікемією [25].

Через 32 дні перебування тварин на HFD спостерігалось збільшення (на 21 %) вмісту глюкози в крові. Введення STZ призводило в частини тварин (5 з 12) до значного (понад 15 ммоль/л) збільшення концентрації глюкози в крові. У решти тварин вміст глюкози зростає значно менше – до $(6,47 \pm 0,39)$ ммоль/л (рис. 2). Для подальших досліджень ця група тварин була розділена на 2 залежно від ступеня глікемії: HFD + STZ < 15 і HFD + STZ > 15.

Перебування тварин на HFD протягом періоду спостереження не вплинуло на АТ. Величина АТ у щурів групи HFD не відрізнялась від цього показника в тварин контрольної групи. Введення STZ на тлі високожирової дієти призводило до значного збільшення систолічного АТ (таблиця). Зв'язок між артеріальною гіпертензією (АГ) і ЦД відомий давно та не викликає сумнівів. АГ значно частіше зустрічається в хворих на ЦД порівняно з показником поширеності гіпертензії в загальній популяції [26, 27]. Також встановлено, що підвищення АТ, яке спостерігалось і в даному дослідженні, є одним з найважливіших факторів ризику розвитку та прогресування діабетичної мікро- та макроангіопатії.

З джерел літератури відомі основні механізми, що призводять до підвищення АТ, а саме: гіперінсулінемія, що призводить до посилення реабсорбції



натрію в проксимальних каналцях нирок, підвищений тонус симпатичної нервової системи, надмірна активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи [28]. Також варто згадати місцеву регуляцію тонусу судин, адже гіперглікемія завдяки окисному стресу та активації побічних шляхів метаболізму глюкози викликає зниження секреції ендотелієм таких вазодилаторів, як простагліцин й оксид азоту та підвищення продукування або активації вазоконстрикторних речовин (протеїнкінази C, ендотеліну, тромбосану A₂) [29–31].

Найважливішими параметрами, що характеризують адекватність моделі ЦД II типу, є порушення толерантності до глюкози та розвиток ІР. Перебування тварин на HFD не супроводжувалося достовірними змінами толерантності до глюкози порівняно з тва-

ринами контрольної групи, хоча в щурів цієї групи були виявлені зміни в ІР. У той самий час введення STZ принципово впливало на результати тестів.

За проведення тесту на толерантність до глюкози виявлено, що в тварин, які перебували на HFD і яким вводили STZ, з глікемією нижчою ніж 15, після перорального прийому глюкози відносно зростання її концентрації в крові було більшим, ніж у тварин контрольної групи. У групі HFD + STZ > 15 ці зміни були виражені максимально (рис. 3, 4). Також слід зазначити, що час, необхідний для досягнення найбільшої концентрації глюкози в крові, збільшувався в тварин з ЦД 2 типу, що свідчить про виражений дисбаланс співвідношення швидкості надходження глюкози в кров з кишковика та швидкості утилізації цукру тканинами.

Таблиця

Динаміка систолічного артеріального тиску під впливом дієти з високим умістом жирів і введення стрептозотоцину, мм рт. ст.

Група	Статистичний показник				
	M	SE	p	p1	p2
Початкова величина (n = 28)	117,80	0,77			
Контроль (n = 8)	118,50	1,02	0,653854		
Дієта з високим умістом жирів (n = 8)	116,47	1,12	0,350148	0,201571	
Дієта з високим умістом жирів + Стрептозотоцин (n = 12)	137,48	0,86	0,0	0,000010	0,0

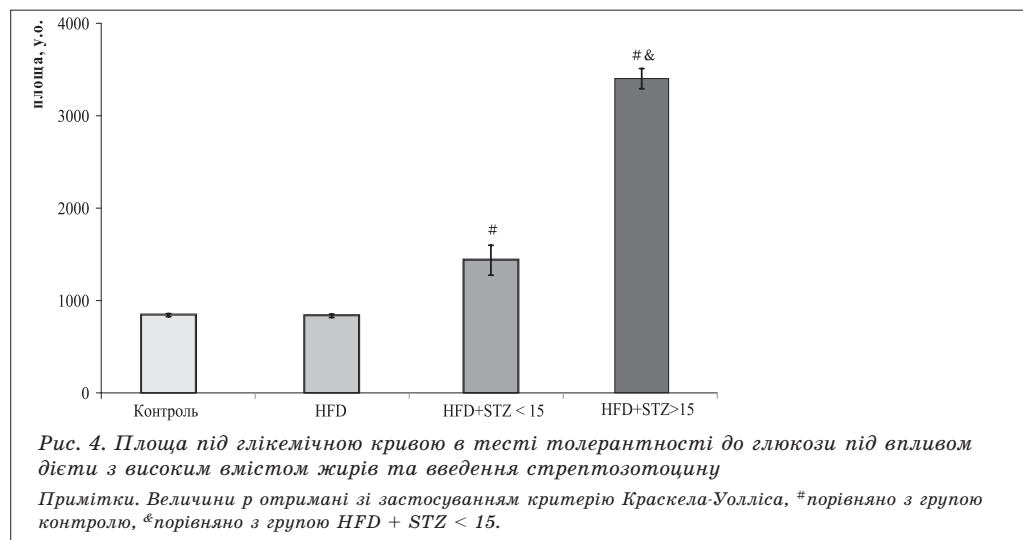
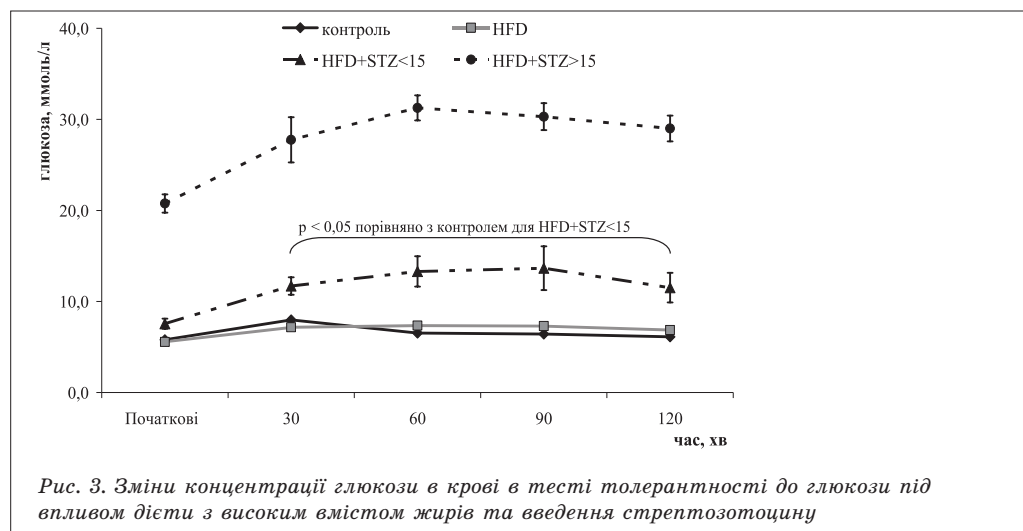
Примітки. Величини *p* отримані з застосуванням критерію Краскела-Уолліса, *p* – порівняно з початковою величиною, *p1* – порівняно з групою контролю, *p2* – порівняно з групою HFD.

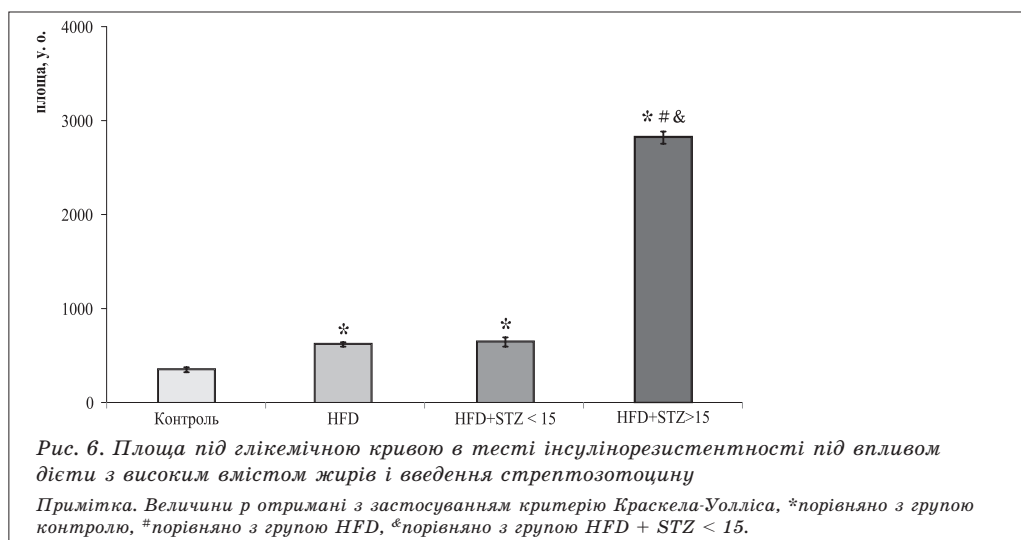
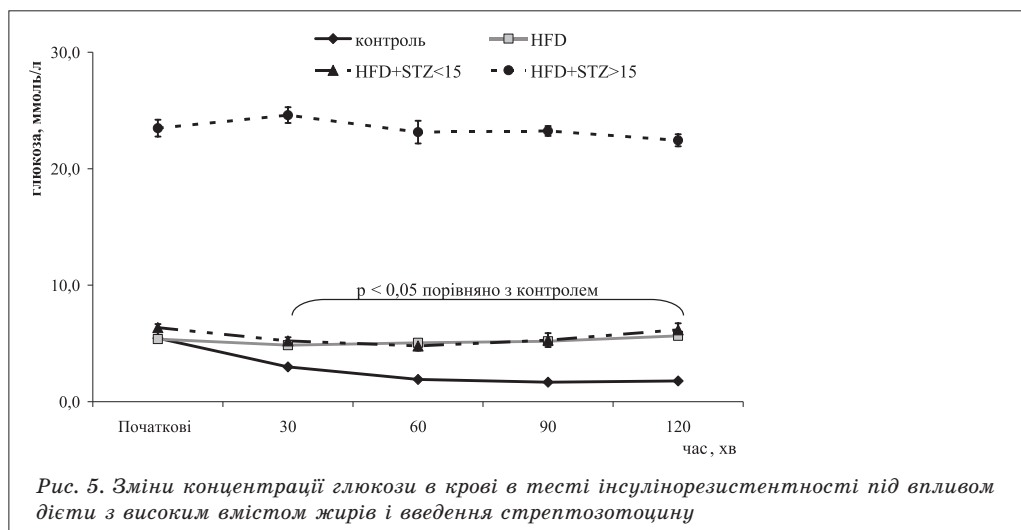
За проведення тесту ІР виявлені значні відмінності між тваринами контрольної групи та групами щурів, які отримували корм з високим вмістом жирів, незалежно від того, чи вводили тваринам STZ чи ступеня глікемії, що розвинулася після введення STZ (рис. 5, 6). Це підтверджувалося різницею площі під глікемічними кривими, що описують динаміку змін концентрації глюкози (рис. 4). Загалом ІР є центральним механізмом розвитку ЦД II типу, навколо якого формується ланцюг метаболічних і гемодинамічних порушень, та саме з нею пов'язують розвиток судинних захворювань [32, 33]. Компенсаторна гіперінсулінемія, що розвивається на початкових етапах ЦД II типу, призводить до подальшого

виснаження бета-клітин підшлункової залози та гіпоінсулінемії, яка супроводжується клінічними ознаками ЦД.

Висновок

Таким чином, утримання тварин на HFD (16 %) протягом 3 тижнів і подальше введення STZ призводить до формування адекватної моделі ЦД II типу, що підтверджується як збільшенням концентрації глюкози в крові, так і характерними змінами тестів толерантності до глюкози та ІР. Дана модель може використовуватись у дослідженнях впливу ЦД II типу на системний та органний кровообіг і для скринінгу та доклінічних досліджень протидіабетичних лікарських засобів.





- King A. J. Animal Models of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus / A. J. King, A. Austin // Animal Models for the Study of Human Disease – Second Edition, Ed. by P. M. Conn. – Elsevier Inc.: Academic Press, 2017. – P. 245–265. 10.1016/B978-0-12-809468-6.00010-3.
- Past and Future of *in vitro* and *in vivo* Animal Models for Diabetes: A Review / H. Dewangan, R. K. Tiwari, V. Sharma [et al.] // Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. – 2017. – V. 51 (4S). – P. S522–S530.
- Animal models of obesity and diabetes mellitus / M. Kleinert, C. Clemmensen, S. M. Hofmann [et al.] // Nature Reviews Endocrinology. – 2018. – V. 14 (3). – P. 140–162.
- Srinivasan K. Animal models in type 2 diabetes research: an overview / K. Srinivasan, P. Ramarao // The Indian Journal of Medical Research. – 2007. – V. 125 (3). – P. 451–472.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // Diabetologia. – 2008. – V. 51 (2). – P. 216–226.
- Singh M. P. Animal models for biological screening of anti-diabetic drugs: An overview / M. P. Singh, K. Pathak // European Journal of Experimental Biology. – 2015. – V. 5 (5). – P. 37–48.
- King A. J. F. The use of animal models in diabetes research / A. J. F. King // British Journal of Pharmacology. – 2012. – V. 166. – P. 877–894.
- Про захист тварин від жорстокого поводження: [закон України: від 21 лютого 2006 р. № 3447–IV] // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
- Furman B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats / B. L. Furman // Current Protocols in Pharmacology. – 2015. – V. 70. – P. 5.47.1–5.47.20.

11. Oral glucose tolerance test (OGTT) in normal control and glucose induced hyperglycemic rats with *Coccinia cordifolia* L. and *Catharanthus roseus* L. / M. A. Islam, M. A. Akhtar, M. R. Khan [et al.] // Pak. J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 22, № 4. – P. 402–404.
12. Assessing glucose homeostasis in rodent models / J. E. Bowe, Z. J. Franklin, A. C. Hauge-Evans [et al.] // Journal of Endocrinology. – 2014. – V. 222. – P. G13–G25.
13. Wushenziye Formula Inhibits Pancreatic β Cell Apoptosis in Type 2 Diabetes Mellitus via MEK-ERK-Caspase-3 Signaling Pathway / C. Tian, H. Chang, X. La [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2018. – V. 2018. – P. 1–9.
14. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells / C. Qian, C. Zhu, W. Yu [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – V. 10 (8). – P. e0136390.
15. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model / M. Lv. Zhang, L. Xiao-Yan, X. Jing [et al.] // Experimental diabetes research. – 2008. – V. 704045. – P. 10.1155.
16. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat / M. J. Reed, K. Meszaros, L. J. Entes [et al.] // Metabolism. – 2000. – V. 49 (11). – P. 1390–1394.
17. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin / S. Skovsø // J Diabetes Investig. – 2014. – V. 5 (4). – P. 349–358.
18. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications / D. A. Barrière, C. Noll, G. Roussy [et al.] // Sci Rep. – 2018. – V. 8 (1). – P. 424.
19. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity / C. M. Kusminski, S. Shetty, L. Orci [et al.] // Apoptosis. – 2009. – V. 14. – P. 1484–1495.
20. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus / P. J. Randle, P. B. Garland, C. N. Hales [et al.] // Lancet. – 1963. – V. 1. – P. 785–789.
21. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity / C. M. Kusminski, S. Shetty, L. Orci [et al.] // Apoptosis. – 2009. – V. 14. – P. 1484–1495.
22. Maritim A. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review / A. C. Maritim, R. Sanders, J. Watkins // J Biochem Mol Toxicol. – 2003. – V. 17. – P. 24–38.
23. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // Diabetes. – 2005. – V. 54. – P. 1615–1625.
24. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity / B. Giri, S. Dey, T. Das [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – V. 107. – P. 306–328.
25. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes / M. Prentki, E. Joly, W. El-Assaad [et al.] // Diabetes. – 2002. – V. 51 (3). – P. 405–413.
26. National Diabetes Statistics Report, 2017. – 20 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.diabetes.org/assets/pdfs/basics/cdc-statistics-report-2017.pdf>.
27. Challenges on the epidemiological and economic burden of diabetes and hypertension in Mexico / A. Arredondo, E. Orozco, J. Alcalde-Rabanal [et al.] // Revista de saude publica. – 2018. – V. 52. – P. 23.
28. Petrie J. R. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms / J. R. Petrie, T. J. Guzik, R. M. Touyz // The Canadian journal of cardiology. – 2018. – V. 34 (5). – P. 575–584.
29. Hadi H. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus / H. Hadi, J. Suwaidi // Vasc Health Risk Manag. – 2007. – V. 3 (6). – P. 853–876.
30. Giacco F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // Circ Res. – 2010. – V. 107 (9). – P. 1058–1070.
31. Sena C.M. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease / C. M. Sena, A. M. Pereira, R. Seica // Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Basis of Disease. – 2013. – V. 1832 (12). – P. 2216–2231.
32. Soleimani M. Insulin resistance and hypertension: new insights / M. Soleimani // Kidney International. – 2015. – V. 87 (3). – P. 497–499.
33. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease / V. Ormazabal, S. Nair, O. Elfeky [et al.] // Cardiovascular Diabetology. – 2018. – V. 17 (1). – P. 1–14.

Н. В. Добреля, О. В. Паршиков, Л. В. Бойцова, О. С. Хромов **Моделювання цукрового діабету II типу**

Вибір моделі цукрового діабету II типу було проведено на основі аналізу літератури, як найменш економічно затратної та найближчої щодо відтворення відповідного патологічного процесу в людини.

Обрана модель передбачає поєднання дієти з високим умістом жирів для індукції гіперінсулінемії та резистентності до інсуліну, а також введення токсичного для β -клітин стрептозоточину, що призводить до зниження функціональної маси цього типу клітин. Сукупно ці обидва фактори

мають відтворювати розвиток цукрового діабету II типу в людини, хоча в більш короткі терміни. *Мета дослідження* – відтворити модель цукрового діабету II типу та дослідити її основні характеристики.

В експерименті на щурах показано, що утримання тварин на дієті з високим вмістом жирів протягом 3 тижнів та одноразове внутрішньоочеревинне введення стрептозоточину в дозі 40 мг/кг не впливає на динаміку приросту маси тіла, але викликає зменшення вмісту глюкози в крові, підвищення артеріального тиску, зміни толерантності до глюкози та розвиток резистентності до інсуліну. Тривалість утримання щурів на високожировій дієті виявилась недостатньою для статистично достовірного збільшення маси тіла порівняно з контролем. Резистентність до інсуліну розвивається в тварин, яких утримують на модифікованій дієті, незалежно від введення стрептозоточину. Уведення стрептозоточину щурам, яких утримували на дієті з високим вмістом жирів, призводить до значного збільшення вмісту глюкози в крові в частини тварин. Величина артеріального тиску в щурів з цукровим діабетом II типу є достовірно вищою за початкову, а також за величини тиску в щурів контрольної групи та в тварин на високожировій дієті. Перебування щурів на дієті з високим вмістом жирів не викликає достовірних змін толерантності до глюкози. Введення стрептозоточину тваринам, які перебувають на дієті з високим вмістом жирів, зменшує толерантність до глюкози незалежно від рівня глікемії.

Таким чином, відтворена модель відповідає цукровому діабету II типу в людини та може використовуватися в дослідженнях впливу захворювання на системний та органний кровообіг та за скринінгу й доклінічних досліджень антидіабетичних лікарських засобів.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозоточин, толерантність до глюкози, резистентність до інсуліну

Н. В. Добреля, А. В. Паршиков, Л. В. Бойцова, А. С. Хромов **Моделирование сахарного диабета II типа**

Выбор модели сахарного диабета II типа был проведен на основе анализа литературы, как наименее экономически затратной и наиболее близкой по воссозданию соответствующего патологического процесса у человека.

Выбранная модель предполагает сочетание диеты с высоким содержанием жиров для индукции гиперинсулинемии и резистентности к инсулину, а также введение токсичного для β -клеток стрептозоточина, что приводит к снижению функциональной массы этого типа клеток. Совокупно эти два фактора предназначены для воспроизведения развития сахарного диабета II типа у человека, хотя в более короткие сроки. *Цель исследования* – воспроизвести модель сахарного диабета II типа и исследовать ее основные характеристики.

В эксперименте на крысах показано, что содержание животных на диете с высоким содержанием жиров в течение 3 недель и одноразовое внутрибрюшинное введение стрептозоточина в дозе 40 мг/кг не влияет на динамику прироста массы тела, но вызывает снижение содержания глюкозы в крови, повышение артериального давления, изменение толерантности к глюкозе и развитие резистентности к инсулину. Продолжительность содержания крыс на высокожировой диете оказалась недостаточной для достоверного увеличения массы тела по сравнению с контролем. Резистентность к инсулину развивается у животных, содержащихся на модифицированной диете, независимо от введения стрептозоточина. Введение стрептозоточина крысам, содержащимся на высокожировой диете вызывает гипергликемию у части животных. Величина артериального давления у крыс с сахарным диабетом II типа достоверно выше исходной величины давления у крыс контрольной группы и у животных на высокожировой диете. Пребывание крыс на диете с высоким содержанием жиров не вызывает достоверных изменений толерантности к глюкозе. Введение стрептозоточина животным, находящимся на диете с высоким содержанием жиров, уменьшает толерантность к глюкозе независимо от уровня гликемии.

Таким образом, воспроизведенная модель соответствует сахарному диабету II типа у человека и может использоваться в исследованиях влияния заболевания на системный и органний кровоток, а также при скрининге и доклинических исследованиях антидиабетических лекарственных средств.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозоточин, толерантность к глюкозе, резистентность к инсулину

N. V. Dobrelia, A. V. Parshikov, L. V. Boitsova, O. S. Khromov **Experimental model type II diabetes mellitus**

The model of type 2 diabetes mellitus was chosen after literature review as least expensive and the most favorable model that reflects the human pathological process.

Current model represents the combination of the high-fat diet to induce hyperinsulinemia and insulin resistance, and single streptozotocin injection resulting in decline in the mass and functional properties of β -cells. The combination of those two factors intends to reflect the development of the type 2 diabetes mellitus similar to human type, but in more short terms. *The aim of the study* was to reproduce the model of type 2 diabetes mellitus and explore the main characteristics of the disease.

The high-fat diet during 3 weeks in combination with a single intraperitoneal streptozotocin (40 mg/kg) injection does not affect the dynamics of the weight gain, but resulted in the changes of blood glucose level, elevated blood pressure, reduced glucose tolerance and development of insulin resistance in rats. The duration of high-fat diet was not sufficient to obtain a statistical significant difference in the body weight compared with control group. High-fat diet led to development of insulin resistance regardless to the streptozotocin administration. Administration of streptozotocin to high-fat diet rats resulted in hyperglycemia in some animals. Blood pressure in rats with type 2 diabetes mellitus is significantly higher compared with initial values as well as with control and high-fat diet groups. The high-fat diet alone does not result in significant changes of glucose tolerance. Administration of streptozotocin to high-fat diet animals reduces glucose tolerance, regardless of blood glucose level.

Thus, the reproduced model corresponds with human type 2 diabetes mellitus and can be used in studies of the effect of the disease on systemic or organ circulation, as well as in screening and preclinical studies of antidiabetic drugs.

Key words: type II diabetes mellitus, streptozotocin, glucose tolerance, insulin resistance

Надійшла: 28 грудня 2018 р.

Контактна особа: Добреля Наталія Володимирівна, старший науковий співробітник, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: ndobrelya@gmail.com

И. Ф. Дуюн, А. В. Мазулин, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов

Экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: трава тысячелистника подового (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka), гепатопротекторная активность, антиоксидантная активность, хронический алкогольный гепатит

Социальная значимость проблемы заболевания печени определяется ее широким распространением, а также различными проявлениями. Известно, что этиологическую роль в развитии заболеваний печени могут играть разнообразные факторы, в том числе вирусы, гормональные и метаболические нарушения, токсические поражения, вызванные самыми разнообразными веществами [1]. Лечение заболевания печени включает в себя два основных направления: этиотропную терапию, направленную на подавление патологического возбудителя, и патогенетическую терапию с фармакологической коррекцией [2]. В целом, ассортимент лекарственных средств достаточно широк, насчитывает более 1000 наименований. Однако среди такого многообразия препаратов выделяют сравнительно небольшую группу гепатопротекторов, оказывающих избирательное действие на печень. В настоящее время преобладающее использование имеют средства растительного происхождения (до 54 %) [3]. К сожалению, на сегодняшний день ни один из используемых в медицинской практике гепатопротекторов растительного происхождения и фосфолипидной природы не удовлетворяет в полной мере всем требованиям клинической гепатологии [4]. Поиск новых гепатопротекторов является актуальной проблемой современной фармакологии.

На пути поиска новых лекарственных средств, способных удовлетворять требованиям гепатологии, привлекают

внимание средства растительного происхождения, поскольку они отличаются комплексной фармакодинамикой и высоким уровнем безопасности даже при длительном применении [5–7].

Ценным компонентом растительного сырья, который определяет его антиоксидантную и гепатопротекторную активность, являются флавоноиды [5, 6]. Одним из ценных источников флавоноидов известна трава *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka (тысячелистник подовый, род *Achillea* L., семейство *Asteraceae* L.). Установлено, что трава видов рода *Achillea* L. содержит в своем составе флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, витамины К₁ и С, сахараиды, каротиноиды, аминокислоты, неорганические элементы, дубильные вещества [6]. За счет разнообразия содержания биологически активных веществ растения рода *Achillea* L. проявляют гепатопротекторную, антиоксидантную, гемостатическую активность [6]. Данные о гепатопротекторной и антиоксидантной активности *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka в научной литературе не найдены [7].

Цель исследования – провести экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности липофильного экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka (ЛЭТП) на модели хронического алкогольного гепатита (ХАГ).

Материалы и методы. На кафедре фармакогнозии, фармхимии и технологии лекарств ФПО Запорожского государственного медицинского университета была разработана технология получения ЛЭТП, которая позволила сохранить большое содержание биологически активных веществ. Исследование

гепатопротекторной и антиоксидантной активности ЛЭТП проводили на базе Учебно-медико-лабораторного центра ЗГМУ, который аттестован Государственным экспертным центром МЗ Украины. Экспериментальную часть проводили на 40 белых беспородных крысах обоего пола, массой 180–190 г, полученных из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составила 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние) дважды в день, животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Во время эксперимента животные находились в стандартных условиях при температуре 18–24 °C, влажности 50–60 %, природном световом режиме «день-ночь», постоянном режиме питания и питья. Исследования выполнены на достаточном количестве экспериментальных животных [8]. Все манипуляции были проведены в соответствии с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей» [14, 15] и методическими рекомендациями Государственного экспертного центра МЗ Украины «Доклинические исследования лекарственных средств» [9]. Протоколы экспериментальных исследований и их результаты утверждены решением Комиссии по биоэтике ЗГМУ (протокол от 26 октября 2018 г. № 33). Животных помещали в стандартные клетки – по 5 особей в каждой. Рацион питания – фуражное зерно, хлеб, корнеплоды (свекла, морковь).

Животные были разделены на четыре группы: 1) интактные (10 крыс); 2) контрольные – животные с ХАГ, без

лечения, получали физ. р-р (10 крыс); 3) животные с ХАГ, получавшие ЛЭТП (10 крыс); 4) животные с ХАГ, получавшие Гепабене (10 крыс).

Хронический алкогольный гепатит моделировали внутрижелудочным (в/ж) введением с помощью металлического зонда 20 % этанола в дозе 8 г/кг в течение 60 сут [11, 16]. После введения этанола на протяжении 30 сут в/ж с помощью металлического зонда вводили исследуемый ЛЭТП в дозе 20 мг/кг и референс-препарат Гепабене, («Merckle GmbH»/«Ratiopharm International GmbH», Германия) 100 мг/кг [12, 13]. Ежедневно регистрировали летальность. На 90 сут эксперимента через 1 ч после в/ж введения препаратов животных тестировали по длительности тиопенталового сна для определения детоксицирующей функции печени [9]. Для этого животным всех групп вводили внутривенно тиопентал-натрия (40 мг/кг). По окончании теста животных при признаках пробуждения выводили из эксперимента путем декапитации. Для биохимических исследований использовали кровь и печень.

Кровь отбирали из брюшной аорты шприцом. Сразу определяли показатели свертывающей системы крови – время свертывания и протромбиновое время. Сыворотку крови получали центрифугированием – 3000 об/мин в течение 30 мин (лабораторная центрифуга СМ-6). Сыворотку крови хранили в пластиковых пробирках (-20 °C). Печень промывали охлажденным 0,15 М KCl (4 °C) 1:10. Отмытую печень очищали от жира, соединительной ткани, вырезали сосуды, из внутренних полостей удаляли сгустки крови и еще раз отмывали 0,15 М KCl (4 °C) 1:10. Помещали в жидкий азот и затем измельчали до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды (при 2 °C), содержащей (в ммоль/л): сахарозы – 250, трис-HCl-буфера – 20, ЭДТА-1 (pH 7,4). При температуре (+4 °C) методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) выделяли митохондриальную фракцию. Для очистки митохондриальной фракции от крупных клеточных

фрагментов предварительно проводилось центрифугирование в течение 7 мин при 1000 g, а затем супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 17 000 g. [10]. Об эффективности экспериментальной терапии судили по активности трансаминаз (АлТ, АсТ) и содержанию билирубина в сыворотке крови [9], которые определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Prestige 24i. Использовали следующие тест-системы для оценки биохимических показателей: АлТ – № кат.-4-416, АсТ – № кат.-4-14, общий билирубин – № кат. 4-445 фирмы Cormay (Polska). Для оценки интенсивности оксидативного стресса в цитозольной фракции гомогената печени определяли маркеры окислительной модификации белка – альдегидфенилгидразоны (АФГ) и карбоксифенилгидразоны (КФГ), а также нитротирозин [10]. Показатели окислительной модификации белка (ОМБ) определяли по методу В. Halliwell по взаимодействию окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) и образованию АФГ и КФГ, имеющих спектр поглощения при 274 нм и 363 нм соответственно [10]. Нитротирозин определяли в цитозольной фракции гомогената печени твердофазным иммуносорбентным сэндвич-методом ELISA,

ELISAKit (Cat. № HK 501-02) фирмы Hycult Biotech.

Результаты исследования рассчитывали с применением стандартного статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальность распределения оценивали по критерию Shapiro-Wilk. Данные представлены в виде среднего значения. Достоверность различий между средними значениями определяли по критерию Стьюдента при нормальном распределении. В случае распределения, отличного от нормального, или анализа порядковых переменных использовали критерий U Mann-Whitney. Для сравнения независимых переменных в более чем двух выборках применяли дисперсионный анализ (ANOVA) при нормальном распределении или критерий Kruskal-Wallis для распределения, отличного от нормального. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95 %).

Результаты и их обсуждение. Как видно из данных, представленных в таблице 1, моделирование ХАГ приводило к гибели 30 % животных. У выживших животных наблюдали угнетение детоксицирующей функции

Таблица 1

*Выживаемость и длительность тиопенталового сна крыс в условиях хронического алкогольного гепатита и применения исследуемого липофильного экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka на 90 сутки эксперимента*

Экспериментальная группа	Выживаемость, количество животных	Выживаемость, %	Длительность тиопенталового сна, мин (% изменения к контролю)
Интактные животные (n = 10)	10/10	100	21,0 ± 2,5
Хронический алкогольный гепатит (контроль) (n = 7)	10/7	70	54,0 ± 2,0**
Хронический алкогольный гепатит + Липофильный экстракт травы <i>Achillea micranthoides</i> Klok. et Krytzka (n = 10)	10/7	70	46,5 ± 1,35*,** (-13,8 %)
Хронический алкогольный гепатит + Гепабене (n = 7)	10/7	70	48,1 ± 2,0*,** (-11 %)

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, ** $p < 0,05$ по отношению к интактной группе.

Таблица 2

*Биохимические показатели сыворотки крови крыс в условиях хронического алкогольного гепатита и применения исследуемого липофильного экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka на 90 сутки эксперимента ($M \pm m$)*

Экспериментальная группа	Активность АлТ, Ед/л (% изменения к контролю)	Активность АсТ, Ед/л (% изменения к контролю)	Содержание общего билирубина, мкмоль/л (% изменения к контролю)
Интактные животные (n = 10)	120,7 ± 9,3	165,0 ± 10,5	3,0 ± 0,3
Хронический алкогольный гепатит (контроль) (n = 7)	350,0 ± 22,5**	498,0 ± 22,1**	7,7 ± 0,4**
Хронический алкогольный гепатит + Липофильный экстракт травы <i>Achillea micranthoides</i> Klok. et Krytzka (n = 10)	252,7 ± 10,5*,** (-27,8 %)	384,5 ± 12,0*,+ (-22,8 %)	5,5 ± 0,2*,** (-28,5 %)
Хронический алкогольный гепатит + Гепабене (n=7)	260,0 ± 11,0*,** (-25,7 %)	400,0 ± 12,7*,** (-19,6 %)	5,9 ± 0,1*,** (-23,4 %)

Примечание. Здесь и в табл. 3: *p < 0,05 по отношению к контрольной группе, **p < 0,05 по отношению к интактной группе, ***p < 0,05 по отношению к группе Гепабене.

печени (увеличение длительности тиопенталового сна в 2,5 раза) (табл. 1). В сыворотке крови наблюдали достоверное повышение активности АсТ на 191,6 % и АлТ на 201,8 %, билирубина на 156,7 %, что свидетельствовало о повреждении гепатоцитов и функциональных нарушениях печени (табл. 2).

Курсовое внутрижелудочное введение образцов ЛЭТП крысам с ХАГ оказывало достоверное детоксицирующее, гепатопротективное, мембраностабилизирующее, антиоксидантное действие. Образцы ЛЭТП, также как и референс-препарат Гепабене не влияли на снижение летальности животных (во всех экспериментальных группах она оставалась на уровне 30 %). Однако введение исследуемого экстракта достоверно повышало детоксицирующую функцию печени (уменьшение длительности тиопенталового сна на 13,8 %). По этому показателю образцы ЛЭТП были сопоставимы с Гепабене. Исходя из полученных биохимических данных в сыворотке крови животных, введение ЛЭТП крысам с ХАГ оказывало защитное действие в отношении мембран гепатоцитов – достоверно снижалась активность АлТ на 27,8 % и АсТ на 22,8 % по сравнению с контролем соответственно. По влиянию на эти показатели ЛЭТП конкурировал с Гепабене. На

фоне введения ЛЭТП крысам с ХАГ уменьшались явления холестаза, что можно наблюдать по снижению в крови уровня билирубина на 28,5 % по сравнению с контролем.

В печени крыс с ХАГ регистрировали достоверное увеличение нитротирозина на 306,6 %, КФГ на 321,0 % и АФГ на 296,0 %, что свидетельствовало об активации оксидативного стресса (табл. 3). Введение образцов ЛЭТП крысам с ХАГ приводит к достоверному снижению нитротирозина на 29,3 %, АФГ на 37,8 % и КФГ на 18,6 %, что свидетельствует об антиоксидантной активности изучаемого ЛЭТП. По силе антиоксидантного действия ЛЭТП достоверно превосходит референс-препарат Гепабене по таким показателям, как снижение уровня КФГ и нитротирозина в печени крыс с ХАГ. Гепатопротекторное и антиоксидантное действие ЛЭТП реализуется за счет содержащихся в них биофлавоноидов-катехинов, лейкоантоцианидинов, халконов, флавонолов, которые проявляют свойства скавенджеров активных форм кислорода и NO, тормозят липопероксидацию фосфолипидов клеточных мембран гепатоцитов, повышают экспрессию глутатионпероксидазы, тормозят обусловленный свободными радикалами синтез провоспалительных

Показатели оксидативного стресса в цитозольной фракции печени крыс в условиях хронического алкогольного гепатита и применения исследуемого липофильного экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka на 90 сутки эксперимента ($M \pm m$)

Экспериментальная группа	АФГ, у.е./г белка (% изменения к контролю)	КФГ, у.е./г белка (% изменения к контролю)	Нитротирозин, нмоль/г белка (% изменения к контролю)
Интактные животные (n = 10)	7,6 ± 0,2	4,32 ± 0,1	44,5 ± 3,7
Хронический алкогольный гепатит (контроль) (n = 7)	30,1 ± 2,7**	18,2 ± 1,0**	205,0 ± 11,0**
Хронический алкогольный гепатит + Липофильный экстракт травы <i>Achillea micranthoides</i> Klok. et Krytzka (n = 10)	18,7 ± 0,8*** (-37,8 %)	14,8 ± 0,6*** (-18,6 %)	145,5 ± 5,2*** (-29,3 %)
Хронический алкогольный гепатит + Гепабене (n = 7)	21,1 ± 1,1*** (-29,9 %)	17,8 ± 1,2 (-2,1 %)	185,0 ± 10,0** (-9,7 %)

факторов и апоптоз [5, 12]. Полученные данные обосновывают перспективность дальнейшего изучения ЛЭТП.

Выводы

1. Результаты экспериментов на крысах с моделью ХАГ свидетельствуют о том, что курсовое (30 сут) в/ж введение ЛЭТП в дозе 20 мг/кг положительно влияет на функциональное состояние печени, улучшает ее детоксикационную функцию, характеризуется гепатопротекторной и антиоксидантной активностью. По силе гепатопротекторной активности ЛЭТП конкурирует с референс-препаратом Гепабене.

2. Исследуемый ЛЭТП в условиях курсового введения приводит к снижению содержания нитротирозина на 29,3 %, АФГ на 37,8 %, КФГ на 18,6 %, что указывает на наличие антиоксидантной активности. По силе антиоксидантной активности ЛЭТП достоверно превышает референс-препарат Гепабене по таким показателям, как снижение уровня КФГ и нитротирозина в печени крыс с ХАГ.

3. Полученные данные экспериментально обосновывают использование ЛЭТП как перспективного лекарственного растительного сырья для производства препаратов с гепатопротекторной и антиоксидантной активностью.

1. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам группы лекарств для печени / А. В. Матвеев. – Симферополь : ИТ «Ариал», 2014. – 384 с.
2. Кучерявый Ю. А. Гепатопротекторы: рациональные аспекты применения: учеб. пособие для врачей / Ю. А. Кучерявый, С. В. Морозов. – Москва : Форте Принт, 2012. – 36 с.
3. Попович В. П. Гепатопротекторный потенциал рослин: монографія / В. П. Попович, Б. П. Громолик, В. А. Сятиня. – Київ : Інтерсервіс, 2012. – 188 с.
4. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрашилов, Е. Н. Музафаров; отв. ред. Е. И. Маевский. – Пущино : Synchronbook, 2013. – 310 с.
5. Турсыматова О. И. Биологическая активность флавоноидов / О. И. Турсыматова, М. М. Дильмаханова // Наука и Мир. – 2015. – Т. 1, № 5. – С. 28–29.
6. Куркин В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных средств / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 1897–1901.
7. Фармакотерапевтические эффекты и клинические возможности эталонного препарата Силимарина / Н. Б. Губергриц, П. Г. Фоменко, Г. М. Лукашевич, О. А. Голубова // ФАРМАТЕКА. – 2012. – № 2. – С. 24–31.
8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ : Авіцена, 2002. – 155 с.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації): за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.

10. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Н. В. Бухтиярова [и др.] // Методические рекомендации. – Киев : ГП «Государственный экспертный центр МЗ Украины», 2016. – 80 с.
11. Разработка экспериментальных моделей алкогольного гепатита различной степени тяжести / А. Н. Петров, М. К. Шевчук, Е. К. Георгианова [и др.] // Токсикология. – 2015. – Т. 15, № 7. – С. 23–37.
12. Геруш О. В. Гепатопротекторная активность нового лекарственного средства растительного происхождения на модели хронического гепатита / О. В. Геруш, Л. В. Яковлева, Е. Б. Леницкая // Рецепт. – 2014. – № 5 (97). – С. 60–71.
13. Конопля А. И. Хроническая интоксикация этанолом: метаболические изменения, коррекция нарушений / А. И. Конопля // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5. – С. 25–30.
14. Лікарські засоби: Належна лабораторна практика: [Електронний ресурс] Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0972-01>
15. European convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
16. French S. W. Animal models of alcohol-associated liver injury / S. W. French, K. Morimoto, H. Tsukamoto // In: Hall, P., ed. Alcoholic Liver Disease, Pathology and Pathogenesis. 2d ed. – London : Hodder Headline, 1995. – 295 p.

І. Ф. Дуюн, О. В. Мазулін, І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов.

Експериментальне вивчення гепатопротекторної й антиоксидантної активності екстракту з трави *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka

Мета дослідження – експериментальне вивчення гепатопротекторної та антиоксидантної активності ліпофільного екстракту з трави *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka (ЛЕДП) на моделі хронічного алкогольного гепатиту (ХАГ).

Дослідження проводили на 40 білих безпородних щурах обох статей масою 180–190 г. Хронічний алкогольний гепатит моделювали внутрішньошлунковим (в/ш) введенням 20 % етанолу в дозі 8 г/кг протягом 60 діб. Після введення етанолу протягом 30 діб в/ш вводили досліджуваний ЛЕДП у дозі 20 мг/кг і референс-препарат Гепабене в дозі 100 мг/кг. Гепатопротекторну дію препаратів оцінювали за тривалістю тіопенталового сну, активністю АлТ і АсТ, рівнем білірубину в сироватці крові. Про антиоксидантну активність препаратів судили за рівнем маркерів окисної модифікації білка, альдегідфенілгідразонів (АФГ) і карбоксилфенілгідразонів (КФГ), а також нітротирозину в цитозольній фракції гомогенату печінки. Результати дослідження розраховували зі застосуванням стандартного статистичного пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXRX712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003».

Результати експериментів свідчать про те, що курсове введення ЛЕДП у дозі 20 мг/кг позитивно впливає на функціональний стан печінки, покращує її детоксикаційну функцію, характеризується гепатопротекторною та антиоксидантною активністю. За силою гепатопротекторної активності ЛЕДП конкурує з референс-препаратом Гепабене. Досліджуваний ЛЕДП призводить до зниження вмісту нітротирозину на 29,3 %, АФГ на 37,8 %, КФГ на 18,6 % порівняно з контролем, що вказує на антиоксидантну активність. За антиоксидантною активністю ЛЕДП достовірно перевищує референс-препарат Гепабене за такими показниками, як зниження рівня КФГ і нітротирозину в печінці щурів з ХАГ.

Отримані дані експериментально обґрунтовують застосування ЛЕДП як перспективної лікарської рослинної сировини для виробництва препаратів з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю.

Ключові слова: трава деревію подового (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka), гепатопротекторна активність, антиоксидантна активність, хронічний алкогольний гепатит

И. Ф. Дуюн, А. В. Мазулин, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов.

Экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka

Цель исследования – экспериментальное изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности липофильного экстракта травы *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka (ЛЭТП) на модели хронического алкогольного гепатита (ХАГ).

Исследования проводили на 40 белых беспородных крысах обоего пола массой 180–190 г. Хронический алкогольный гепатит моделировали внутрижелудочным (в/ж) введением 20 % этанола в дозе 8 г/кг в течение 60 сут. После завершения введения этанола в течение последующих 30 сут в/ж вводили исследуемый ЛЭТП в дозе 20 мг/кг и референс-препарат Гепабене в дозе 100 мг/кг. Гепатопротективное действие препаратов оценивали по длительности тiopенталового сна, активности АлТ и АсТ, уровню билирубина в сыворотке крови. Об антиоксидантной активности препаратов судили по уровню маркеров окислительной модификации белка альдегидфенілгідразонів (АФГ) и карбоксилфенілгідразонів (КФГ), а также нітротирозина в цитозольной фракции гомогената печени. Резуль-

таты исследования рассчитывали с применением стандартного статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003».

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что курсовое введение ЛЭТП в дозе 20 мг/кг положительно влияет на функциональное состояние печени, улучшает ее детоксикационную функцию, характеризуется гепатопротекторной и антиоксидантной активностью. По силе гепатопротекторной активности ЛЭТП конкурирует с референс-препаратом Гепабене. Исследуемый ЛЭТП приводит к снижению содержания нитротирозина на 29,3 %, АФГ на 37,8 %, КФГ на 18,6 %, что указывает на антиоксидантную активность. По антиоксидантной активности ЛЭТП достоверно превышает референс-препарат Гепабене по таким показателям, как снижение уровня КФГ и нитротирозина в печени крыс с ХАГ.

Полученные данные экспериментально обосновывают применение ЛЭТП как перспективного лекарственного растительного сырья для производства препаратов с гепатопротекторной и антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: трава тысячелистника подового (*Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka), гепатопротекторная активность, антиоксидантная активность, хронический алкогольный гепатит

I. F. Duyun, A. V. Mazulin, I. F. Belenichev, A. V. Abramov
Experimental study of hepatoprotective and antioxidant activity
***Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka grass extract**

*The purpose of the study was to investigate the hepatoprotective and antioxidant activity of the *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka herb lyophilic extract (AMLE) on the model of chronic alcoholic hepatitis (CAG).*

The studies were performed on 40 white outbred rats of both sexes weighing 180–190 g. Chronic alcoholic hepatitis was modeled by intragastric (i/g) administration of 20 % ethanol in a dose of 8 g/kg for 60 days. After completing of ethanol was followed by 30 days of i/g administration of the studied AMLE in a dose of 20 mg/kg and reference medication Hepabene, 100 mg/kg. The medications' hepatoprotective effect was evaluated by the duration of the thiopental sleep, the activity of ALT and AST, and the level of bilirubin in the blood serum. The estimation of antioxidant activity of the medications was based on the levels of the protein oxidative modification markers (aldehydephenylhydrazones (APG) and carboxylphenylhydrazones (CPG), as well as the level of nitrotyrosine in the cytosolic fraction of the liver homogenate.

The results of the study were calculated using the standard statistical package of the STATISTICA® for Windows 6.0 license program (StatSoftInc., NoXXR712D833214FAN5), as well as SPSS 16.0, Microsoft Office Excel 2003.

The results of experiments indicate that the course administration of AMLE in a dose of 20 mg/kg positively affects the functional state of the liver, improves its detoxification function, demonstrates hepatoprotective and antioxidant activity. The degree of AMLE hepatoprotective activity is comparable with that of the reference medication Hepabene. After AMLE administration there were a decrease of nitrotyrosine level by 29,3 %, AFG level by 37,8 % and CFG level by 18,6 %, which proves it's antioxidant activity significantly exceeding that of the reference medication Hepabene by such markers as decrease of the level of CFG and the level of nitrotyrosine in the liver of rats with CAG.

The data obtained provide experimental evidence and lay a foundation for the use of AMLE as a promising medicinal plant material for the production of medications with hepatoprotective and antioxidant activity.

Key words: *Achillea micranthoides* Klok. et Krytzka, hepatoprotective activity, antioxidant activity, chronic alcoholic hepatitis

Надійшла: 15 січня 2019 р.

Контактна особа: Дуюн І. Ф., Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 61 224 64 69.

Г. В. Зайченко², Т. Б. Равшанов¹

Ефективність супозиторіїв з індол-3-карбінолом і мелоксикамом за тестостерон-індукованої гіперплазії передміхурової залози в щурів

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

Ключові слова: тестостерон-індукована гіперплазія, передміхурова залоза, ректальні супозиторії, індол-3-карбінол, мелоксикам, морфоструктура

Доброякісна гіпертрофія передміхурової залози (ДГПЗ) є залежним від віку захворюванням з прогресивною проліферацією простатичної glandулярної та стромальної тканини [1], яке у чоловіків репродуктивного віку призводить до зниження фертильності та сексуальної активності, що в свою чергу знижує якість життя, викликає психічні та соціальні проблеми. Якщо в 1984 році в дослідженні Беррі зі співавт. показано відсутність ДГПЗ у чоловіків молодше 30 років, наявність – у 8 % чоловіків віком 40–49 років і в 50 % – віком 50–60 років [2], то за останні 30 років захворюваність на простатит зросла приблизно вдвічі та діагностується в понад 80 % чоловіків, з них приблизно 30 % виявляється у віковій категорії від 20 до 40 років, а у віці 80 років – у 90 % чоловіків [3, 4]. В Україні цей діагноз має кожен третій чоловік до 50 років і кожний другий – після 50 років [5].

До лікаря звертаються 15–25 % чоловіків віком 50–65 років [6] з приводу ДГПЗ, терапія якої включає застосування препаратів різних груп: α -адреноблокаторів (зокрема, доксазозин, тамсулозин, силодозин), інгібіторів 5 α -редуктази, інгібіторів фосфодіестерази типу 5, антихолінергічних і 3 β -агоністів [7]. Незважаючи на достатню ефективність медикаментозної терапії, велика частка призначень включає фітопрепарати, що полегшують симптоми ДГПЗ, не призводячи до побічних ефектів [8].

Індол-3-карбінол (ІЗК) – метаболіт рослинних глікозинолатів, які містяться в усіх частинах хрестоцвітних рослин (зелень крес-салату, гірчиці, хрону, різних видів капусти та ін.). В організмі ІЗК перетворюється на більш активний індол – 3,3'-диіндолілметан (DIM), здатний впливати на метаболізм естрогенів, пригнічувати транскрипцію генів, чутливих до стимуляції рецепторів E_2 . Крім того, у сполуки встановлена наявність протипухлинної, противірусної активності, здатності впливати на апоптоз клітин [9]. Уведення DIM до складу вагінальних супозиторіїв сприяло позитивній дії на помірні та важкі дисплазії шийки матки, гальмуванню злоякісного переродження [10, 11]. Завдяки застосуванню DIM у супозиторіях зменшується системна біодоступність активної речовини за зростання біодоступності на місці аплікацій.

З огляду на поєднання у більшості випадків ДГПЗ з простатитом доцільним було використати комбінацію ІЗК та протизапального засобу мелоксикаму, зокрема, у вигляді ректальних супозиторіїв на поліетиленоксидній основі, які містять 0,2 г ІЗК та 0,0075 г мелоксикаму (оптимальні дози діючих речовин визначено експериментально). На етапі доклінічних досліджень важливим було провести оцінку морфоструктури передміхурової залози (ПЗ) у щурів з тестостерон-індукованою ДГПЗ після курсового застосування супозиторіїв комбінованого складу (СКС).

Мета дослідження – визначити ефективність застосування супозиторіїв з ІЗК і мелоксикамом для корекції морфоструктурних змін ПЗ у лабораторних щурів з андроген-індукованою доброякісною гіперплазією простати.

Матеріали та методи. Експерименти на тваринах виконували з дотриманням національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) [12].

Простатопротекторну активність СКС досліджували на 30 нелінійних самцях щурів віком 12–14 тижнів з середньою масою тіла 160–180 г, яких було рандомізовано на 5 груп (табл. 1). Тваринам 2–5 груп під тіопенталовим наркозом проводили гонадектомію, та через 3 доби щурам груп 3–5 було розпочато введення 1 % розчину тестостерону пропіонату (ТсП) у дозі 5 мг/кг підшкірно впродовж 14 днів [13]. На 15 добу було розпочато введення супозиторної маси СКС (група ДГПЗ + СКС) або супозиторіїв з олією насіння гарбуза (ОНГ) (референтний препарат, група ДГПЗ + ОНГ) у пряму кишку на глибину 2,0–2,5 см від ануса. На 28 добу тварин виводили з експерименту швидко декапітацією.

Ефективність оцінювали за результатами морфологічного дослідження ПЗ щурів (медіанні зрізи), а саме зони, що включає перешийок між вентральними частками (ПВЧ), межової зони з дорсолатеральною часткою (МДЛЧ), а також середньої ділянки дорсолатеральної частки (ДЛЧ) – ділянки, що наближені до шийки сечового міхура – найвразли-

вішого місця простати в людини (периретральна зона) за виникнення аденоми. Для світлооптичного дослідження вилучені зразки готували за загальноприйнятими в морфології методами, зрізи фарбували гематоксилін-еозином [14] та аналізували за допомогою світлового мікроскопа Granum з цифровою відеокамерою Granum DCM 310 за участю старшого наукового співробітника НФаУ Ю. Б. Лар'яновської. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Tour View. За допомогою програми Toursam Granum вимірювали периметр ацинусів передміхурових залозок (у мкм), локалізованих у ВЧ і ДЛЧ.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакета програм Excel 7.0 і Statistica 6.0. Показники представлені як медіана (Me) та інтерквартильний розмах у вибірці (LQ; UQ). Порівняння між групами проводили з використанням критерію Манна-Уїтні. Різницю між групами вважали статистично значущою в разі $P < 0,05$ [15].

Результати та їх обговорення. У гонадектомованих щурів, що зазнали андрогенної стимуляції, порівняно з кастрованими тваринами дифузно по всіх досліджених частках ПЗ відмічено виразну гіпертрофію ацинусів простатичних залозок, майже повністю заповнених еозинофільним і щільним секретом (рис. 1). Крім того, відмічається як проліферація, так і гіперплазія залозистого епітелію стінок ацинусів різних типів

Таблиця 1

Схема експерименту

Група, кількість тварин	Умови дослідження
1. Інтактні, 6 тварин	Інтактний контроль
2. Оперовані, 6 тварин	Гонадектомовані щури
3. Гіпертрофія передміхурової залози, 6 тварин	Тестостерон-індукована гіперплазія передміхурової залози, без лікування
4. Гіпертрофія передміхурової залози + Олія насіння гарбуза, 6 тварин	Тестостерон-індукована гіперплазія передміхурової залози + Олія насіння гарбуза, 35 мг/кг
5. Гіпертрофія передміхурової залози + Супозиторії комбінованого складу, 6 тварин	Тестостерон-індукована гіперплазія передміхурової залози+ Супозиторії комбінованого складу, 30 мг/кг за вмістом індол-3-карбінолу

простатичних залозок в обох досліджених частках ПЗ, що співпадає з даними, отриманими іншими авторами [16]. Про перше свідчить збільшення довжини, чисельності, розгалуженості та щільності розташування епітеліальних складок у багатьох ацинусах простатичних залозок, локалізованих у ДЛЧ, у тому числі й у тих, де певною мірою вони присутні й у нормі. Про друге – те, що доволі часто практично по всьому периметру стінки ацинуса епітеліальні клітини збільшені з виразною секреторною зоною, втратили однорядність розміщення, ядра переміщені з базальних відділів у напрямку центру клітин (рис. 2).

Часто в ацинусах залозок, локалізованих у ДЛЧ ПЗ (переважно 3–4 тип), є ознаки часткової зміни типу секреції з мерокринного на апокринний (за даними Е. А. Шубникової [17]) – відшарування апікальних частин клітин внаслідок надмірної стимуляції секреторної активності епітелію (рис. 3).

Результати морфометрії переконливо довели атрофічні зміни у ПЗ гонадектомованих щурів (табл. 2). Після андрогенної стимуляції периметр ацинусів простатичних залозок, локалізованих у вентральній частині (група ГПЗ), вірогідно збільшився порівняно з кастрованими щурами в 4,5 разу та більш ніж у 1,5 разу порівняно з інтактними. Середній периметр усіх аналізованих

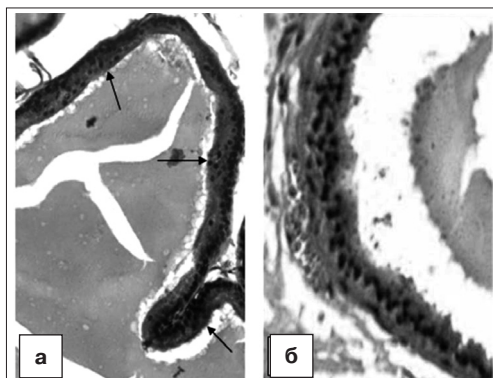


Рис. 2 Передміхурова залоза гонадектомованого щура за умов стимуляції тестостерону пропіонатом. Втрата однорядності розташування епітеліальних клітин у стінці ацинусів простатичних залозок, локалізованих у вентральній (а – 1 тип) і дорсолатеральній (б – 3 тип) частині. Гематоксилін-еозин. $\times 400$

ацинусів простатичних залозок, локалізованих у ДЛЧ ПЗ (3–5 тип), збільшився в 3,5 разу порівняно з результатом групи оперованих тварин. Відносно інтактного контролю периметр ацинусів збільшився на 73,6 %, 20,0 % та 30,5 % відповідно до типу проаналізованих залозок (табл. 2).

Морфометрія препаратів щурів групи ГПЗ показала статистично вірогідне збільшення периметра ацинусів простатичних залозок, локалізованих у ВЧ, порівняно з кастрованими щурами в 4,5 разу та більше ніж у 1,5 разу порівняно з інтактним контролем (табл. 2).

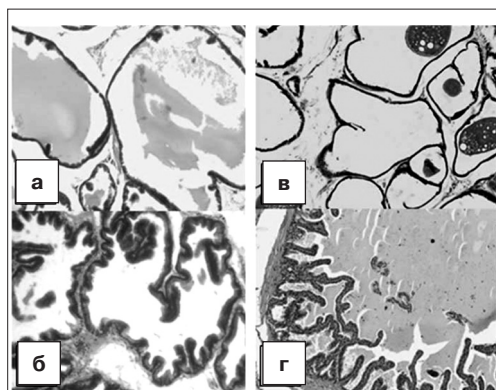


Рис. 1 Передміхурова залоза гонадектомованого щура за умов стимуляції тестостерону пропіонатом. Гіпертрофія простатичних залозок, локалізованих у дорсолатеральній частці (а – 3 тип, б – 4 тип, в – 5 тип) і передній частці (г). Гематоксилін-еозин. $\times 200$

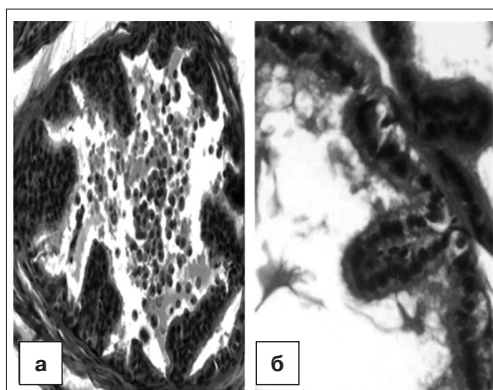


Рис. 3 Передміхурова залоза гонадектомованого щура за умов стимуляції тестостерону пропіонатом. В ацинусах простатичних залозок, локалізованих у дорсолатеральній частці (4 тип), у просвіті серед злуценого епітелію видно багато еозинофільних округлих «утворень» (а) $\times 250$), вакуолізація епітелію (б) $\times 400$. Гематоксилін-еозин

Периметр ацинусів простатичних залозок моделюванням у щурів гіперплазії передміхурової залози та застосування супозиторіїв комбінованого складу, мкм, Me (LQ; UQ)

Група	Частка передміхурової залози			
	вентральна	дорсолатеральна		
	1–2 тип залозок	3 тип залозок	4 тип залозок	5 тип залозок
1. Інтактні	513,2 (484,3; 534,6)	518,1 (489,1; 588,2)	770,2 (687,2; 785,1)	621,1 (555; 724,2)
2. Оперовані	180,7 ^{а)} (172,5; 222)	248,5 ^{а)} (200; 274,4)	0 ^{а)} (0; 0)	0 ^{а)} (0; 0)
3. Гіпертрофія передміхурової залози	805,4 ^{а), б)} (793,3; 856,5)	899,4 ^{а), б)} (759,1; 986,2)	925,1 ^{а), б)} (915,2; 956,1)	810,5 ^{а), б)} (718,1; 859,4)
4. Гіпертрофія передміхурової залози + Олія насіння гарбуза	777,2 ^{а), б)} (725; 810,1)	731,2 ^{а), б)} (717,5; 795,1)	836,8 ^{а) б)} (782,3; 914,4)	723,5 ^{б), в)} (703,4; 791,3)
5. Гіпертрофія передміхурової залози + Супозиторії комбінованого складу	604,7 ^{а), б), в), г)} (518,7; 675,1)	758,9 ^{а) б)} (705,4; 827,3)	640,6 ^{б), в), г)} (588,9; 744,4)	666,9 ^{б)} (595,1; 709,6)

Примітка. ^{а)} $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; ^{б)} $p < 0,05$ порівняно з групою оперованих тварин; ^{в)} $p < 0,05$ порівняно з групою ГПЗ; ^{г)} $p < 0,05$ порівняно з групою ГПЗ + ОНГ.

Після застосування СКС щурам з гіперплазією простати виразність гіпертрофії ацинусів простатичних залоз візуально зменшилась. Лише частина ацинусів залозок, локалізованих як у ВЧ, так і ДЛЧ ПЗ були збільшені. У передній частці зберігалася виразність гіпертрофії кінцевих відділів (рис. 4).

Гіпертрофія ацинусів залозок у значно меншому ступені, ніж у позитивного контролю супроводжувалася проліферацією епітелію. Практично відсутнє розташування епітеліальних клітин у декілька рядів, реєструється зсув ядер з базальних до центральних відділів клітин, менше видно розростання папілярних виростів епітелію. Стан секрету в просвіті ацинусів був більш наближеним до нормального. Зменшена наявність ацинусів залозок (3–4 тип) з відшарованими апікальними відділами епітеліальних клітин (еозинофільні «утворення») та їхня чисельність. Відсутня десквамація клітин, втім у деяких ацинусах має місце доволі виразна вакуолізація епітелію (рис. 5).

Про зменшення ознак гіпертрофії в групі ГПЗ + СКС свідчить і зменшення на 24,9 % периметра ацинусів, локалізованих у вентральній частці ПЗ, та на

15,6 %, 30,8 % і 17,7 % (відповідно 3–5 типу залозок) у ДЛЧ порівняно з позитивним контролем. Однак переважна більшість кінцевих відділів простатичних залозок ще не досягала інтактного рівня за виключенням ацинусів залозок 5 типу (табл. 2).

Після введення щурам з ГПЗ препарату порівняння, супозиторіїв з ОНГ, на

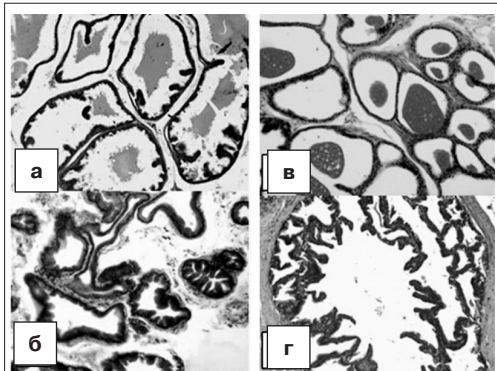


Рис. 4. Передміхурова залоза гонадектомованого щура, якому на тлі стимуляції тестостерону пропіонатом вводили супозиторії комбінованого складу. Різні за виразністю ознаки гіпертрофії ацинусів простатичних залозок, локалізованих у дорсолатеральній (а-в – 3, 4, 5 тип) та передній (г) частині залози. Гематоксилін-еозин. $\times 200$

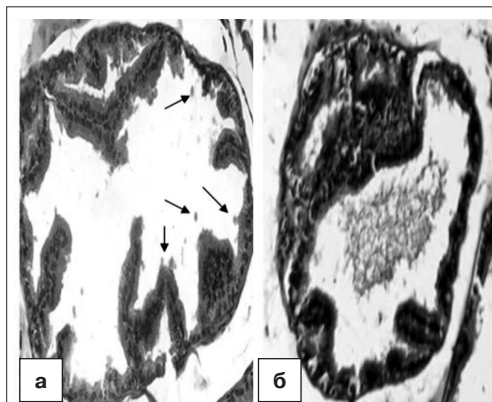


Рис. 5. Передміхурова залоза гонадектомованого щура, якому на тлі стимуляції тестостерону пропіонатом вводили супозиторії комбінованого складу. В ацинусах простатичних залозок, локалізованих у ДЛЧ ПЗ (4 тип): відсутність десквамації епітелію, виразне зменшення відшарованих апікальних відділів клітин (а); вакуолізація цитоплазми епітелію (б). Гематоксилін-еозин. $\times 250$

гістологічних зрізах зберігалися ознаки гіпертрофії значної кількості ацинусів простатичних залозок у всіх досліджених частках ПЗ (рис. 6). Нерідко можна було бачити очагову проліферацію з порушенням розташування в низці епітеліальних клітин. У частині ацинусів збереглися збільшеними видовжені епітеліальні вирости (рис. 7). Мали місце й доволі помітні непрямі ознаки часткової зміни типу секреції, пов'язані з надмірним підвищенням секреторної активності епітелію – відшаровані апікальні відділи клітин у просвіті ацинусів залозок (3–4 тип), поява злущених клітин (хоча і в меншому ступені, ніж у позитивного контролю). Також спостерігали вакуолізацію епітелію в деяких ацинусах (рис. 8) і наявність запальних реакцій периваскулярно у стромі ДЛЧ поблизу сім'явиносної протоки.

Морфометрія гістологічних зрізів показала, що в щурів з ГПЗ застосування супозиторіїв з ОНГ не позначилося на периметрі ацинусів простатичних залозок ВЧ ПЗ, а зменшення показника в ДЛЧ залозок усіх типів не було статистично достовірним.

Порівняння результатів терапії супозиторіями з ОНГ або СКС показує більшу ефективність останніх за більшістю проаналізованих морфологічних ознак.

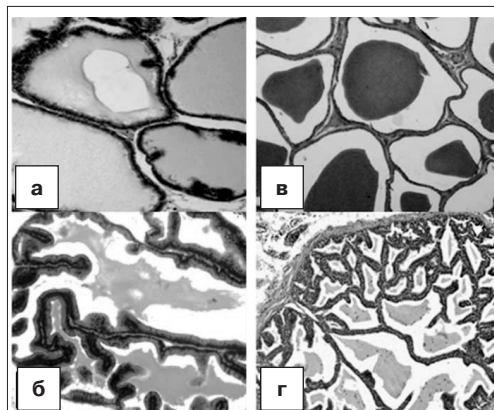


Рис. 6. Передміхурова залоза гонадектомованого щура, якому на тлі стимуляції тестостерону пропіонатом вводили супозиторії з олією насіння гарбуза. Гіпертрофія частини ацинусів, локалізованих у дорсолатеральній (а–в – 3–5 тип) і передній (г) частках. Гематоксилін-еозин. $\times 100$

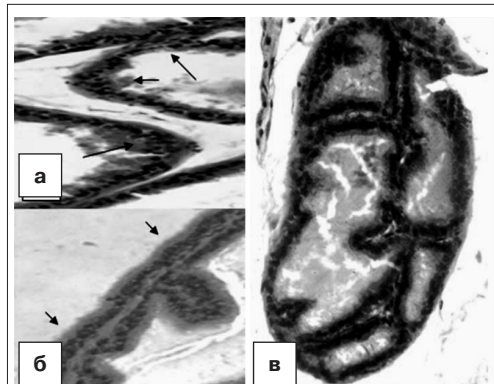


Рис. 7. Передміхурова залоза гонадектомованого щура, якому на тлі стимуляції тестостерону пропіонатом вводили супозиторії з олією насіння гарбуза. Проліферація епітелію в стінці ацинусів різних простатичних залоз, порушення розташування клітин у ряді (а–б – 1 тип, 3 тип). Виразне видовження епітеліальних виростів (в – 4 тип). Гематоксилін-еозин. а – $\times 400$, б – $\times 250$, в – $\times 200$

Вважають доведеним, що ДГПЗ – поліетіологічне, залежне від віку захворювання, в основі якого лежить порушення гормональної регуляції росту, диференціації та функціонування ПЗ [1]. Компенсаторне зростання активності ферментів метаболізму тестостерону за його дефіциту зумовлює підвищене утворення 5 α -відновлених та ароматизованих метаболітів андрогена. Один з них – 5 α -дигідротестостерон (5 α -ДГТ) – регулює ріст простати та

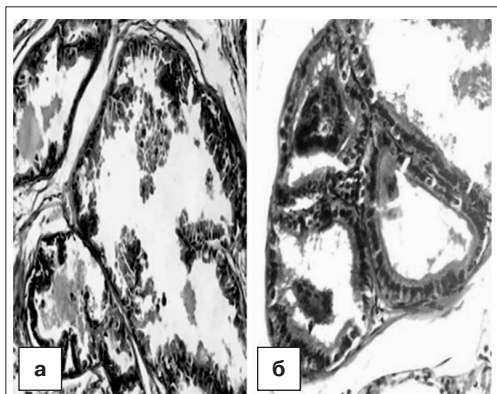


Рис. 8. Передміхурова залоза гонадектомованого щура, якому на тлі стимуляції тестостерону пропіонатом вводили супозиторії з олією насіння гарбуза. В ацинусах простатичних залозок, локалізованих у ДЛЧ (4 тип), у просвіті серед злущеного епітелію видно багато еозинофільних округлих «утворень» (а – $\times 250$), вакуолізацію епітелію (б – $\times 400$). Гематоксилін-еозин

індукує залозисту гіперплазію ПЗ, тоді як стромальна гіперплазія регулюється естрогенами [18].

Існують повідомлення, що ІЗК, який входить до складу СКС, та його метаболіт DIM, в андрогенозалежних клітинах раку простати проявляють антиандрогенні та антипроліферативні властивості. Одним з механізмів цього є повна блокада взаємодії ДГТ та ядерної ДНК, через що DIM знижує експресію андрогензалежних генів [19, 20]. Крім того, ІЗК, зв'язуючись з арилкарбоновими рецепторами, сприяє посиленню експресії CYP1A1 – ізоформи цитохрому P450, що перетворює естрон у 2-гідрокіестрон (2-ОНЕ1), при зростанні рівня якого спостерігається тенденція до загибелі клітин гормонозалежних пухлин та перешкоджається їхнє подальше утворення [21]. Такі властивості складової СКС пояснюють позитивні зміни морфологічної струк-

тури ПЗ з тестостерон-індукованою гіперплазією.

Зменшення проявів запалення стромы залози, що спостерігалось в щурів, які отримували СКС, скоріше за все є проявом протизапальної дії мелоксикаму, що вдало доповнює антигормональний коригуючий ефект супозиторіїв з огляду на дуже поширене сполучення хронічного простатиту та ДГПЗ.

Результати дослідження дають підставу вважати застосування СКС ефективним щодо відновлення структури ПЗ, а отримані результати – теоретичним обґрунтуванням доцільності подальшої розробки відповідного лікарського засобу для лікування та профілактики ДГПЗ у чоловіків.

Висновки

1. Внаслідок андрогенної стимуляції в гонадектомованих щурів виникає виразна гіпертрофія ацинусів простатичних залозок усіх досліджених часток ПЗ з ознаками гіперплазії залозистого епітелію (багаторядність, видовження, гіллястість епітеліальних виростів). Деінде відбувалася часткова зміна типу секреції в ацинусах (умовно 4 типу) з мерокринного на апокринний. Отримані мікроскопічні дані відповідають ознакам доброякісної гіперплазії залози.
2. Після курсового застосування СКС у щурів з ТсП-індукованою гіперплазією простати морфологічні ознаки гіперплазії ПЗ, зокрема, гіпертрофії ацинусів простатичних залозок у ВЧ і ДЛЧ залози, зменшуються, є наявними прояви гіперплазії залозистого епітелію.
3. За більшістю морфологічних ознак, що аналізувалися, ефект застосування СКС переважає такий референтного препарату.

1. Epidemiology and risk factors of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction / A. E. Calogero [et al.] // The Aging Male. – 2018. – V. 22, № 1. – P. 12–19.
2. The development of human benign prostatic hyperplasia with age / S. J. Berry [et al.] // The Journal of urology. – 1984. – V. 132, № 3. – P. 474–479.
3. Vuichoud C. Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation / C. Vuichoud, K. R. Loughlin // Can J Urol. – 2015. – V. 22, № 1. – P. 1–6.
4. Paolone D. R. Benign prostatic hyperplasia / D. R. Paolone // Clinics in geriatric medicine. – 2010. – V. 26, № 2. – P. 223–239.
5. Новый взгляд на химиопрофилактику и терапию рака предстательной железы / И. И. Горпинченко [и др.] // Здоровье мужчины. – 2013. – № 3. – С. 16–24.

6. Mobley D. Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: evaluation and treatment / D. Mobley, A. Feibus, N. Baum // Postgraduate medicine. – 2015. – V. 127, № 3. – P. 301–307.
7. EAU guidelines on the assessment of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction / C. Gratzke [et al.] // European urology. – 2015. – V. 67, № 6. – P. 1099–1109.
8. Allkanjari O. What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia? / O. Allkanjari, A. Vitalone // Life sciences. – 2015. – V. 126. – P. 42–56.
9. Indole-3-carbinol inhibition of androgen receptor expression and downregulation of androgen responsiveness in human prostate cancer cells / J. C. Hsu [et al.] // Carcinogenesis. – 2005. – V. 26, № 11. – P. 1896–1904.
10. Безопасность и фармакокинетика новой фармацевтической композиции на основе дииндол-лилметана в виде суппозитория / В. И. Киселев, В. М. Друх, И. Н. Кузнецов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16081>.
11. Absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane: human use in HPV-related, benign and pre-cancerous conditions / M. A. Zeligs [et al.] // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. – 2003. – V. 43. – P. 3198.
12. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-in/laws/main.cgi?nreg=994_137.
13. Beneficial Effect of a Multifunctional Polyphytochemical in Experimental Prostatic Hyperplasia in Rats / M. Kantah [et al.] // Clin Pharmacol Biopharm. – 2017. – V. 6, № 169. – 7 p.
14. Лар'яновська Ю. Б. Морфоструктура передміхурової залози білих лабораторних щурів / Ю. Б. Лар'яновська, Н. В. Котелевець // Медицина сегодня и завтра. – 2005. – № 1. – С. 12–14.
15. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – Киев : МОРИОН, 2001. – 408 с.
16. Кабанова И. В. Общность кровоснабжения мочевого пузыря и предстательной железы, как один из факторов взаимной индукции функциональных расстройств. Дисс. канд. биол. наук / И. В. Кабанова. – Москва, 2016. – 154 с.
17. Шубникова Е. А. Эпителиальные ткани / Е. А. Шубникова. – Москва : МГУ, 1996. – 250 с.
18. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5 α -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia / G. Andriole [et al.] // The Journal of urology. – 2004. – V. 172, № 4. – P. 1399–1403.
19. Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane Is a Strong Androgen Antagonist in Human Prostate Cancer Cells / H. T. Le [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278, № 23. – P. 21136–21145.
20. Synthetic dimer of indole-3-carbinol: Second generation diet derived anticancer agent in hormone sensitive prostate cancer / V. P. S. Garikapaty [et al.] // The Prostate. – 2006. – V. 66, № 5. – P. 453–462.
21. 3, 3'-Diindolylmethane (DIM) induces a G1 cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21WAF1/CIP1 expression / C. Hong [et al.] // Carcinogenesis. – 2002. – V. 23, № 8. – P. 1297–1305.

Г. В. Зайченко, Т. Б. Равшанов

Ефективність супозиторіїв з індол-3-карбінолом і мелоксикамом за тестостерон-індукованої гіперплазії передміхурової залози в щурів

Мета дослідження – визначення протастопротекторної активності оригінальної фармацевтичної композиції у вигляді ректальних супозиторіїв з індол-3-карбінолом і мелоксикамом.

Для відтворення доброякісної гіперплазії передміхурової залози було обрано тестостеронову модель патології на кастрованих самцях лабораторних щурів. Компенсаторне зростання активності внутрішньоклітинних ферментів передміхурової залози за дефіциту тестостерону призводить до підвищення утворення 5 α -відновлених ароматичних метаболітів, зокрема, 5 α -дигідротестостерону, що зумовлюють збільшення простати та індукують залозисту гіперплазію. Ступінь корекції патологічних змін у передміхуровій залозі оцінювали за гістологічними показниками.

Показано, що застосування супозиторіїв комбінованого складу має протизапальний ефект, зменшує виразність гіпертрофії ацинусів простатичних залоз, мінімізує проліферацію епітелію та його папілярне розростання в більшому ступені, ніж у разі референтного засобу (супозиторії з олією насіння гарбуза), що підтверджується морфометрично. Після курсового застосування виявлено нормалізацію кінцевих відділів простатичних залоз 5 типу та стану секрету в просвіті ацинусів, відсутність десквамації клітин. Зазначені зміни дозволяють припустити наявність специфічних протастопротекторних і гормономодуючих властивостей у запропонованій комбінації діючих речовин.

Отримані результати обґрунтовують перспективність впровадження в медичну практику оригінальної фармацевтичної композиції у вигляді ректальних супозиторіїв індол-3-карбінолу та мелоксикаму, зокрема, для терапії доброякісної гіперплазії простати.

Ключові слова: тестостерон-індукована гіперплазія, передміхурова залоза, ректальні супозиторії, індол-3-карбінол, мелоксикам, морфоструктура

А. В. Зайченко, Т. Б. Равшанов

Эффективность суппозиторий с индол-3-карбинолом и мелоксикамом при тестостерон-индуцированной гиперплазии предстательной железы у крыс

Цель исследования – определение простатопротекторной активности оригинальной фармацевтической композиции в виде ректальных суппозиторий с индол-3-карбинолом и мелоксикамом.

Для воспроизведения условий доброкачественной гиперплазии предстательной железы была выбрана тестостероновая модель патологии на кастрированных самцах лабораторных крыс. Компенсаторное повышение активности внутриклеточных ферментов предстательной железы при дефиците тестостерона приводит к повышению образования 5 α -восстановленных и ароматических метаболитов, в частности 5 α -дигидротестостерона, обуславливает увеличение объема простаты и индуцирует железистую гиперплазию. Степень коррекции патологических изменений в предстательной железе оценивали по гистологическим показателям.

Показано, что применение суппозиторий комбинированного состава оказывает противовоспалительный эффект, уменьшает выраженность гипертрофии ацинусов простатических желез, минимизирует пролиферацию эпителия и его папиллярные разрастания в большей степени, чем референтный препарат (суппозитории с маслом семян тыквы), что подтверждается морфометрически. После курсового применения обнаружена нормализация конечных отделов простатических желез 5 типа и состояния секрета в просвете ацинусов, отсутствие десквамации клеток. Указанные изменения позволяют предположить наличие специфических простатопротекторных и гормонотропных свойств у предлагаемой комбинации действующих веществ.

Полученные результаты обосновывают перспективность внедрения в медицинскую практику оригинальной фармацевтической композиции в виде ректальных суппозиторий, содержащих индол-3-карбинол и мелоксикам, в частности для терапии доброкачественной гиперплазии простаты.

Ключевые слова: тестостерон-индуцированная гиперплазия, предстательная железа, ректальные суппозитории, индол-3-карбинол, мелоксикам, морфоструктура

G. V. Zaychenko, T. B. Ravshanov

Effectiveness of suppositories with indole-3-carbinol and meloxicam in testosterone-induced prostate hyperplasia in rats

The aim of study was to determine prostate-protective activity of the original pharmaceutical composition of indole-3-carbinol and meloxicam in form of rectal suppositories.

To reproduce of benign prostatic hyperplasia testosterone-induced model on gonadectomized males laboratory rat was selected. The compensatory increase of prostate's intracellular enzymes activity with testosterone deficiency leads to an increase of 5 α -reduced and aromatic metabolites formation, include 5 α -dihydrotestosterone. It causes an increase of prostate volume and induces glandular hyperplasia. The degree of pathological changes and its correction was assessed by histological parameters.

It has been shown that the use of combined composition suppositories has more pronounced anti-inflammatory and antiproliferative effect than the reference drug (suppositories with pumpkin seed oil). These were confirmed by morphological data, namely by reduction severity of the prostatic acini hypertrophy, minimization of epithelium proliferation and its papillary growths. The normalization of end sections of prostatic glands type 5 and the state of secret in acini ducts, the absence of cell desquamation were detected after treatment course. These changes suggest presence of specific prostate-protective and hormone-modulating properties of proposed active substances combination.

The results obtained substantiate prospects of introducing in medical practice original pharmaceutical composition in form of rectal suppositories containing indole-3-carbinol and meloxicam, in particular for the benign prostatic hyperplasia treatment.

Key words: testosterone-induced hyperplasia, prostate, rectal suppositories, indole-3-carbinol, meloxicam, morphological structure

Надійшла: 2 січня 2019 р.

Контактна особа: Зайченко Ганна Володимирівна, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ. Тел.: + 38 0 44 454 49 24. Електронна пошта: anna.zajchenko@gmail.com

В. Д. Лук'янчук, Т. А. Бухтіарова, Є. М. Поліщук

Фармакокінетичний аналіз розподілу потенційного церебропротектора «Цереброгерм» з центральної камери в периферичні на моделі черепно-мозкової травми в щурів

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

Ключові слова: *Цереброгерм, фармакокінетика, церебропротекторна активність, закрыта черепно-мозкова травма*

Проблема закритої черепно-мозкової травми (ЗЧМТ) за воєнних дій на Донбасі набула особливого медико-соціального значення як в плані інвалідизації, так і смертності, оскільки є лідером серед травм різних локалізацій, випереджаючи в структурі смертності пухлини та серцево-судинні захворювання [1]. Важливо, що наслідки ЗЧМТ можуть сприяти виникненню наростаючої атрофії мозкової тканини та бути основою прогресування захворювання в посттравматичному періоді [2–4].

За вибору адекватної лікарської терапії ЗЧМТ ефективною видається індивідуальна патогенетично обґрунтована стратегія застосування фармакологічних засобів з багатовекторними фармакодинамічними ефектами та оптимальними фармакокінетичними параметрами. Усе це диктує нагальну необхідність пошуку та розробки оригінальних засобів фармакокорекції низки структурно-функціональних порушень, що виникають за умов цього екстремального стану.

Останніми роками фармакологи приділяють велику увагу координаційним сполукам германію, що характеризуються широким спектром фармакологічної дії, у тому числі й церебропротекторними властивостями [5–7]. У скринінговій серії досліджень було доведено, що серед уперше синтезованих германій-умісних координаційних сполук найвищу церебропротекторну актив-

ність на моделі ЗЧМТ проявляє сполука біс(цитрато)германат заліза, яка отримала робочу назву «Цереброгерм» [8–9].

Раніше отримані в експерименті дані [12] є підтвердженням того, що застосування Цереброгерму на тлі ЗЧМТ збільшує проникність гістогематичних бар'єрів, регулюючи, таким чином, надходження до тканин і клітин енергетичних і пластичних речовин. З огляду на це, особливу увагу привертає саме вивчення параметрів розподілу Цереброгерму з центральної камери до периферичних, тобто в органи й тканини.

Усе вищезазначене стало теоретичним обґрунтуванням та визначило практичну доцільність проведення доклінічних фармакокінетичних досліджень Цереброгерму. *Мета дослідження* – вивчити фармакокінетику Цереброгерму на етапі його розподілу з системного кровотоку в органи та тканини щурів з ЗЧМТ.

Матеріали та методи. Досліди виконані на 60 білих статевозрілих нелінійних щурах обох статей масою 170–210 г згідно з методичними рекомендаціями ДП «Державний експертний центр МОЗ України» [10]. Експериментальною моделлю ЗЧМТ був патологічний процес, що відповідає механічному ушкодженню головного мозку середнього ступеня тяжкості [11] та розвивається в тварин на тлі нанесення дозованого за силою та орієнтованого за локалізацією удару вільнопадаючим вантажем масою 45 г на тім'яну ділянку черепа щурів, які знаходилися в стані легкого ефірного наркозу та були зафіксовані в камері Когана за допомогою спеціального пристрою оригінальної конструкції [12].

Даний фрагмент фармакокінетичних досліджень проведено в повній відповідності до методичних рекомендацій [13] шляхом визначення концентрацій Цереброгерму за вмістом германію у тканинах щурів без патології (норма) та в тварин з ЗЧМТ, що отримували Цереброгерм за раніше описаною методикою [14].

Забір зразків біоматеріалу для визначення фармакокінетичного профілю Цереброгерму здійснювали в динаміці: через 0,5; 2; 6; 12 та 24 год з моменту одноразового внутрішньоочеревинного введення щурам у раніше встановленому режимі дозування 126 мг/кг [17].

З метою проведення в максимально коректному форматі порівняльного аналізу за умов експерименту визначали низку наступних фармакокінетичних показників, що характеризують перехід сполуки з центральної камери до периферичних: період напіврозподілу в орган ($t_{1/2,a}$, год), константу швидкості прямого масопереносу (K_{12} , год⁻¹), константу швидкості зворотного масопереносу (K_{21} , год⁻¹), об'єм розподілу в центральній камері (V_d , л), площу під фармакокінетичною кривою (AUC, мг · год · мл⁻¹).

Параметри фармакокінетики Цереброгерму обчислювали за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0 у рамках одночасткової моделі зі всмоктуванням [13, 15, 16]. Отримані результати обробляли статистично на персо-

нальному комп'ютері з використанням t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення. Отримані експериментальні та розрахункові фармакокінетичні параметри, що характеризують процес розподілу церебропротектора з центральної камери, тобто з системного кровообігу до периферичних камер (органи, тканини) за умов експерименту надано в таблиці.

Встановлено, що в щурів після моделювання в них черепно-мозкової травми закритого типу період напіврозподілу Цереброгерму на 19,6 % менший порівняно з «нормою». Поясненням встановлених в експерименті змін цього фармакокінетичного параметра може бути зміна проникності гістогематичних бар'єрів для ксенобіотиків під дією фізіологічно-активних речовин, що утворюються в організмі в надлишкових кількостях і здатні порушувати трансбар'єрний біотранспорт речовин за умов форми механічної травми, що вивчається.

Не виключено, що, з урахуванням чинних теорій щодо механізмів кровопостачання внутрішніх органів і тканин за умов такого важкого невідкладного стану, як ЗЧМТ, можуть мати місце центральні порушення регуляції судинного тону. У результаті цього тону судин різко знижується та виникає виражена вазодилатація як резистивних, так і венозних судин. Усе це, як

Таблиця

Фармакокінетичні параметри, що характеризують процес розподілу Цереброгерму з центральної камери в периферичні за умов його внутрішньоочеревинного введення в дозі 126 мг/кг ($M \pm m$, $n = 6$)

Параметр	Позначення, розмірність	Група тварин	
		норма	закрита черепно-мозкова травма
Період напіврозподілу	$t_{1/2,a}$, год	$2,45 \pm 0,12$	$1,97 \pm 0,11^*$
Константа швидкості зворотного масопереносу	K_{21} , год ⁻¹	$0,47 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,03^{**}$
Константа швидкості прямого масопереносу	K_{12} , год ⁻¹	$0,39 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02^*$
Об'єм розподілу в центральній камері	V_d , л	$0,84 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,06$
Площа під фармакокінетичною кривою	AUC, мг · год · мл ⁻¹	$247,62 \pm 12,43$	$202,57 \pm 12,19^*$

Примітка. * $p < 0,05$ порівняно зі здоровими тваринами (норма), ** $p < 0,01$ порівняно зі здоровими тваринами (норма).

відомо, лежить в основі патогенезу формування колапсу, який є невід'ємною складовою шоку в разі травм різного генезу і особливо механічного пошкодження структур мозку, які причетні до процесу регуляції кров'яного тиску в судинах.

Значна увага приділялась аналізу такого параметра, як швидкість прямого масопереносу Цереброгерму, тобто, його переходу з крові в органи за умов експерименту. Отримані результати (таблиця) свідчать, що за ЗЧМТ величина даного параметра суттєво (на 20,5 %) збільшується порівняно з «нормою» ($p < 0,05$). Виявлена різниця між величинами констант швидкості прямого масопереносу Цереброгерму в нормі та за умов ЗЧМТ віддзеркалює характер змін періоду напіврозподілу потенційного церебропротектора за умов експерименту. Тобто, у разі травмування голови потенційний церебропротектор з крові в тканини розподіляється з більшою швидкістю (за менший час), ніж у нормі.

Достатньо вагому зацікавленість викликають і результати порівняльної оцінки константи швидкості зворотного масопереносу, які наведено в таблиці. Показано, що в щурів з ЗЧМТ реєструється вірогідне ($p < 0,01$) збільшення величини даного параметра відносно групи «здорових» тварин на 31,9 %. Такий характер змін швидкості переходу Цереброгерму після отриманої ЗЧМТ з органів і тканин у центральний кровообіг зумовлений, на нашу думку, зменшенням активності ключових компонентів системи антиоксидантного захисту, а отже й зміщенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік перекисних процесів. Це, звісна річ, призводить до дисбалансу в системі захисних механізмів взагалі та врешті-решт сприяє, як нам видається, збільшенню проникності майже всіх гістогематичних бар'єрів не тільки для ендогенних речовин, але й для ксенобіотиків, у тому числі й для Цереброгерму.

Беззаперечний інтерес викликає аналіз величин, що характеризують об'єм розподілу в центральній камері. Встановлено, що в обох групах цей параметр знаходиться практично на одна-

ковому рівні, а отже й різниця між групою «нормальних» і травмованих щурів не є вірогідною ($p > 0,05$). З цього випливає, що такий вид травми, як ЗЧМТ, не чинить суттєвого впливу на показник співвідношення загальної кількості Цереброгерму в організмі до його концентрації в крові.

У подальшому ми вважали за доцільне надати порівняльну оцінку й такому ключовому фармакокінетичному параметру, як площа під кінетичною кривою, яку побудовано за результатами визначення кінетики концентрацій Цереброгерму в крові щурів у «нормі» і за ЗЧМТ. Величини AUC розраховані в обох групах на підставі кривих, що побудовані в координатах «концентрація – час».

Варто зазначити, що параметр AUC суттєво відрізняється в обох порівнюваних групах. Так, у тварин, що отримали механічну травму голови, величина AUC на 18,2 % менше ($p < 0,05$), ніж у «нормі».

Висновок

Таким чином, порівняльний аналіз отриманих в експерименті даних, які характеризують центральний етап фармакокінетики Цереброгерму – його розподіл з центральної камери (кров) у периферичні (органи, тканини), дозволяє дійти висновку, що за умов травматичного пошкодження головного мозку середнього ступеня тяжкості має місце модифікація низки параметрів фармакокінетики потенційного церебропротектора: достовірно збільшуються константи швидкості прямого та зворотного масопереносів, зменшується період напіврозподілу та площа під фармакокінетичною кривою порівняно з нормою. Це може зумовлювати швидку реалізацію фармакотерапевтичного ефекту досліджуваної координаційної сполуки германію за умов даного екстремального стану.

Щиро вдячні співробітникам кафедри загальної хімії та полімерів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова та особисто професору І. І. Сейфулліній за синтез і надану можливість вивчати низку нових координаційних сполук германію.

1. Беленичев И. Ф. Современные направления нейропротекции в терапии острого периода патологии головного мозга различного генеза / И. Ф. Беленичев, Н. В. Бухтиярова, А. Д. Середа // Международный неврологический журнал. – 2010. – № 2 (32). – С. 76–86.
2. Живолупов С. А. Патогенетические механизмы травматической болезни головного мозга и основные направления их коррекции / С. А. Живолупов, И. Н. Самарцев, С. В. Коломенцев // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2009. – Т. 109, № 10. – С. 42–46.
3. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесников [и др.]. – Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009. – 262 с.
4. Черний В. И. Современная концепция церебропротекции: основные положения и спорные моменты / В. И. Черний // Здоров'я України. – 2008. – № 23 (1). – С. 7–8.
5. Чадова Л. В. Влияние нового потенциального церебропротектора – МИГУ-1 на состояние антиоксидантного профиля в условиях острой цереброваскулярной недостаточности / Л. В. Чадова // Фармацевтический журнал. – 2007. – № 6. – С. 164–168.
6. Скринінг і порівняльна оцінка протиішемної ефективності серед координаційних сполук германію при гострій церебро-васкулярній недостатності / В. Д. Лук'ячук, І. О. Житіна, І. Й. Сейфулліна [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1–2 (14–15). – С. 61–64.
7. Порівняльна протигіпоксична активність координаційних сполук германію / В. Д. Лук'ячук, А. А. Шутка, І. Й. Сейфулліна [та ін.] // Одеський медичний журнал. – 2010. – № 2. – С. 11–14.
8. Порівняльна оцінка церебропротекторної активності вперше синтезованих координаційних сполук біс(цитрато)германатів(станатів) на скринінговій моделі закритої черепно-мозкової травми / В. Д. Лук'ячук, Є. М. Поліщук, І. Й. Сейфулліна [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – №2(38). – С. 36–43.
9. Патент 96363 Україна, МПК (2015.01) A61K 33/00 G09B 23/00. Спосіб фармакотерапії травматичного пошкодження головного мозку / Лук'ячук В. Д., Поліщук Є. М., Сейфулліна І. Й., Рисухіна Н. В., Марцинко О. Е., Чебаненко О. А.; винахідники та власники Лук'ячук В. Д., Поліщук Є. М., Сейфулліна І. Й., Рисухіна Н. В., Марцинко О. Е., Чебаненко О. А. – № 96363, у 2014 01462; заявл. 14.02.2014; опубл. 10.02.2015, Бюл. № 3. – 7 с.
10. Доклинические исследования лекарственных средств : метод. рекоменд.; под ред. чл.-корр. АМН Украины А. В. Стефанова. – Киев, 2002. – 567 с.
11. Патент на корисну модель 13678, Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання черепно-мозкової травми / В. Д. Лук'ячук, О. В. Шевчук, О. В. Бадінов. – № у 2005 09483; Заявл. 10.10.05; Опубл. 17.04.06, Бюл. № 4. – 8 с.
12. Поліщук Є. М. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування нової координаційної сполуки цереброгерм для лікування травматичного пошкодження головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : 14.03.05 фармакологія / Є. М. Поліщук. – Луганськ–Рубіжне, 2015. – 20 с.
13. Методические рекомендации по компьютерным расчетам фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейные частевые модели) / Н. Я. Головенко, В. Д. Лук'ячук, О. В. Жук [и др.]. – Киев : Государственный научно-экспертный центр лекарственных средств, 1999. – 70 с.
14. Кресюн В. Й. Екстракційно-фотометричне визначення мікро кількостей германію у тканинах експериментальних тварин / В. Й. Кресюн, А. Г. Відавська, К. Ф. Шемонаєва // Одеський медичний журнал. – 2000. – № 6 (62). – С. 7–11.
15. Кравец Д. С. Расчет фармакокинетических параметров ксенобиотиков с помощью ПЭВМ / Д. С. Кравец // V Національний з'їзд фармацевтів України «Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті»: тези доп. – Харків, 1999. – С. 679–680.
16. Лук'ячук В. Д. Введение в общую фармакокинетику (учебное пособие) / В. Д. Лук'ячук, Д. С. Кравец. – Луганськ : ФЛП, 2011. – 115 с.
17. Полищук Е. Н. Экспериментально-математический анализ режима дозирования потенциального церебропротектора Цереброгерм / Е. Н. Полищук, Д. С. Кравец // Медицинский журнал Западного Казахстана. – 2014. – № 4 (44). – С. 26–31.

В. Д. Лук'ячук, Т. А. Бухтіарова, Є. М. Поліщук
Фармакокінетичний аналіз розподілу потенційного церебропротектора
«Цереброгерм» за центральної камери в периферичні на моделі черепно-
мозкової травми в щурів

У статті наведено порівняльний аналіз фармакокінетичного профілю потенційного церебропротектора «Цереброгерм» за умов його внутрішньоочеревинного введення в дозі 126 мг/кг на етапі розподілу з центральної камери в периферичні в нормі та на моделі закритої черепно-мозкової травми (ЗЧМТ) у щурів. ЗЧМТ моделювали шляхом нанесення дозованого за силою та орієнтованого за локалізацією удару вільнопадаючим вантажем масою 45 г на тім'яну ділянку черепа тварин, що знаходилися під легким ефірним наркозом у спеціальній камері. Визначено низку параметрів, що характеризують перехід сполуки з системного кровотоку до органів і тканин, а саме: період напіврозподілу, константи швидкості прямого та зворотного масопереносу, об'єм розподілу в центральній камері та площа під фармакокінетичною кривою.

Доведено, що за умов травматичного ушкодження головного мозку відбувається вірогідна ($p < 0,05$ – $0,01$) трансформація практично всіх вивчених параметрів кінетики Цереброгерму з центральної камери в органи та тканини, за винятком об'єму розподілу сполуки в кров'яному руслі порівняно з тваринами без травми. Важливо підкреслити, що за ЗЧМТ такі параметри фармакокінетики, як період напіврозподілу та площа під фармакокінетичною кривою зменшуються, а константи швидкості прямого та зворотного

масопереносів збільшуються порівняно з нормою на 20,5 і 31,9 % відповідно. Така модифікація фармакокінетики Цереброгерму відображується на швидкості реалізації церебропротекторної дії за умов експерименту. В основі механізмів формування змін швидкості прямого та зворотного масопереносу потенційного церебропротектора на тлі ЗЧМТ найвірогідніше лежить дисбаланс у системі функціонування гістогематичних бар'єрів внаслідок порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

Ключові слова: Цереброгерм, фармакокінетика, церебропротекторна активність, закрита черепно-мозкова травма

В. Д. Лукьянчук, Т. А. Бухтиарова, Е. Н. Полищук

Фармакокинетический анализ распределения потенциального церебропротектора «Цереброгерм» из центральной камеры в периферические на модели черепно-мозговой травмы у крыс

В статье приведен сравнительный анализ фармакокинетического профиля потенциального церебропротектора «Цереброгерм» в условиях его внутрибрюшинного введения в дозе 126 мг/кг на этапе распределения из центральной камеры в периферические в норме и на модели закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ) у крыс. ЗЧМТ моделировали путем нанесения дозированного по силе и ориентированного по локализации удара свободно падающим грузом массой 45 г на теменной участок черепа животных, находящегося под легким эфирным наркозом в специальной камере. При этом определен ряд параметров, характеризующих переход изучаемого соединения из системного кровотока в органы и ткани, а именно: период полураспределения, константы скорости прямого и обратного масопереноса, объем распределения в центральной камере и площадь под фармакокинетической кривой.

Доказано, что в условиях травматического повреждения головного мозга происходит достоверная ($p < 0,05-0,01$) трансформация практически всех изучаемых параметров кинетики Цереброгерма из центральной камеры в органы и ткани, за исключением объема распределения соединения в кровяном русле по сравнению с животными без травмы. Важно подчеркнуть, что при ЗЧМТ такие параметры фармакокинетики, как период полураспределения и площадь под фармакокинетической кривой уменьшаются, а константы скорости прямого и обратного масопереноса увеличиваются в сравнении с нормой на 20,5 и 31,9 % соответственно. Такая модификация фармакокинетики Цереброгерма отражается на скорости реализации церебропротекторного действия в условиях эксперимента. В основе механизмов изменений скоростей прямого и обратного масопереноса потенциального церебропротектора на фоне ЗЧМТ наиболее вероятно лежит дисбаланс в системе функционирования гистогематических барьеров в силу нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия.

Ключевые слова: Цереброгерм, фармакокинетика, церебропротекторная активность, закрытая черепно-мозговая травма

V. D. Lukyanchuk, T. A. Bukhtiarova, Ye. M. Polishchuk

Pharmacokinetic analysis of the distribution of a potential cerebroprotector «Cerebrogerm» from the central chamber to the peripheral on the model of craniocerebral trauma in rats

In the article a comparative analysis of the pharmacokinetic profile of the potential cerebroprotective agent «Cerebrogerm» is provided for intraperitoneal administration at a dose of 126 mg/kg at the distribution stage from the central chamber to the peripheral in normal state and on the model of closed craniocerebral trauma (CCCT) in rats. Based on experimental data as to the concentration of germanium in blood and tissues there were calculated a number of parameters that characterize the transition of the studied compound from the systemic blood flow to organs and tissues, namely: the half-distribution period, the constants of the speed of direct and reverse mass transmissions, the volume of distribution in the central chamber and the area under the pharmacokinetic curve. CCCT was modeled by applying force-assisted and localized impact on a free-fall load of 45 grams per parietal area of the skull of animals that were under a light, etheric anesthesia in a special chamber.

It is proved that in the conditions of traumatic brain damage there is a significant ($p < 0,05-0,01$) transformation of practically all of the studied parameters of the Cerebrogerm kinetics from the central chamber to organs and tissues, except for the volume of distribution of the compound in the bloodstream in comparison with animals without injury. It is important to emphasize, that at CCCT such parameters of pharmacokinetics as the half-distribution period and the area under the pharmacokinetic curve decrease, and the constants of the speed of direct and reverse mass transmission increase by 20,5 and 31,9 %, respectively in comparison with such in the norm. Such a state of Cerebrogerm pharmacokinetics modification is reflected in the cerebroprotective action onset under these experimental conditions. The possible mechanism of changes in the velocity of direct and reverse mass transmission of the cerebroprotective agent under CCCT is most likely the imbalance in the functioning of histo-hematic barriers due to the violation of the prooxidant-antioxidant equilibrium.

Key words: Cerebrogerm, pharmacokinetics, cerebroprotective activity, closed craniocerebral trauma

Надійшла: 21 грудня 2018 р.

Контактна особа: Лук'янчук В. Д., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

Bashar Jabbar Ali Sahlane, I. V. Senyuk

Investigation of membrane stabilizing action of extracts from *Prunus domestica* fruits

National University of Pharmacy, Kharkiv

Key words: *Prunus domestica*, red blood cells membranes, spontaneous hemolysis, membrane stabilizing activity

Prunus domestica (family *Rosaceae*) is widespread horticultural crops in Ukraine. It has a lot breeds and takes one of the first places in quantity after apples, pears and cherries. In our previous research the qualitative and quantitative chemical composition of the *Prunus domestica* were determined. It was shown the presence of organic acids in the raw material (malate, citrate, chlorogenic, neochlorogenic and caffeic acids), anthocyanins, rutin, gallic acid, sugars and dietary fibers [1]. It is known, that plum fruits contain 6–17 % of sugars, up to 8 % of pectin substances, organic acids (malate, citrate, oxaloacetate, succinate, quinic acid) to 1,6 %, flavonoids, tannins, vitamins [2, 3] and fruits are widely used in alternative medicine for the treatment of gastrointestinal tract diseases (constipation and intestinal atony, bile stains, liver disease) [2]. Therefore, preliminary experimental studies were aimed to identify and confirm the laxative and hepatoprotective properties of four extracts from *Prunus domestica* fruits [4, 5]. The hepatoprotective effect was proved for two extracts: extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers (PE + Fibers), and extract from *Prunus domestica* fruits, containing polysaccharides (PE + Polysaccharides) [5]. The most evident hepatoprotective effect was detected at a dose of 200 mg/kg for both extracts.

The aim of this study was to investigate membrane stabilizing activity of two extracts from *Prunus domestica* fruits by their influence on spontaneous lysis of red blood cells (RBCs) membrane.

Materials and methods. The experiments were conducted on white nonlinear rats in accordance with the provisions of the «European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, 1986) and national ethical requirements (Kyiv, 2001) The study protocol was approved by Bioethics Commission of the National University of Pharmacy.

The rats were kept under standard vivarium conditions with natural light and diet recommended for this type of animal.

Twenty experimental animals were divided into four groups five rats each: 1 – intact control (IC); 2 – animals, treated (*per os*) with extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers (PE + Fibers) at a dose of 200 mg/kg during 3 days; 3 – animals, treated (*per os*) with extract from *Prunus domestica* fruits, containing polysaccharides (PE + Polysaccharides) at a dose of 200 mg/kg during 3 days; 4 – animals, treated with reference drug Silybor at a dose of 25 mg/kg for 3 days [6, 7].

On the fourth day of the experiment blood was collected from the tail vein of experimental animals. The membrane stabilizing activity of the extracts was studied using the F. C. Jager [7] method, which is based on the determination of the extinction of ectoglobular hemoglobin, entering the blood due to spontaneous lysis of red blood cells (RBCs) membrane caused by peroxidation of lipids with oxygen. The inhibition of RBCs hemolysis by investigated extracts was determined as described in [7, 8].

The blood was centrifuged and then cells were washed three times with 154 mM NaCl in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7,4) by centrifugation (10 min at 3000 g). Finally, RBCs were resuspended

Membrane stabilizing effect of the extracts from Prunus domestica fruits on the model of spontaneous RBCs hemolysis (n = 5)

Group of animals	Hemolysis inhibition, %	Membrane stabilizing activity, %
Intact control	10,59 ± 1,50	-
Silybor, 25 mg/kg	4,10 ± 0,75*	61,3
PE + Fibers, 200 mg/kg	4,65 ± 0,64*	56,1
PE + Polysaccharides, 200 mg/kg	7,75 ± 0,95*	26,8

Note. * $p \leq 0,05$ compared to intact control.

in the equal volume of this isotonic buffer solution. Samples, containing 0,5 ml of RBCs, were mixed with hypotonic-buffered saline alone. The mixture was incubated for 10 min at room temperature, centrifuged for 10 min at 3000 g and the optical density (OD) of the supernatant was measured ($\lambda = 540$ nm) using Lab Analyt SP-V1000 (China).

The percentage of hemolysis inhibition was calculated using the following formula:

$$\% \text{ of hemolysis inhibition} = \frac{\text{OD control} - \text{OD test samples}}{\text{OD control}} \cdot 100$$

Membrane stabilizing activity (MSA) was calculated using indicators of % hemolysis inhibition (% IH):

$$\% \text{ MSA} = \frac{\% \text{ IH control} - \% \text{ IH test samples}}{\% \text{ IH control}} \cdot 100$$

The data were analyzed using Fisher's tested least significant difference (Fisher PLSD) test. Results present as the means $\pm$ standart error of the mean and deemed statistically significant when $p \leq 0,05$.

Results and discussion. According to the analysis of experimental data, it was found that both extracts from *Prunus domestica* fruits reduced the degree of RBCs spontaneous hemolysis. Under administration of investigated extracts to animals membrane stabilizing activity was 56,1% and 26,8% for PE + Fibers and PE + Polysaccharides

respectively, compared with the control group (Table). The extract with fibers was most active in stabilizing of RBCs membranes, which exceeded the activity of the extract with polysaccharides. The membrane stabilizing effect of extract from *Prunus domestica* fruits PE + Fibers was comparable with such (61,3%) of the reference drug Silybor (Table). The results obtained demonstrate pronounced membrane stabilizing activity of the extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers, that on our opinion may be related with the presence of polyphenolic compounds in the chemical composition of this extract (sum of hydroxycinnamic acid).

Further research will be devoted to determining the mechanisms of laxative and hepatoprotective effects of the extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers.

Conclusions

It is shown, that administration to rats of both extracts from *Prunus domestica* fruits at a dose of 200 mg/kg led to a decrease the degree of RBCs spontaneous hemolysis. The results obtained demonstrate, that membrane stabilizing activity of the extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers, exceeded that of the extract with polysaccharides and was comparable with such of the reference drug Silybor.

1. Phytochemical and pharmacological study of polysaccharide complexes of prunusdomestica fruit / T. Upyr, Shahm Basim Mohammed, Bashar Al-Jabbar Ali Sahlani [et al.] // Science Rise: Pharmaceutical Science. – 2018. – V. 3 (13). – P. 32–37.
2. Гроджинський А. М. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / А. М. Гроджинський. – Київ : «Українська енциклопедія», 1992. – 544 с.
3. Упир Л. В. Фармацевтична енциклопедія; голова ред. ради та автор передмови В. П. Черних / Л. В. Упир, В. К. Слива. – 2-ге вид., перероб. і доповн. – Київ : «MORION», 2010. – 1290 с.
4. Сенюк І. В. Вивчення послаблюючої активності різних субстанцій, одержаної з плодів сливи домашньої *Prunus domestica* / І. В. Сенюк, Башар Джабар Алі Сахлані, Л. В. Ленчик // Український біофармацевтичний журнал. – 2017. – № 5 (52). – С. 21–25.

5. Сенюк І. В. Вивчення гепатопротекторної дії екстрактів з плодів сливи домашньої / І. В. Сенюк, Башар Джабар Алі Сахлані, Мохамед Сахм Хасім // Фармацевтичний часопис. – 2018. – № 4. – С. 57–61.
6. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. реком.; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
7. Строев Е. А. Практикум по биологической химии / Е. А. Строев, В. Н. Макарова. – Москва : Высшая школа, 1986. – С. 208–211.
8. *In vitro* membrane stabilizing activity, total phenolic content, cytotoxic, thrombolytic and antimicrobial activities of *Callian drasurinamensis* (Wall.) / M. A. A. Sikder, M. A. Kaisar, M. A. Rashid [et al.] // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. –2012. – № 1. – С. 45–50.

Bashar Jabbar Ali Sahlane, I. V. Senyuk

Investigation of membrane stabilizing action of extracts from *Prunus domestica* fruits

Prunus domestica is a horticultural crop widely distributed in Ukraine and its fruits are used in alternative medicine for the treatment of diseases of the gastrointestinal tract (constipation and intestinal atony, bile stains, liver disease). The determination of the qualitative and quantitative composition of the *Prunus domestica* fruits showed the presence of unique chemical compounds with probably laxative and hepatoprotective effects. Therefore, our preliminary experimental studies were aimed to identify and confirm the laxative and hepatoprotective properties of four extracts from *Prunus domestica* fruits. Hepatoprotective effect were proved for two extracts: extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers (PE + Fibers), and extract from *Prunus domestica* fruits, containing polysaccharides (PE + Polysaccharides).

The aim of this study was to investigate membrane stabilizing activity of two extracts from *Prunus domestica* fruits by their influence on spontaneous lysis of red blood cells (RBCs) membrane.

The experiments were conducted on white nonlinear rats, that were divided into four groups (intact control, PE + Fibers, 200 mg/kg during 3 days; PE + Polysaccharides 200 mg/kg during 3 days; reference drug Silybor, 25 mg/kg for 3 days).

Membrane stabilizing activity of extracts from *Prunus domestica* fruits was studied *in vitro* using the F. C. Jager method based on the determination of ectoglobular hemoglobin, entering the blood due to spontaneous lysis of red blood cells membrane caused by lipid peroxidation.

It was found, that both extracts from *Prunus domestica* fruits reduced the degree of RBCs spontaneous hemolysis. Under administration of investigated extracts to animals membrane stabilizing activity was 56,1 % and 26,8 % for PE + Fibers and PE + Polysaccharides respectively compared with the control group. The extract with fibers was most active in stabilizing of RBCs membranes, which exceeded the activity of the extract with polysaccharides. The membrane stabilizing effect of extract from *Prunus domestica* fruits PE + Fibers was comparable with such of the reference drug Silybor.

Thus, among two presented extracts the most active and prospective is extract from *Prunus domestica* fruits, containing fibers. It's membrane stabilizing activity may be related with the presence of polyphenolic compounds in the chemical composition of this extract (sum of hydroxycinnamic acid).

Key words: *Prunus domestica*, red blood cells membranes, spontaneous hemolysis, membrane stabilizing activity

БашарДжабар Аль Сахлані, І. В. Сенюк

Вивчення мембраностабілізуювальної активності екстрактів з плодів *Prunus domestica*

Слива домашня (лат. *Prunus domestica*) – садова культура, яка широко розповсюджена на території України. Її плоди застосовують у народній медицині для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту та печінки. Згідно з попередніми дослідженнями щодо визначення якісного та кількісного складу плодів *Prunus domestica*, було встановлено наявність у сировині хімічних сполук, що ймовірно зумовлюють її послаблювальні та гепатопротекторні властивості. Тому метою наших попередніх досліджень було вивчення та підтвердження наявності гепатозахисної активності в екстрактах з плодів *Prunus domestica*. Серед чотирьох досліджених екстрактів різного складу було доведено наявність гепатопротекторної дії в двох з них: в екстракту, що містить волокна (ЕС + В), та в екстракту з полісахаридами (ЕС + П).

Мета дослідження – вивчення мембраностабілізуювальної дії двох екстрактів з плодів *Prunus domestica* за їхнім впливом на спонтанний гемоліз еритроцитів.

Експеримент було проведено на білих нелінійних щурах, яких поділили на чотири групи (інтактний контроль, ЕС + В, 200 мг/кг 3 дні; ЕС + П, 200 мг/кг 3 дні, референтна – Силібор, 25 мг/кг 3 дні). Мембраностабілізуювальну активність екстракту з плодів *Prunus domestica* вивчали за методом Ф. С. Джагер, який ґрунтується на визначенні позаеритроцитарного гемоглобіну, що надходить до крові внаслідок спонтанного лізису мембран еритроцитів, викликаного переокисленням ліпідів.

Введення тваринам обох досліджуваних екстрактів призводило до зменшення ступеня спонтанного гемолізу еритроцитів. У разі застосування екстрактів мембраностабілізуювальна активність складала

56,1 % (ЭС + В) і 26,8 % (ЭС + П) порівняно з інтактним контролем. Найактивнішим у стабілізації мембран еритроцитів був екстракт, що містить волокна, який перевищував активність екстракту з полісахаридами, та не поступався активності препарату порівняння (Силибору).

Таким чином, серед двох досліджених екстрактів було виявлено найактивніший і перспективний, а саме, екстракт з плодів *Prunus domestica*, що містить волокна. Його мембраностабілізуюча активність може бути пов'язана з наявністю у хімічному складі поліфенольних сполук (суми окислоричних кислот).

Ключові слова: *Prunus domestica*, еритроцити, мембрани, спонтанний гемолиз, мембраностабілізуюча активність

Башар Джабар Аль Сахлани, И. В. Сенюк

Изучение мембраностабилизирующей активности экстрактов из плодов *Prunus domestica*

Слива домашняя (лат. *Prunus domestica*) – садовая культура, которая широко распространена на территории Украины. Ее плоды используются в народной медицине при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта и печени. Согласно предварительным исследованиям по определению качественного и количественного состава плодов *Prunus domestica* было установлено наличие в сырье химических соединений, которые, вероятно, обуславливают слабительные и гепатопротекторные свойства. Поэтому целью наших предыдущих исследований было изучение и подтверждение гепатопротекторных свойств экстрактов из плодов *Prunus domestica*. Среди четырех исследованных экстрактов различного состава было доказано наличие гепатопротекторного действия у двух из них: у экстракта, который содержит волокна (ЭС + В), и у экстракта с полисахаридами (ЭС + П).

Цель исследования – изучение мембраностабилизирующего действия двух наиболее активных экстрактов *Prunus domestica* по их влиянию на спонтанный гемолиз эритроцитов.

Эксперимент был проведен на белых нелинейных крысах, которых поделили на четыре группы (интактный контроль, ЭС + В, 200 мг/кг 3 дня; ЭС + П, 200 мг/кг 3 дня, референтная – Силибор, 25 мг/кг 3 дня). Мембраностабилизирующую активность экстрактов из плодов *Prunus domestica* изучали по методу F. C. Jager, который основан на определении внеэритроцитарного гемоглобина, который поступает в кровь в результате спонтанного лизиса мембран эритроцитов, вызванного перекисным окислением липидов.

Введение животным обоих исследуемых экстрактов приводило к уменьшению степени спонтанного гемолиза эритроцитов. При их применении мембраностабилизирующая активность составила 56,1 % (ЭС + В) и 26,8 % (ЭС + П) по сравнению с интактным контролем. Наиболее активным в стабилизации мембран эритроцитов был экстракт *Prunus domestica*, содержащий волокна, который превышал активность экстракта с полисахаридами и не уступал активности препарата сравнения (Силибора).

Таким образом, среди двух исследованных экстрактов был обнаружен наиболее активный и перспективный экстракт из плодов *Prunus domestica*, содержащий волокна. Его мембраностабилизирующая активность может быть связана с наличием в химическом составе полифенольных соединений (суммы окислоричных кислот)

Ключевые слова: *Prunus domestica*, эритроциты, мембраны, спонтанный гемолиз, мембраностабилизирующая активность

Надійшла: 22 січня 2019 р.

Контактна особа: Сенюк Ігор Валерійович, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Куликівська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 63 131 31 00. Електронна пошта: citochrom@gmail.com

До ювілею Світлани Мефодіївни Дроговоз

27 січня 2019 року святкує свій ювілей видатний учений – фармаколог, доктор медичних наук, професор кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, заслужений працівник народної освіти України, керівник регіонального відділення департаменту післяреєстраційного нагляду ДП «Державний експертний центр МОЗ України» у Харківській області, заслужений професор Національного фармацевтичного університету та Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Світлана Мефодіївна Дроговоз.

Уже 54 роки С. М. Дроговоз присвячує науково-педагогічній діяльності. За цей більш ніж піввіковий період часу вона пройшла величезний шлях від аспіранта до авторитетного фахівця в галузі фармакології, який користується визнанням колег в Україні та за її межами, заслуженою повагою медичних працівників, колег-педагогів і студентів, яким вона щедро дарує знання та досвід.

Світлана Мефодіївна Дроговоз народилася 27 січня 1939 року в Омській області. Професійний шлях майбутнього фармаколога розпочався зі вступу в 1958 році до Тернопільського медичного інституту на спеціальність «Лікувальна справа», після закінчення якого з 1964 по 1965 рік Світлана Мефодіївна працювала лікарем Тернопільської обласної лікарні.

1965 року С. М. Дроговоз обрала нелегкий, але цікавий шлях ученого та вступила до аспірантури на кафедрі фармакології Тернопільського медичного інституту. Свою наукову діяльність вона розпочала під керівництвом видатного фармаколога-гепатолога професора Н. П. Скакуна. 1967 року С. М. Дроговоз успішно захистила кандидатську дисертацію на тему «Желчеотделительная функция печени при стафилококковой инфекции и интоксикации». У 1969 році Світлані Мефодіївні присуджено науковий ступінь кандидата медичних наук.



Життєвий шлях привів С. М. Дроговоз на кафедру фармакології Харківського фармацевтичного інституту в 1970 році. У Харкові вона розпочала роботу над докторською дисертацією «Сравнительное изучение и особенности действия желчегонных препаратов на желчеобразовательную функцию печени в норме и патологии». У віці 33 років Світлана Мефодіївна успішно захистила свою наукову працю й була одним з наймолодших докторів наук на той час. Учене звання професора було присвоєно С. М. Дроговоз у 1980 році.

У 1972–2011 роках вона очолювала кафедру фармакології Харківського фармацевтичного інституту – Української фармацевтичної академії – Національного фармацевтичного університету та в 1976–1984 роках обіймала посаду проректора з наукової роботи Харківського фармацевтичного інституту. У той період завдяки сумлінній праці С. М. Дроговоз, її організаторським і новаторським здібностям, цілеспрямованості, завзятому на очолюваній нею кафедрі були впроваджені нові

напрями науково-дослідної та навчально-методичної роботи, за що в 1990 році кафедра була нагороджена Міністерством вищої і середньої освіти першою премією як найкраща серед вищих навчальних закладів України.

Наукові досягнення С. М. Дрогвоз відомі фахівцям багатьох країн світу. Світлана Мефодіївна – провідний вітчизняний фахівець у галузі фармакології засобів, що застосовуються для лікування захворювань печінки. Під її керівництвом проведено низку фундаментальних досліджень, що дозволили встановити нові механізми патогенезу захворювань та уражень печінки. Запропонована професором С. М. Дрогвоз методика визначення вмісту холестеролу та жовчних кислот у жовчі відома як в Україні, так і в інших країнах. Великим є внесок Світлани Мефодіївни у фармакологію протизапальних засобів. За її участі були створені оригінальні нові вітчизняні гепатопротектори (антраль, тіотриазолін, ліолів та ін.), кардіопротектори (ліпофлавон), гравідопротектори (савентол). Креативність наукового мислення зробила Світлану Мефодіївну піонером у впровадженні сучасного інноваційного напрямку медицини – карбокситерапії, активну роботу над яким вона наразі продовжує.

Величезною та вагомою є наукова спадщина професора С. М. Дрогвоз. Вона є співавтором понад 20 лікарських препаратів, автором понад 800 наукових праць, серед яких 253 авторських свідоцтв і патентів, 7 монографій, 11 підручників з фармакології українською, російською, англійською, французькою, арабською мовами. Молодість душі та новаторські ідеї дозволили втілити в життя низку оригінальних підручників і довідкових видань, а саме «Фармакологія в допомогу студенту, провизору и врачу», «Побічна дія ліків», «Лікарська токсикологія», «Хронофармакологія» та іншої методичної літератури, без якої неможливо уявити навчальний процес на кафедрі фармакології.

Доброзичливий наставник, Світлана Мефодіївна постійно працює з молоддю та передає їй свій багатий науковий і педагогічний досвід. Створена С. М. Дро-

гвоз школа фармакологів стала потужною кузницею кадрів висококваліфікованих фахівців не лише для України, а й для багатьох країн світу. Професор С. М. Дрогвоз підготувала 14 докторів і 41 кандидата наук.

Сповнена енергії та наснаги С. М. Дрогвоз і зараз невтомно працює на посаді професора кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету. Для студентів багатьох поколінь професор С. М. Дрогвоз залишається еталоном неперевершеного лектора, мудрого, справедливого педагога, який вмів захопити аудиторію, просто пояснити будь-яке складне питання й передати аудиторії свою любов до фармакології. Світлані Мефодіївні притаманні щире, чуйне ставлення до людей, готовність допомогти в будь-якій ситуації.

Світлана Мефодіївна Дрогвоз нагороджена медалями «За трудовое отличие», «Ветеран труда», «Изобретатель СССР», дипломом переможця в номінації «Кращий доктор наук НФаУ». Вона є членом редколегії часописів «Український біофармацевтичний журнал», «Фармацевтичний журнал», «Клінічна фармація», членом правління регіонального відділення Асоціації фармакологів України, членом спеціалізованої вченої ради та апробаційної ради Національного фармацевтичного університету.

Колектив Національного фармацевтичного університету, вся фармакологічна спільнота вітають Світлану Мефодіївну з ювілеєм та щиро зичать їй міцного здоров'я, щастя та довгих років насиченого творчістю життя. Впевнені, що здатність цієї видатної особистості до генерації інноваційних ідей ніколи не вичерпається. Бажаємо Світлані Мефодіївні непереборної енергії для втілення нових досягнень у науці та підготовці майбутніх поколінь фармакологів і спеціалістів фармації.

*ГО «Асоціація фармакологів України»
Національний фармацевтичний
університет
ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»
Редколегія журналу «Фармакологія
та лікарська токсикологія»*