

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск
2010



Компания «Химхром» - официальный дилер корпорации Sigma-Aldrich, компании Greiner Bio-One (Германия), компания StemCell Technologies Inc. (Канада), Carl Roth (Германия) и др. Предлагаем широкий спектр химических реагентов, реактивов, пластиковой лабораторной и культуральной посуды, лабораторного оборудования ведущих мировых производителей.

Выполняем заказы от грамма до тонны.

Осуществляем оптовые поставки химикатов для производителей фармацевтических и ветеринарных препаратов, пищевых и косметических производств, диагностических центров.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск
2010

УДК 615.015+615.03+615.017(063)

Редакционная коллегия:

П.Т. Петров (ответственный редактор),
Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик

В сборник включены тезисы докладов, представленных на международную научно-практическую конференцию «Белорусские лекарства», отражающие результаты исследований ученых из Беларуси, России, Украины.

Материалы конференции представляют интерес для фармакологов, биохимиков, физиологов, медицинских работников и организаторов здравоохранения, специалистов в области технологии и производства лекарственных препаратов, а также преподавателей, аспирантов и студентов факультетов медико-биологического профиля.

УДК 615.015+615.03+615.017(063)

©Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси», 2010

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ БАЗОВЫХ СТРУКТУР НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

Поройков В.В.

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН),
119121, г. Москва, Погодинская ул., 10, E-mail: vladimir.poroikov@ibmc.msk.ru

Постановка задачи. Фармацевтические исследования и разработки (R&D) связаны с существенными временными и финансовыми издержками. Традиционный процесс создания одного нового лекарственного препарата в промышленно-развитых странах в среднем длится около 12 лет, а финансовые затраты составляют около 1 млрд долларов США. При этом, учитывая высокий риск получения отрицательного результата, необходимо синтезировать и протестировать около 10 тысяч структур различных химических соединений.

С целью повышения экономической эффективности создания новых лекарственных препаратов в фармацевтических R&D широко применяются методы компьютерного конструирования лекарств. В докладе будет представлено современное состояние создания и применения методов био- и хемоинформатики в фармацевтических R&D и обсуждены перспективы дальнейшего развития в данной области.

Методы биоинформатики и компьютерного конструирования лекарств, охватывающие всю цепочку исследований «от геномов к лекарству *in silico*» с целью создания оригинальных лекарственных препаратов включают в себя: поиск и валидацию наиболее перспективных фармакологических мишеней; отбор и конструирование более безопасных и эффективных лигандов; оптимизацию структуры фармакологических веществ с учетом необходимого комплекса фармакодинамических и фармакокинетических характеристик.

Идентификация функционально-значимых участков в белках и поиск перспективных фармакологических мишеней. Путем сравнительного анализа геномных и постгеномных данных, совместно с сопутствующей биомедицинской информацией идентифицируют макромолекулы, воздействие на которые наиболее благоприятно с точки зрения терапии изучаемой патологии. Анализируя аминокислотные последовательности белков, выявляют функционально важные сайты, которые могут рассматриваться как потенциальные мишени для создания новых диагностикумов, вакцин и лекарств. Оценка консервативных и переменных участков в структуре гомологичных белков из различных инфекционных агентов является основой для идентификации вероятных антигенных детерминант, а также предсказания возможных проблем с лекарственной резистентностью.

Создание потенциальных лигандов на основе структуры макромолекулы-мишени. Трехмерную (3D) структуру макромолекулы-мишени обычно определяют с помощью рентгеноструктурного анализа. Для многих белков такая информация может быть получена из банка данных белковых структур PDB. Если для изучаемого белка необходимая информация в PDB отсутствует, но рассматриваемый белок имеет близкие гомологи, 3D модель может быть построена с помощью молекулярного моделирования. Механизмы белок-лигандного взаимодействия изучают с помощью молекулярного докинга. Информация об особенностях сайтов связывания и об известных лигандах используется для виртуального скрининга базовых структур новых лекарств либо для их дизайна *de novo*. Молекулярное моделирование позволяет получить оценки энергии связывания (scoring function), величина которой используется в качестве критерия для отбора наиболее перспективных базовых структур новых лекарств. Методы компьютерного конструирования лекарств, основанные на структуре макромолекулы-мишени» (target-based drug design) широко используются в настоящее время для создания лигандов, обладающих аффинностью к конкретным макромолекулам-мишеням [1, 2].

Поиск лигандов и оптимизация их свойств на основе методов (Q)SAR/(Q)SPR. В случае, если 3D структура макромолекулы-мишени не известна и не может быть в настоящее время определена с достаточной точностью методами молекулярного моделирования, применяют «дизайн, основанный на структуре лиганда» (ligand-based drug design) [3]. Используя информацию об известных лигандах (блокаторах или активаторах) в качестве обучающей выборки, анализируют взаимосвязи «структура-активность» (SAR), либо – количественные взаимосвязи «структура-активность» (QSAR). Эти зависимости в дальнейшем используют для поиска и оптимизации новых более эффективных и безопасных лигандов. Аналогичным образом оценивают различные фармакодинамические и фармакокинетические характеристики исследуемых веществ, а также их токсичность.

Практические приложения и необходимость интеграции компьютерного конструирования лекарств в единой платформе. Разработанные в ИБМХ РАМН компьютерные методы широко используются для выявления перспективных фармакологических мишеней и их лигандов, для терапии как инфекционных (ВИЧ/СПИД, туберкулез и др.), так и неинфекционных заболеваний (артериальная гипертензия, воспалительные процессы и др.) [4].

Современные требования к разработке новых более эффективных и безопасных лекарственных препаратов обуславливают необходимость комплексного применения методов био- и хемоинформатики. В ИБМХ РАМН проводится разработка интегральной платформы, обеспечивающей всю цепочку исследований «от геномов к лекарству *in silico*».

Для организации кооперации ученых и специалистов из России и стран СНГ в разработке новых лекарств создается информационно-телекоммуникационная система CIS-CDD (CIS Hub for Collaborative Drug Discovery). CIS-CDD обеспечит обмен информацией об опыте и ресурсах различных исследовательских групп, единый «инструмент» для организации и управления совместными проектами, интеграцию доступа к существующим источникам химической, биологической и фармацевтической информации, взаимодействие с другими консорциумами в области поиска и создания новых лекарств.

Заключение. Представленные в докладе методы компьютерного конструирования лекарств существенно повышают экономическую эффективность и возможности поиска и создания более эффективных и безопасных лекарств.

Литература:

1. Иванов А.С., Поройков В.В., Арчаков А.И. Биоинформатика: путь от генома к лекарству *in silico*. *Вестн. РГМУ*, 2003, № 4, с.19-23.
2. Ivanov A., Veselovsky A., Dubanov A., Skvortsov V. Bioinformatics Platform Development. From Gene to Lead Compound. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 316, p.389-431.
3. Filimonov D.A., Poroikov V.V. Probabilistic approach in activity prediction. In: *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*. Eds. Alexandre Varnek and Alexander Tropsha. Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008, p.182-216.
4. Geronikaki A., Druzhilovsky D., Zakharov A., Poroikov V. Computer-aided predictions for medicinal chemistry via Internet. *SAR and QSAR in Environ. Res.*, 2008, 19 (1 & 2), p.27-38.

VIRTUAL SCREENING AND COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN

Poroikov V.V.

Institute of Biomedical Chemistry of Rus. Acad. Med. Sci., 10, Pogodinskaya Str., Moscow, 119121, Russia, 10, E-mail: vladimir.poroikov@ibmc.msk.ru

Computer-aided drug discovery approaches are widely used now in pharmaceutical research and development. Examining the amino acid sequences of proteins relatively

conservative antigenic determinants are revealed and used for further design of recombinant vaccines. The most prospective macromolecular targets (separate or in combinations) associated with certain pathologies can be identified by comparative analysis of genomics, postgenomics and other biomedical data. Spatial structure of the target protein, either obtained from the Protein Data Bank (PDB) or computed with molecular modelling techniques, can be used for target-based design of potential ligands or for their virtual screening among the commercially available samples. Drug-candidates may be obtained by ligand-based (Q)SAR approach applied for optimization of pharmacodynamics' and pharmacokinetics' characteristics of lead compounds. These computer-assisted methods are widely used in applied projects directed to detection of the targets and their ligands for the treatment of both infectious (HIV/AIDS, tuberculosis, etc.) and non-infectious diseases (hypertension, inflammation, etc.).

The whole computational platform "From genomes to drugs *in silico*" has been developed by the Institute of Biomedical Chemistry of Rus. Acad. Med. Sci. CIS Hub for Collaborative Drug Discovery (CIS-CDD) is under development, which provides the general framework for allocation of information about the experience and potential in pharmaceutical R & D of Russian and CIS research teams, promotion of fundraising processes for organization and execution of collaborative projects; integration with the existing resources of chemical, biological and pharmaceutical information; and cooperation with the other collaborative drug discovery consortiums, etc.

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ВИТАМИННО-МЕТАБОЛИТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

Петров С.А., Карпов Л.М.

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, биологический факультет, кафедра биохимии; пер. Шампанский, 2, г. Одесса, Украина, 65058, E-mail: sergey1951@sana.od.ua

Проблема взаимодействия витаминов в организме изучается более пятидесяти лет. Основными научными центрами, занимающимися этой проблемой на территории СНГ являются Институт биохимии АН Беларуси и кафедры биохимии Одесского национального университета имени И. И. Мечникова, Украина [1].

За пять десятилетий исследования данной проблемы накоплен большой массив экспериментальных данных и создана концепция стратегии создания лекарственных препаратов на базе комплексов функционально-связанных витаминов и их метаболитов [2].

Задачей данного исследования было изучить корригирующее действие комплексов функционально-связанных витаминов на отдельные звенья углеводного и белкового обмена при аллоксановом диабете, циррозе печени, гипоксии, экспериментальной ишемии сердца.

Для исследований использовались спектрофотометрические, флюориметрические и радиоизотопные методы исследования. Экспериментальные патологии у лабораторных животных вызывали с помощью общепринятых методик [3].

Вначале мы изучили возможность коррекции процессов углеводного и белкового обмена при указанных экспериментальных патологиях с помощью инъекций терапевтических доз моновитаминов.

Исследованы были следующие витамины: тиамин, рибофлавин, пантатеновая кислота, никотинамид и липоевая кислота.

В качестве показателей углеводного обмена были изучены активности следующих ферментов: мультиэнзимные пируватдегидрогеназный и 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплексы, гексокиназа, изоцитратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа,

малатдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа. В качестве показателей белкового обмена были изучены аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза и ферменты протеолитической системы: катепсины В и L, трипсин, металлопротеиназа-2 и карбоксипептидаза.

Этот блок исследований показал, что все изучаемые экспериментальные патологии приводят к существенным сдвигам как в углеводном, так и в белковом обмене. В частности, при гипоксии и экспериментальной ишемии миокарда в первый час после создания модели патологии происходит активация ферментов цикла трикарбоновых кислот и трансаминаз.

В более поздние сроки активности этих ферментов снижаются. При этом активируется лактатдегидрогеназа и ферменты протеолиза.

При аллоксановом диабете и циррозе печени наблюдается существенное снижение активности ферментов ЦТК и трансаминаз. Активность протеолитических ферментов была несколько повышенной.

Введение по отдельности тиамина, рибофлавина и никотинамида либо не вызывали достоверных изменений активности исследуемых ферментов, либо приводили к кратковременному положительному эффекту.

Введение по отдельности липоевой кислоты и пантотеновой кислоты снижало патологические отклонения углеводного и белкового обмена при гепатите и циррозе печени.

Следующим этапом наших исследований было изучение возможного корригирующего действия витаминных комплексов.

В качестве такого комплекса был избран набор витаминов, функционально-связанных с дегидрогеназами кетокилот, в состав которого входили указанные выше витамины.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение такого комплекса оказывает нормализующий эффект при всех исследованных экспериментальных патологиях, кроме ишемии сердца и гипоксии.

Так, в частности, при циррозе печени и аллоксановом диабете введение указанного комплекса функционально-связанных витаминов почти полностью нормализовало активность ферментов цикла трикарбоновых кислот и трансаминаз в печени, тонком кишечнике, мышцах и головном мозге.

При использовании комплекса метаболитов витаминов – тиохрома, 4-Ф-пантотената, липоамида, N-метил-никотинамида и ФМН мы наблюдали защитный эффект не только при аллоксановом диабете и циррозе, но также и при гипоксии и экспериментальной ишемии сердца.

Таким образом, разработанный нами комплекс метаболитов функционально-связанных витаминов можно рекомендовать как перспективное лечебное средство при патологиях печени и гипоксических состояниях организма.

Литература:

1. Федорко Н.Л., Петров С.А. Взаимодействие коферментов 2-оксоглутаратдегидрогеназы на уровне мультиэнзимного комплекса и в митохондриях // Вестник ОНУ. – Т. 9, в. 1, – 2004. С. 47 - 56.
2. Петров С.А., Хотько А.И. // Влияние тиамина и его метаболитов на активность тканевой и очищенной пирватдегидрогеназы // Физиол. журн. – т. 40, № 2. – 1994. С. 26 - 31.
3. Экспериментальная витаминология. Под ред. Ю.М. Островского. – Минск. – Наука и техника. – 1979. – 550 с.

METABOLIC DISORDERS CORRECTION BY VITAMINE-METABOLIC COMPLEXES

Petrov S.A., Karpov L.M.

*Odessa National Mechnikov University, Biology Faculty, Biochemistry Department
Shampansky lane, 2, Odessa, Ukraine, 65058, E-mail: sergey1951@sana.od.ua*

It was shown that functionally-bound complexes of vitamins are able to correct carbohydrate and protein metabolism in animal tissues after different experimental pathologies.

The most effective is complex which include the vitamins functionally-bound with multienzyme pyruvate-dehydrogenase complex.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРИРОДНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ПРЕПАРАТА

¹Чиркин А.А., ¹Данченко Е.О., ¹Балаева-Тихомирова О.М., ¹Крумплевская Л.А., ²Нарута Е.Е.

¹*Витебский государственный университет им. П.М.Машерова, 210038, г. Витебск, Московский пр. 33. E-mail: chir@tut.by;*

²*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50*

В гемолимфе куколок дубового шелкопряда, находящихся в диапаузе 7-8 месяцев, содержатся вещества, необходимые для формирования эукариотического организма – бабочки, а также вещества, обеспечивающие антиоксидантное и бактериостатическое действие, что препятствует повреждению молекул, из которых формируется новый организм бабочки. Эта фундаментальная биохимическая особенность жизненного цикла дубового шелкопряда может использоваться при создании антиоксидантных и бактериотропных препаратов для других эукариотических организмов *in vivo* и увеличения сроков хранения биологических субстанций *in vitro*. В 2007 году было описано антиоксидантное действие гемолимфы куколок дубового шелкопряда, районированных в Беларуси [1,2]. Было показано, что водный экстракт гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда [3] обладает выраженным антиоксидантным действием, ингибирует пероксидазную и галогенирующую активности миелопероксидазы нейтрофилов (МПО), перехватывает гипохлорит и пероксинитрит, но не ингибирует образование супероксидного анион-радикала НАДФН-оксидазой. В дальнейших исследованиях удалось установить, что нативное содержимое куколок дубового шелкопряда приводит к ингибированию процессов формирования активных кислородных метаболитов нейтрофилами вследствие прямого ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции МПО из нейтрофилов в среду. Действие нативного содержимого куколок дубового шелкопряда частично зависит от функционирования в нейтрофилах 5-липоксигеназных и фосфатидилинозитол-3-киназных внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток [4]. Целью работы была оценка метаболических изменений у белых крыс под влиянием водного экстракта куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ) при моделировании инсулинорезистентности и алиментарной гиперхолестерolemии.

Состояние инсулинорезистентности (ИР) воспроизводили трехмесячным скормливанием крысам высокожировой диеты. Высокожировая диета вызывала увеличение массы тела крыс на 111%, концентрации глюкозы на 25,8%, инсулина на 87%,

коэффициента Нота на 210%. Развитие ИР сопровождалось увеличением концентрации фактора некроза опухоли- α в 7,2 раза, кортикостерона – в 1,5 раза и снижением концентрации адипонектина в 1,2 раза в сыворотке крови. При развитии ИР отмечались признаки стеатогепатоза, характеризующегося увеличением концентрации холестерина в печени в 3,2 раза, триацилглицеролов – в 3,0 раза и выявлением атерогенных изменений сыворотки крови (увеличение концентрации общего холестерина и триацилглицеролов в 1,4 раза и снижение ХС ЛПВП в 1,2 раза). При развитии ИР отмечались активация гликогенолиза, ингибирование гликолиза, окислительной ветви пентозофосфатного пути, что доказывалось снижением содержания гликогена в печени в 14,7 раз, увеличением активности фосфорилазы гликогена в 2,4 раза, фосфоглюкомутазы в 6,1 раза, снижением активности гексокиназы в 1,8 раза, глюкокиназы в 3,2 раза, фосфофруктокиназы в 4,7 раза, альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата в 2,4 раза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в 3,5 раз, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в 1,9 раза. В результате развития ИР активировались глюконеогенез (увеличивается активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы в 2,8 раза и глюкозо-6-фосфатазы в 2,4 раза) и превращения метаболитов через реакции неокислительной ветви пентозофосфатного пути за счет активации рибозо-5-фосфатметаболизирующих ферментов в 1,5 раз и транскетолазы в 2,1 раза. Высокожировая диета в течение 3-х месяцев вызывала нарушение метаболизма белков в печени, что характеризовалось снижением содержания общего белка в печени на 13,8%, альбумина на 10,5% и мочевины на 15,5% в сыворотке крови. Воспроизведение ИР сопровождалось активацией свободно-радикального окисления, что подтверждалось увеличением содержания ТБК-реагирующих субстанций в 1,9 раз и снижением уровня восстановленного глутатиона в 4,4 раза.

Выявлен положительный эффект ЭКДШ на показатели метаболизма при развитии ИР: уменьшались гипергликемия, концентрация инсулина, кортикостерона в сыворотке крови, величина индекса Нота, увеличилось содержание гликогена в печени, нормализовалась активность фосфорилазы гликогена, фосфоглюкомутазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, рибозо-5-фосфатметаболизирующих ферментов, транскетолазы, обнаружена тенденция к нормализации активности фосфофруктокиназы, альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата, гексокиназы и глюкокиназы. Экстракт куколок дубового шелкопряда оказывал нормализующий эффект на содержание белков в печени, но не изменял синтез экспортных белков; ЭКДШ стимулировал синтез мочевины в печени. Наиболее выраженный эффект отмечался при использовании ЭКДШ в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела. ЭКДШ в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела снижал уровень общего холестерина, триацилглицеролов в сыворотке крови, повышал концентрацию ХС ЛПВП и уменьшал содержание холестерина в печени. Выявлен антиоксидантный эффект экстракта куколок дубового шелкопряда при моделировании ИР, характеризующийся нормализацией уровня ТБК-реагирующих субстанций и увеличением уровня восстановленного глутатиона в печени.

При острой интоксикации холестерином выявлены метаболические нарушения, характерные для развития ИР: увеличение содержания глюкозы, холестерина, триацилглицеролов, снижение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови и гликогена в печени, более выраженные через 10 дней интоксикации. В печени выявлено увеличение концентрации общих липидов и холестерина. При моделировании острой интоксикации холестерином обнаружено достоверное увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови на 24,4%. В печени крыс, получавших холестерин, выявлено уменьшение содержания гликогена в 11,7 раза. Это снижение уровня гликогена обусловлено, вероятно, нарушением процесса его синтеза, поскольку в печени снижена активность фосфорилазы гликогена и через 10 дней острой интоксикации холестерином – фосфоглюкомутазы. Выявлено уменьшение активности глюкозо-6-фосфатазы в 2 раза через 10 дней введения холестерина, что снижает выход глюкозы из печени в кровь. Возникшая гипергликемия может быть обусловлена нарушением

фосфорилирования глюкозы в печени, т.к. в печени крыс, получавших холестерол, обнаружено снижение активности гексокиназы на 236% и глюкокиназы на 137% по сравнению с активностью этих ферментов в печени контрольных животных.

ЭКДШ в дозах 7-70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела снижал уровень глюкозы. Содержание гликогена в печени, хотя оставалось ниже, чем у интактных животных, увеличивалось по отношению к соответствующему контролю у крыс, получавших препарат ЭКДШ. Активность фосфорилазы гликогена и фосфоглюкомутазы не изменялась в печени крыс, получавших ЭКДШ; активность глюкозо-6-фосфатазы нормализовалась в печени крыс, получавших холестерол и ЭКДШ в течение 10 дней. Интересен факт, что ЭКДШ практически полностью нормализовал активность гексокиназы и предотвращал снижение активности глюкокиназы уже через 5 дней введения холестерола. Действие ЭКДШ на уровень глюкозы в крови может быть связано с влиянием на свойства мембраны, обусловленное антиоксидантным эффектом экстракта. Установлено, что интоксикация холестеролом вызывала активацию свободно-радикального окисления, что доказывается увеличением уровня ТБК-реагирующих субстанций в печени крыс в 1,7 раза и снижением уровня восстановленного глутатиона в 1,5 раза. ЭКДШ в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела нормализовал уровень ТБК-реагирующих субстанций до значений интактных животных при интоксикации холестеролом в течение 10 дней. ЭКДШ полностью нормализовал уровень восстановленного глутатиона.

Острая интоксикация холестеролом характеризовалась увеличением содержания общих липидов в печени в 2,9 раза, а холестерола – в 1,6 раза. Использование ЭКДШ не оказало влияния на содержание общих липидов в печени, но снизило содержание холестерола в печени. Увеличение содержания холестерола в печени сопровождалось изменением липидного профиля сыворотки крови. Острая интоксикация холестеролом привела к повышению уровня общего холестерола на 56,5%, триацилглицеролов на 74,2%, а уровень ХС ЛПВП уменьшился на 25,8%. Полученные результаты могут быть следствием увеличения экспорта холестерола из печени, снижением скорости метаболизма липопротеинов в кровеносном русле и снижением синтеза липопротеинов в печени. При воспроизведении гиперхолестеролемии в течение 10 дней экстракт нормализовал уровень общего холестерола в сыворотке крови до значений контрольных животных; в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела – нормализовал уровень ХС ЛПВП и триацилглицеролов; в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела – повышал уровень ХС ЛПВП и снижал уровень триацилглицеролов.

Таким образом, экстракт куколок дубового шелкопряда, обладающий уникальным антиоксидантным действием, способен предотвращать развитие метаболических нарушений при моделировании инсулинорезистентности и острой интоксикации холестеролом.

Литература:

1. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) /А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова» 2007. - Том 6. – С. 248-265.

2. Чиркин, А.А. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) /А.А. Чиркин [и др.] // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта, 2007, №1 (43), С. 143-149.

3. Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз [и др.] // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).

4. Чиркин, Открытие и исследование антиоксидантной активности гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда /А.А.Чиркин [и др.]// Фундаментальные и прикладные проблемы стресса. Матер. Междунар. научно-практ. конф. – Витебск: ВГУ, 2010. – С. 26-28

METABOLIC EFFECTS OF NATURAL ANTIOXIDANT PREPARATIONS

Chirkin A.A., Danchenko E.O., Balayeva-Tikhomirova.O.M., Krumplevskaya L.A.,
Naruta, E.E.

Vitebsk State University, Vitebsk, Belarus;

*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of
the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus*

Extract of pupae of *A. pernyi* has a unique antioxidant effect. This drug prevents from the development of metabolic disorders in the modeling of insulin resistance and cholesterol acute intoxication.

ПРИМЕНЕНИЕ ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

^{1,2}Егоров В.В., ²Назаров В.А., ^{1,2}Андрончик К.А., ^{1,2}Здрачек Е.А.

¹*Белорусский государственный университет, химический факультет
220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14;*

²*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14*

В последнее время наметилась тенденция к все более широкому применению разнообразных сенсоров – миниатюрных устройств, реагирующих на изменение концентрации аналита в исследуемом объекте соответствующим изменением величины генерируемого аналитического сигнала (силы тока, потенциала, оптической плотности, резонансной частоты электромагнитных колебаний и др.), который регистрируется с помощью подходящего измерительного прибора. Подобные устройства, отличаясь сравнительной простотой и исключительно низкой стоимостью, в ряде случаев способны успешно конкурировать с самым современным сложным и дорогостоящим аналитическим оборудованием не только в плане стоимости анализа, но и в плане простоты пробоподготовки, производительности и даже точности. Наиболее яркий пример – потенциометрический метод определения электролитного состава крови с помощью ионоселективных электродов (количество выполняемых в мире анализов превышает 1 миллиард в год), повсеместно вытеснивший ранее используемый атомно-эмиссионный метод.

Есть основания считать, что хорошие перспективы существуют также в плане использования ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе. Потенциометрический метод анализа с помощью ионоселективных электродов включен в качестве официального в Государственную Фармакопею РБ [1]. Однако, насколько нам известно, в настоящее время в ГФ РБ отсутствуют частные фармакопейные статьи, регламентирующие проведение анализов лекарственных форм с помощью ионоселективных электродов. Более того, вопросы применения ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе не находят должного освещения в соответствующих учебных курсах, и с ними практически не знакомы работники аналитических лабораторий фармацевтических предприятий. Цель настоящего сообщения – информировать фармацевтическую общественность страны, прежде всего практических работников, о возможностях применения потенциометрического метода в анализе фармацевтических объектов и о результатах исследований в данной области, выполняемых на кафедре

аналитической химии и в лаборатории ионометрии и химической метрологии НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета.

Потенциометрический метод анализа с использованием ионоселективных электродов начал интенсивно развиваться с 60-х годов прошлого века, когда были созданы первые работоспособные электроды с кристаллическими, а несколько позже и жидкостными и пластифицированными полимерными мембранами. Последние получили наиболее широкое распространение в связи с простотой изготовления и широкими возможностями управления важнейшими аналитическими характеристиками мембраны, например, селективностью – путем варьирования состава мембраны – природы пластификатора, ионообменника, введения специфических сольватирующих добавок (так называемых мембраноактивных компонентов) и др. В настоящее время потенциометрический метод анализа с использованием электродов широко применяется в самых различных областях – в анализе природных и сточных вод, технологических растворов, разнообразных сельскохозяйственных объектов (почвы, минеральные удобрения, корма, продукты питания), в научных химических и биохимических исследованиях.

Перспективность применения ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе обусловлена рядом обстоятельств. Во-первых, жесткой детерминированностью качественного состава объектов анализа (если речь идет об анализе готовых лекарственных форм). Поскольку ионоселективные электроды не обладают абсолютной селективностью, они являются, прежде всего, инструментом количественного анализа, а не качественного, и применять их для анализа объектов неизвестного состава следует с определенной осторожностью. Напротив, детерминированность объекта анализа, позволяет заранее оценить возможное влияние сопутствующих компонентов на результаты измерения, исключая таким образом возможность грубых промахов и гарантируя высокую достоверность получаемых результатов. В этом плане фармацевтические объекты весьма сходны с биохимическими (сыворотка крови), состав которых довольно жестко детерминирован, и где потенциометрический анализ с использованием ионоселективных электродов получил широчайшее распространение.

Во-вторых, это относительная простота получения мембран с приемлемыми рабочими характеристиками (по крайней мере, для определения достаточно гидрофобных органически катионов и анионов). Поскольку в основе селективности таких электродов лежит избирательность перехода определяемых ионов из водного раствора в фазу мембраны, исключительно зависящая от соотношения липофильности определяемого и постороннего ионов, то достаточно высокая селективность по отношению к неорганическим компонентам (от 3-х десятичных порядков и выше) обычно предопределена самим химическим строением определяемых физиологически активных кислот и оснований.

В-третьих, имеются широкие возможности управления селективностью, основанные на варьировании состава мембраны. В настоящее время описаны многие десятки пластификаторов различной природы – полностью замещенные диэфиры алифатических дикарбоновых кислот, фталевой, орто-фталевой кислоты, ароматические галоид- и нитропроизводные); разнообразные катионо- и анионообменники (тетрафенилборат и его производные, высшие сульфокислоты, фосфорные кислоты, гетерополикислоты, гидрофобные металлокомплексы, четвертичные аммониевые соли различного строения); мембраноактивные компоненты синтетического и природного происхождения (краун-эфиры, каликсарены, циклодекстрины, криптанды, металлопорфирины, фталоцианины, салофены и др.). Оптимальное сочетание этих веществ в мембране позволяет изменять селективность к целевому иону на много порядков.

Вопросам использования ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе посвящен ряд монографий, десятки обзоров, тысячи оригинальных статей [2,3]. Прежде всего, это работы, посвященные количественному определению физиологически активных

веществ ионного характера (органических оснований и кислот) в субстанциях и готовых лекарственных формах. Имеются работы, посвященные валидации методик, основанных на использовании ионоселективных электродов, для анализа лекарственных средств, а также использованию ионоселективных электродов в фармакокинетических исследованиях.

Описаны многочисленные примеры успешного применения ионоселективных электродов для количественного определения физиологически активных аминов и кислот самого различного действия и строения: антигистаминные препараты (димедрол, гидроксизин, циметидин, цетиризин); антидепрессанты (аминептин, нортриптилин); антиаритмические препараты (дизопирамид, орнид, этаверин, этмозин); спазмолитики (гиосциамин, дибазол, дротаверин, папаверин); антималярийные препараты (хинин, хингамин); релаксанты периферийных мышц (галламин, тубокурарин); анальгетики и анестетики (кетамин, кокаин, метадон, новокаин, тримекаин, диклофенак, ибупрофен); нейролептики (азалептин, аминазин, этаперазин); транквилизаторы и противосудорожные препараты (бромазепам, диазепам); антибиотики (доксциклин, метациклин, окситетрациклин, пенициллины, цефалоспорины); стимуляторы центральной нервной системы (баклофен, циннаризин, сальбутиамин); антиадренэргические препараты (анаприлин, празозин); вазодилататоры (верапамил, пирибедил); антигипертензивные препараты (беназеприл); антихолинэргические (скополамин); гормональные (метформин); отхаркивающие (амброксол); противорвотные (метоклопрамид); противокашлевые (клобутинол); симпатомиметические для лечения простудных заболеваний (фенилпропаноламин); противовирусные (амантадин); антипротозойные (ампролиум); витамины (пиридоксин); кардиотропные (нонахлазин) и др.

Выполненные в нашей группе исследования позволили установить основные закономерности влияния состава мембраны на селективность и другие рабочие характеристики ионоселективных электродов, обратимых к катионам физиологически активных аминов различного строения и анионам некоторых физиологически активных кислот.

В частности, показано, что увеличение основности пластификатора ведет к систематическому улучшению селективности к катионам аминов с меньшей степенью замещенности солеобразующего атома азота. Максимальный эффект достигает 5 десятичных порядков. Существенное влияние (до 3-х десятичных порядков) может оказывать также природы ионообменника. Введение в мембрану мембраноактивных комплексонов (например, дибензо-18-краун-6) приводит к очень сильному (более 4-х десятичных порядков) улучшению селективности к катионам первичных физиологически активных аминов относительно всех остальных. Показано, что наличие в молекулах физиологически активных аминов неионных полярных групп ($-OH$, $=NH$), способных сольватироваться основными пластификаторами по механизму образования водородной связи, открывает дополнительные возможности управления селективностью [4,5].

Изучено также влияние состава мембраны на селективность электродов для определения ряда карбоксил-содержащих анионов – нестероидных анальгетиков (диклофенака, ибупрофена, кетопрофена, напроксена, индометацина) и пенициллинов (бензилпенициллина, амоксициллина и ампициллина). Показано, что наиболее действенным путем повышения селективности относительно гидрофобных органических ионов в данном случае является введение в мембрану гептилового эфира п-трифторацетилбензойной кислоты.

Разработаны многочисленные методики определения физиологически активных аминов (димедрол, новокаина, папаверина, прозерина, аминазина, ремантадина, смазмолитина, амброксола, амиодарона, анаприлина, бромгексина, верапамила, винпоцетина, дротаверина, кетотифена, лоперамида, мидантана, тербинафина и триметоприма, в том числе поверхностно-активных антисептиков: биглюконата хлоргексидина, декаметоксина, этония,

хлорида цетилпиридиния, хлорида бензалкония) в различных объектах: таблетки, капсулы, растворы для инъекций, сиропы, дезинфицирующие растворы в варианте прямой потенциометрии и потенциометрического титрования. Установлено, что вспомогательные ингредиенты лекарственных форм в большинстве случаев не оказывают влияния на результаты определения. Методики отличаются простотой пробоподготовки и высокой точностью. Относительная погрешность определения в большинстве случаев не превышает 2% при прямом потенциометрическом определении и 1% в варианте потенциометрического титрования.

Литература:

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т. 2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного сырья / под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно, 2008. – 472 с.

2. Stefan R.I., van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y. Electrochemical Sensors in Bioanalysis. New York.: Marcel Dekker Inc, 2001. – 311 p.

3. С.В. Харитонов Ионоселективные электроды для определения лекарственных веществ // Успехи химии, 2007. Т. 76, №4. С. 398-432.

4. V.V. Egorov, A.A. Bolotin Ion-selective electrodes for determination of organic ammonium ions: ways for selectivity control // Talanta, 2006. Vol. 70. P. 1107-1116.

5. В.В. Егоров, Р.И. Астапович, А.А. Болотин, Д.Л. Высоцкий, В.А. Назаров, Вадим Э. Матулис, О.А. Ивашкевич Влияние природы пластификатора на селективность ионселективных электродов к катионам физиологически активных аминов: закономерности и аномалии // Журн. аналит. химии, 2010. Т. 65, № 4. С. 416-425.

ION SELECTIVE ELECTRODES APPLICATION IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

^{1,2}Egorov V.V., ²Nazarov V.A., ^{1,2}Andronchyk K. A., ^{1,2}Zdrachek E.A.,

¹Belarusian State University, Chemical department

220030, Minsk, Leningradskaya str., 14;

²Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University

220030, Minsk, Leningradskaya str., 14

Modern state and perspectives of ion selective electrodes application in drugs analysis is considered. Results of own investigations are presented concerning electrodes selectivity control by means of appropriate choice of membrane composition: the nature of plasticizer, ion exchanger, and introduction of membrane active complexons. The possibilities of quantitative determination of different physiologically active amines and acids using ion selective electrodes by direct potentiometry and potentiometric titration techniques are demonstrated.

ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ МОДИФИКАТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Шкуматов В.М.

Белорусский государственный университет, НИИ физико-химических проблем БГУ,
ул. Ленинградская 14, Минск 220050, Беларусь. E-mail: biopharm@bsu.by

В докладе представлены этапы создания трансгенных микроорганизмов для первичного фармакологического тестирования лекарств: 1) выбор новых систем «вектор-хозяин», 2) уменьшение общего количества модификаций генома дрожжей и ликвидацию побочных продуктов путем выбора соответствующих промоторов и индукторов, 3) использование «молекулярной подстройки» потенциальных лекарственных соединений и пространственной структуры белков-мишеней, 4) оценка прямых и побочных эффектов синтезированных соединений на молекулярные мишени. Представлены экспериментальные обоснования и данные *in silico* по использованию трансгенных дрожжей *Saccharomices cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica* в качестве моделей для первичного отбора соединений, модифицирующих функциональные активности цитохромов P450_{scs} и/или P450c17, а также ферментов-ортологов 20(α,β)-гидроксистероиддегидрогеназ и 5-стероидредуктазы, играющих важную роль в развитии гормонального канцерогенеза.

При выполнении настоящей работы использована методология структурной биологии, биоорганической химии, фармацевтической биохимии, генетической инженерии, биотехнологии. Для исследования «молекулярного узнавания» в монооксигеназных системах были изолированы более 20 гомогенных белков млекопитающих и микроорганизмов, проведена их структурно-функциональная характеристика, осуществлена иммобилизация электронтранспортных белков и аналогов субстратов через различные функциональные и пространственные группы. Гомологичная и гетерологичная реконструкция мультиферментных систем *in vitro* осуществлялась под контролем физико-химических и функциональных методов: тандемной спектроскопии вторых производных в видимой и УФ-областях, импульсного фотолиза, остановленного потока, радиохроматографии, ковалентно-сорбционной реконструкции. При поиске потенциальных микроорганизмов-реципиентов исследовали биотрансформирующую активность по отношению к стероидам следующих микроорганизмов *in vivo*: *Aspergillus ochraceus*, *S. cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Y. lipolytica* и их субклеточных структур. Для гетерологичной экспрессии ферментов млекопитающих сконструировали и применяли *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117α, различные трансформанты *Y. lipolytica*, экспрессирующие от 1 до 6 чужеродных ферментов и их генетически «сшитые» конструкции. Оценку ингибирующего действия модификаторов-лекарств для синтеза стероидных гормонов осуществляли как в условиях *in vivo* добавляя модификаторы до/после процесса индукции синтеза чужеродных белков, так и на уровне мембранных структур с использованием методов стационарной кинетики ферментативных процессов.

Для расширения биотехнологического потенциала трансгенных микроорганизмов, дрожжи *Y. lipolytica* были тестированы как организм-хозяин для цитохром P450-катализируемых биотрансформаций стероидов или стеролов. При превращении прогестерона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* E129A15, экспрессирующими цитохром P450c17 под контролем промотора изоцитрат-лиазы, установлено образование, помимо 17α-гидроксипрогестерона двух стероидных продуктов - 17α,20β- и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, строение которых доказано с помощью ВЭЖХ, ТСХ, масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии [1,2].

Были получены рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica*, способные осуществлять ко-экспрессию белков холестерина трансформирующей системы, обеспечивающих трансформацию холестерина в прегненолон, и цитохрома P450c17, катализирующего образование 17β-гидроксипроизводных стероидов. При конструировании штаммов использован новый подход для введения нескольких гетерологических кДНК в дрожжевой геном, который включает 1) интеграцию в одну стадию множества копий разных гетерологических генов в некодирующих областях генома дрожжей и 2) конструирование диплоидных штаммов с использованием разных гаплоидных трансформантов, что позволяет получать новые комбинации экспрессионных кассет в одном диплоидном штамме. Впервые показано, что, используя этот подход, можно конструировать штаммы *Y. lipolytica*, способные

экспрессировать как минимум 6 разных гетерологических белков [3], а также их генетически «сшитые» конструкции [4]. На основе плазмид р64РТ или р67РТ (последовательности, обеспечивающие интеграцию - rDNA или LTRzeta, маркер для селекции *ura3d4* и pICL1-SphI-ICL1t) сконструированы интегративные мультикопийные вектора, содержащие кДНК зрелых форм белков холестерин-трансформирующей системы и P450c17 под контролем промотора изоцитрат-лиазы. Методом Саузерн-гибридизации показана интеграция до 3-х разных векторов в дрожжевой геном при ко-трансформации гаплоидных реципиентных штаммов *Y. lipolytica*. При диплоидизации выбранных гаплоидных трансформантов получены штаммы, в которых присутствуют разные кассеты экспрессии для всех компонентов холестерин-трансформирующей системы и P45017 α [3].

Для обоснования рекомбинантных микроорганизмов *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α в качестве фармакологической модели были использованы известные лекарственные соединения, модифицирующие биосинтез стероидов. С этой целью изучено влияние субстанций лекарств (кетоконазола, метирапона, дексаметазона, мифепристона, даназола, левоноргестрела) на соотношение биосинтетической и инактивирующей функций рекомбинантных микроорганизмов. Определены значения K_m и k_{cat} , константы ингибирования и тип ингибирования изученных лекарственных соединений в реакциях 17 α -гидроксилирования прогестерона [5]. Использование мифепристона, даназола, левоноргестрела обусловлено тем, что при гетерологической экспрессии в дрожжах P450c17 подвергается непродуктивным циклам восстановления-окисления с образованием кислород-содержащих радикалов, способных активировать ацетиленовую группу этих модификаторов. Активированные модификаторы, благодаря структурному сходству с прогестероном, могут модифицировать аминокислотные остатки активного центра или связываться с гемом P450c17. Кетоконазол, широко используемый антигрибковый препарат, – обладает повышенной избирательностью к дрожжевому цитохрому P450, осуществляющему 14-деметиляцию ланостерина, и применяется до сих пор как стандарт для оценки ингибирующего действия различных соединений на P450c17. Установлено, что на начальных этапах биотрансформации действие даназола, мифепристона и кетоконазола характеризовалось уменьшением образования 17 α -гидроксипрогестерона и потребления прогестерона. Замедленная трансформация прогестерона является результирующей двух последовательных процессов - 17 α -гидроксилирования и 20 α -восстановления. При соотношении (ингибитор)/(P450c17) 1000:1 и (ингибитор)/(прогестерон) 1:1 в условиях *in vivo* не было зафиксировано необратимого ингибирования P450c17 за счет ковалентного связывания даназола или мифепристона в активном центре гемопротеида. Даназол и мифепристон, имеющие как и продукт сопряженную Δ^4 -3-кето-структуру и 17-ОН группу, не модифицировали также по структурно-обусловленному механизму дрожжевой аналог 20 α -ГСД, так как соотношение 17 α -гидроксипрогестерона и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она на начальных этапах было одинаковым как для контрольного эксперимента, так и для биотрансформаций в присутствии модификаторов. Полученные результаты означали, что даназол и мифепристон поступают в клетки, не ингибируют необратимо P450c17 и дрожжевой аналог 20 α -ГСД, но связываются с внутриклеточными структурами. Даназол и мифепристон, как ингибиторы рецепторов прогестерона, не изменили также уровня экспрессии аналога 20 α -ГСД. Замедленное образование 17 α -гидроксипрогестерона под действием кетоконазола на начальном этапе биотрансформации прогестерона отражает процесс замещения субстратом связанного с железом гема P450c17 имидазол-содержащего ингибитора – кетоконазола без его влияния на функциональные свойства аналога 20 α -ГСД.

Исследовано влияние комплексных соединений тиофенолов, а также N-замещенных тетразолов на выходы целевого и побочных продуктов при биотрансформациях прогестерона клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α . Результаты докинга комплексов «молекулярная

мишень-лиганд», а также подавление побочных реакций в трансгенных микроорганизмах изложено в соответствующих материалах настоящего сборника.

Литература:

1.Shkumatov V.M., Usova E.V., Poljakov Y.S., Frolova N.S., Radyuk V.G., Mauersberger S., Chernogolov A.A., Honeck H., Schunck W-H. Biotransformation of steroids by a recombinant yeast strain expressing bovine cytochrome P45017 α // Biochemistry (Moscow). 2002. Vol. 67, P. 547-560

2.Shkumatov V.M., Usova E.V., Radyuk V.G., Kashkan Zh.N., Kovganko N.V., Juretzek T., Mauersberger S. Oxidation of 17 α ,20 β - and 17 α ,20 α -dihydroхypregn-4-en-3-ones, side products of progesterone biotransformation with recombinant microorganisms expressing cytochrome P45017 α // Rus. J. Bioorg. Chem. 2003. Vol. 29, P. 640-647

3.Новикова Л.А., Фалетров Я.В., Ковалева И.Е., Мауерсбергер Ш., Лузиков В.Н., Шкуматов В.М. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям // Успехи биологической химии, 2009, Т.49, С.159-208

4.Nazarov P.A., Druza V.L., Miller W.L., Shkumatov V.M., Luzikov V.N., Novikova L.A. Formation and functioning of fused cholesterol side-chain cleavage enzymes // DNA Cell. Biol. 2003. Vol. 22, P. 243-252

Shkumatov V.M., Usova E.V., Frolova N.F., Barth G., Mauersberger S. Effect of steroid biosynthesis modifiers on progesterone biotransformation by recombinant yeasts expressing cytochrome P450c17 // Biochemistry (Moscow) Suppl.Series B: Biomedical Chemistry, 2007, Vol.1, P.87-94

TRANSGENIC MICROORGANISMS FOR BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY OF STEROID HORMONES BIOSYNTHESIS MODIFICATORS

V.M. Shkumatov

*Research Institute for Physical Chemical Problems, Belorussian State University,
Leningradskaya 14, 220030, Minsk, Belarus, E-mail: biopharm@bsu.by*

In this report stages of development of transgenic microorganisms, suitable for preliminary pharmacologic screening of drugs: 1) rational choice of “vector-host” systems; 2) minimization of sum of genome modifications and possible ways of side product formation by suitable promoters and inducers; 3) use of molecular docking of drugs and potential target proteins; 4) estimation of direct and side effects of newly synthesized compounds on molecular targets.

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛ-L-КАРНИТИНА И Mg-ТАУРИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У СТАРЫХ КРЫС

Абдо М., Шафрановская Е.В., Чернова Т.А., Погребняков И.А.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Неизбежный процесс старения сводится к появлению признаков «усталости» как отдельных органов и тканей, так и организма в целом. Увеличивающийся дефицит ряда питательных веществ и снижение их биодоступности, неконтролируемое нарастание окислительных процессов могут привести к ускорению процесса старения. Способствует этому один из многочисленных факторов – увеличение свободных радикалов и развитие окислительного или метаболического стресса, проявляющегося в нарушении в организме баланса между прооксидантами и компонентами системы антиоксидантной защиты. В

настоящее время для коррекции метаболизма в геронтологии используются препараты, содержащие таурин (Т) и N-ацетил-L-карнитин (АЛК). Таурин относят к серусодержащим аминокислотам. Он оказывает гипополипидемическое и гипохолестеринемическое действие, активизирует реакции всасывания и утилизации липидов и холестерина. Кроме того, нейромодуляторные свойства и высокие концентрации таурина в тромбоцитах определяют его участие в процессах агрегации, тромбирования артерий и регуляции сосудистого тонуса. Таурин участвует в синтезе многих других аминокислот, а также входит в состав основного компонента желчи, которая необходима для переваривания жиров и абсорбции жирорастворимых витаминов [1].

L-карнитин и его ацильные производные, из которых наиболее изучен N-ацетил-L-карнитин (АЛК), также выполняет важную функцию в организме человека. Он переносит остатки жирных кислот из цитоплазмы в митохондрии, обеспечивая запас субстрата для образования энергии, которая необходима для функционирования всех клеток, тканей и систем организма. N-ацетил-L-карнитин стабилизирует клеточные мембраны нейронов через регуляцию уровня сфингомиелина, предотвращая смерть нейронов, снижает окислительный стресс в тканях мозга и спинномозговой жидкости [2].

Цель данной работы заключалась в изучении отдельного и сочетанного действия АЛК и Mg-T на старых крысах-самках, выявление биохимических особенностей в их крови, гомогенатах печени и мозга.

В опыты брали крыс-самок линии WAG в возрасте 2-х лет, содержащихся на стандартном рационе вивария Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси. Животных распределили на 4 группы по 5 особей. В первой группе содержались крысы, получавшие внутрибрюшинно физраствор. Вторая группа получала N-ацетил-L-карнитин в дозе 200 мг/кг, третья группа – Mg-T в дозе 10 мг/кг и четвертая - N-ацетил-L-карнитин и Mg-T в соответствующих дозах. Все инъекции в опытных группах проводили внутрибрюшинно в течение 4-х дней. После гильотинной декапитации с последующей эссангвиацией отбирались кровь, печень и мозг. В сыворотке крови и гомогенатах печени и мозга определяли ряд биохимических показателей с помощью биохимического анализатора Hitachi 902.

Состояние прооксидантной системы организма оценивали по уровню диеновых конъюгатов (ДК), и содержанию малонового диальдегида (МДА). Состояние антиоксидантной системы (АОС) - по активности фермента каталазы (КА) в сыворотке крови.

Для определения показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ), таких как концентрация диеновых конъюгатов использовали метод В.Б. Гаврилова и соавт. (1988), малонового диальдегида – метод J.A.Buege and S.D.Aust (1977). Активность каталазы в сыворотке крови определяли с помощью методики М.А. Королюка и соавт. (1988).

Показано, что изучаемые аминокислоты вызывают снижение содержания как общих белков, так и фракции альбуминов в сыворотке крови у старых животных. При совместном воздействии АЛК и Mg-T также обнаруживается уменьшение концентрации белков, но без признаков аддитивности. Не обнаружено изменений в содержании мочевины, все опытные группы не имеют достоверных отличий относительно контроля. При изучении основных метаболических ферментов аминотрансфераз – АСТ и АЛТ – показано увеличение активности АСТ под влиянием АЛК и снижение – под влиянием Mg-T. Совместное действие аминокислот привело к нормализации этого параметра относительно контрольной группы. Достоверное снижение активности АЛТ показано в группе, получавшей Mg-T, а также в группе с совместным применением двух аминокислот. Содержание креатинина и глюкозы незначительно снижалось в крови у всех опытных групп. Отмечено также уменьшение концентрации холестерина, триглицеридов и снижение активности щелочной фосфатазы в

опытных группах относительно контроля. В ряде других биохимических показателей не отмечено каких-либо изменений при воздействии АЛК и Mg-Т.

Изучение показателей перекисного окисления липидов в сыворотке крови выявило наличие дисбаланса между прооксидантной и антиоксидантной системами защиты организма. Так, в экспериментальной серии животных с АЛК наблюдалось повышение уровня МДА – вторичного продукта ПОЛ по сравнению с контрольной группой. Возрастание на 36% продукта ПОЛ было достоверным в сравнении с контролем, но при этом активность каталазы имела тенденцию к снижению (70%). Mg-Т вызывал сходную картину изменений показателей ПОЛ. Отмечалась тенденция к увеличению концентрации (на 28%), но на фоне статистически значимого снижения активности каталазы (понижение составило 23% от контрольных величин).

Комбинация двух аминокислот АЛК и Mg-Т приводила к достоверному увеличению уровня МДА на 47% по сравнению с контролем. Низким оставалось содержание фермента каталазы. Уровень диеновых конъюгатов, являющихся первичными продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), не изменялся при приеме как одной, так и обеих аминокислот.

Исследование биохимических эффектов в гомогенате печени у всех опытных групп показало значительное повышение содержания белков, глюкозы, мочевой кислоты и триглицеридов. Отмечено разнонаправленное действие изучаемых аминокислот на активность аминотрансфераз. В опытных группах с Mg-Т увеличилась активность щелочной фосфатазы; активность ЛДГ исчезает при воздействии АЛК и значительно снижается при воздействии Mg-Т.

В гомогенате мозга отмечен рост концентрации глюкозы (менее интенсивный, чем в печени), мочевины, триглицеридов и увеличение активностей АСТ и ЛДГ под действием Mg-Т. В мозге при недостоверном увеличении белка наблюдалось повышение концентрации мочевины в опыте с таурином. Обе аминокислоты вызывают увеличение содержания мочевой кислоты.

Таким образом, в представленном исследовании метаболических эффектов у старых крыс-самок линии WAG после 4-х кратного введения АЛК и Mg-Т показано, что при достоверном росте показателей перекисного окисления липидов в крови усиливается синтез белка, включается механизм глюконеогенеза в печени. В тканях мозга и печени повышается катаболизм пуриновых нуклеотидов.

Литература:

1. Нефедов Л.И. Таурин. Биохимия, фармакология, медицинское применение / Гродно – Мн.: -1999.-145с.
2. Bagetta V, Barone I, Ghiglieri V, et al. Acetyl-L-carnitine selectively prevents post-ischemic LTP via a possible action on mitochondrial energy metabolism // *Neuropharmacology*-2008.-Vol.55.-P.223-229.

THE INFLUENCE OF N-ACETYL-L-CARNITINE AND Mg-TAURINE ON CHARACTERISTICS OF OLD RATS METABOLISM

Abdo M., Shafranovskaya E.V., Chernova T.A., Pogrebnyakov I.A.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141 Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

The influence of N-acetyl-L-carnitine and Mg-taurine on biochemical characteristics of blood, liver and brain of old rats was researched. Fourfold introduction of these amino acids has led to positive effects against the background of lipid peroxidation increase.

ПОТЕНЦИАЛ ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО (*TRIGONELLA FOENUM GRAECUM* L.) КАК ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПАРАФАРМАЦЕВТИКОВ

Агабалаева Е.Д., Гончарова Л.В., Спиридович Е.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Сурганова, 2 в, E-mail: plechischik@rambler.ru

В мировой медицинской практике для лечения многих заболеваний человека предпочтение часто отдается препаратам растительного происхождения, которые, по сравнению с синтетическими, характеризуются мягким и более широким спектром терапевтического действия. С целью расширения сырьевой базы лечебных препаратов в ботанических садах проводят изучение лекарственных растений для дальнейшего их выращивания в условиях культуры.

Trigonella foenum graecum L. – пажитник греческий – однолетнее лекарственное и пряно-ароматическое растение сем. Fabaceae, получившее признание во всем мире и активно возделываемое в странах Азии, Африки, Америки, Южной и Средней Европы, в частности, во Франции, Германии, Австрии и Венгерской Республике. В бывшем СССР культура пажитника греческого была развита в Армении и Азербайджане, в СНГ широко культивируется в Украине и Киргизии [1]. Лекарственным сырьем являются семена пажитника греческого, которые содержат комплекс биологически активных соединений: стероидные сапонины (диосгенин, ямогенин, тигогенин, неотигогенин), полисахариды (галактоманнаны), свободные аминокислоты (4-гидроксиизолейцин (0,09%), аргинин, гистидин, лизин), флавоноиды (апигенин, лютеолин, ориентин, кверцетин, витексин, изовитексин), жирное масло, витамины (А, С, В, Р), каротиноиды, алкалоиды (тригонеллин (0,2-0,36%), холин (0,5%), гентиан, карпаин), кумарины (скополетин, умбеллиферон), оксикоричные кислоты (кислота хлорогеновая, кислота кофейная, кислота неохлорогеновая), фенолокислоты (кислота салициловая, кислота галловая) и др.

Особого внимания заслуживают три биологически активных соединения пажитника греческого: диосгенин, галактоманнаны и 4-гидроксиизолейцин, которые, по мнению многих исследователей, обладают широким спектром биологического действия.

Гипохолестеролемический эффект семян пажитника греческого обусловлен наличием в них галактоманнанов, а также стероидных сапонинов. Галактоманнаны пажитника греческого значительно уменьшают уровень холестерина в плазме крови, а также способствуют снижению синтеза холестерина в печени. Некоторые исследователи предполагают, что галактоманнаны снижают абсорбцию липидов в следствии уменьшения их эмульгирования. Это происходит из-за увеличения размера капельки липидов в мицелле, что приводит к уменьшению поверхности для липолиза. Также, растворимые волокна (галактоманнаны) пажитника греческого, как было доказано в исследованиях, способны подавлять синтез холестерина в печени путем ингибирования активности 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзимА редуктазы, которая отвечает за биосинтез холестерина [2]. Стероидные сапонины (в частности, диосгенин) обладают гипохолестеролемической и гемолитической активностью за счет их способности образовывать комплексы с холестерином эритроцитарных мембран, что приводит к лизису последних.

Семена пажитника греческого обладают гликемическим эффектом за счет содержания в них галактоманнанов и свободной аминокислоты - 4-гидроксиизолейцина. Механизмы, посредством которых диетические пищевые волокна приводят к улучшению гомеостаза глюкозы у людей, страдающих диабетом, возможно, связаны с присоединением молекул сахара к галактоманнанам, и дальнейшим уменьшением их всасывания в желудочно-кишечном тракте, сопровождаемое снижением уровня глюкозы в крови и изменением

секреции инсулина. Исследования, проводимые на животных, показали, что 4-гидроксиизолейцин непосредственно вызывает стимуляцию бета клеток поджелудочной железы [3].

Стероидные сапонины действуют на репродуктивную систему животных, стимулируя овуляцию и сперматогенез [4], а также обладают антиканцерогенными свойствами из-за ингибирования активности β -глюкокоронидазы – фермента, который гидролизует токсины и мутагены, высвобождая активные канцерогенные вещества в печени [5]. Кроме того, пажитник греческий обладает антиоксидантной активностью (за счет содержания широкого спектра флавоноидов), гастропротекторным, фунгицидным, антивирусным и антимикробным эффектом.

На мировом фармацевтическом рынке на основе пажитника греческого (*Trigonella foenum graecum* L.) выпускается препарат пасенин, обладающий антисклеротическим действием, Fenumax (Fenuber) антидиабетического действия, Fenoil, увеличивающий лактацию, Sterofen, понижающий уровень холестерина без влияния на триглицериды (Kentucky Biosafety Consultants Inc., USA).

С 2006 года сорт пажитника греческого Ovary 4 успешно выращивается в ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». На сегодняшний день в коллекции пряно-ароматических и лекарственных растений ботанического сада содержатся 2 сорта пажитника греческого (Ovary Gold, Ovary 4) и линия PSZ.G.SZ, любезно предоставленные коллегами кафедры лекарственных растений факультета сельскохозяйственных и пищевых продуктов Западно-венгерского Университета. Учитывая перспективы использования семян пажитника греческого для получения лекарственных препаратов, нами была определена семенная продуктивность и урожайность культивируемых растений пажитника греческого. Самые высокие показатели семенной продуктивности отмечены для сорта Ovary Gold (3,4 г/на 1 растение), самые низкие - для сорта Ovary 4 (2 г/на 1 растение.). Урожайность семян пажитника греческого варьирует от 35,2 г/на 1м² (Ovary 4) до 45,4 г/на 1м² (линия PSZ.G.SZ). Таким образом, самые высокие показатели семенной продуктивности и урожайности отмечены для сорта Ovary Gold и линии PSZ.G.SZ. Исходя из того, что пажитник греческий проходит все стадии развития (вегетация, бутонизация, цветение, плодоношение), дает жизнеспособные семена, подтверждена возможность выращивания данной культуры в климатических условиях Беларуси.

Литература:

1. Дикорастущие полезные растения России / под ред. А.Л. Буданцева, Е.Е. Лесиовской. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.
2. McCarty, M. F. Glucomannan minimizes the postprandial insulin surge: a potential adjuvant for hepatothermic therapy / M. F. McCarty // Medical Hypotheses. – 2002. – Vol. 58, №6. – P. 487-490.
3. Broca, C. 4-Hydroxyisoleucine: Effects of synthetic and natural analogues on insulin secretion / C. Broca [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2000. – Vol. 390. – P. 339-345.
4. Kharya, M.D. Fertility regulation potential of Fenugreek seeds (MAPS-P-408) / M.D. Kharya // International Pharmaceutical Federation World Congress. – 2002. - Vol. 62. – P. 133.
5. Devasena T. Fenugreek affects the activity of β -glucuronidase and mucinase in the colon / T. Devasena, V. P. Menon // Phytotherapy Research. – 2003. - Vol. 17. - P. 1088-1091.

THE POTENTIAL OF FENUGREEK (*TRIGONELLA FOENUM GRAECUM* L.) AS SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FOR PRODUCE PARAPHARMACEUTICAL PRODUCTS

Agabalaeva E.D., Goncharova L.V., Spirydovich E.V.
The Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) is a perspective medicinal and aromatic plant of family *Fabaceae*. It possesses antidiabetic, hypocholesterolemic, antioxidative, gastroprotective, antimicrobial, anticarcinogenic and antihypertensive effects due to presence of a wide spectrum of biologically active substances such as galactomannans, steroid saponins, 4-hydroxyisoleucine, flavonoids, fatty oil, carotenoids and alkaloids. In The Central Botanical Garden of the NAS of Belarus researches on studying of features of growth, seed efficiency, yield of fenugreek have been conducted.

МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА, ИНДУЦИРОВАННАЯ 5-ФТОРУРАЦИЛОМ

¹Алексеевко О.В., ¹Шилов В.В., ¹Кардаш О.Ф., ³Юдина О.А., ¹Красненкова Т.П.,
¹Забело О.И., ¹Федулова Е.В., ³Копач П.С., ³Жердецкая Н.А., ²Булгак А.Г., ²Колядко
М.Г., ²Островский Ю.П.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: onza@yandex.ru;

²ГУ «РНПЦ «Кардиология» МЗ Беларуси;

³УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»

Актуальность. 5-Фторурацил является противоопухолевым антиметаболитом, применяемым в медицине на протяжении 40 лет. Данное соединение является аналогом пиримидина и действует за счет неконкурентного ингибирования синтеза тимидина. 5-Фторурацил обладает различными побочными действиями. К одному из самых неблагоприятных его клинических эффектов относится кардиотоксичность, встречающаяся в 1,5-18% случаев и приводящая в 2,2-13% к смертельному исходу [1]. В экспериментальных исследованиях изучались механизмы кардиотоксичности препарата, однако модель патологии сердца не описана.

Цель. Оценить возможность моделирования сердечной патологии с помощью 5-фторурацила.

Материал и методы. Использовались крысы самки линии SHR (n=5, вес 150-200 г) и WKI (n=5, вес 150-200 г) в возрасте 2-4 месяцев, которым в течение 7 дней ежедневно внутрибрюшинно вводился 5-фторурацил в дозе 25 мг/кг.

Для оценки состояния сердца выполнялась запись электрокардиограммы. Регистрация показаний ЭКГ осуществлялась с помощью полифункционального комплекса Biopac Systems MP 150 (США). Оценивались амплитудные (амплитуда зубцов Р и R, смещения сегмента ST) и временные (длительность интервала PQ, комплекса QRS) параметры.

Трансторакальное эхокардиографическое (эхоКГ) исследование крыс проводилось при помощи ультразвуковой системы Sonos 5500 (фирма "Hewlett Packard", США) с использованием секторного кардиологического датчика S12 с частотой 12 МГц. Животное после фиксации в положении на спине поворачивали на левый бок. Датчик с осторожностью (чтобы избежать брадикардии и остановки сердца) устанавливали левее грудины, после чего поперечное сечение сердца выводили на уровне папиллярных мышц. Полученные

изображения в М-режиме записывали при скорости развертки 100 мм/с. Структурные и функциональные характеристики оценивали в соответствии с рекомендациями Американского и Европейского обществ по эхокардиографии [2]. При проведении количественного анализа измеряли в 3 сердечных циклах следующие показатели левого желудочка (ЛЖ) в М-режиме: конечный диастолический (КДД) и конечный систолический (КСД) диаметры левого желудочка, толщину задней стенки (ЗС) левого желудочка и межжелудочковой перегородки (МЖП), систолическую экскурсию задней стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки, частоту сердечных сокращений (ЧСС). Конечный диастолический и конечный систолический объемы ЛЖ измеряли в 4-камерной позиции по методу «площадь-длина», в этой же позиции определяли конечно-диастолическую и конечно-систолическую площадь правого желудочка (ПЖ). На основании полученных данных рассчитывали ударный и минутный объемы, фракцию выброса (ФВ) ЛЖ, а также фракцию изменения площади (ФИП) ПЖ. Локальную сократимость (ЛС) оценивали в 4-камерной позиции, нормокинетичному сегменту присваивали 1 балл, гипокинетичному - 2 балла, акинетичному - 3 балла. Индекс ЛС рассчитывали исходя из соотношения количество баллов визуализированных сегментов/количество визуализированных сегментов.

Турбидиметрическим методом с использованием тест-системы на биохимическом анализаторе «Hitachi» (Япония) определяли активность креатинфосфокиназы (КФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), миоглобин, уровень глюкозы. Для определения концентрации миоглобина, активности фракции МВ креатинфосфокиназы (КФК-МВ) применялась система Triage-meter, США. Общий анализ крови проводился с помощью гемоанализатора Hemacount (Германия).

Исследования выполнялись под уретановым наркозом перед проведением вмешательства, через 7 суток после ЭИМ и перед декапитацией животных. Кровь для биохимического и общего анализа крови забиралась из боковой хвостовой вены.

Аутопсию выполняли на 30 сутки эксперимента. Изучали макро-, микроскопические, гистохимические изменения миокарда крыс. Сердца взвешивали. Оценивали форму (овальное, конусообразное, каплевидное, шаровидное) и размеры (длина от устья аорты до верхушки, ширина на уровне оснований желудочков) сердца. Определяли состояние эпикарда и наружного листка перикарда, наличие экссудата, наложений, шероховатостей, спаек в полости перикарда. Производили вскрытие полостей сердца по направлению тока крови. Констатировали состояние эндокарда и миокарда (кровоизлияния, некроз, склероз, пристеночный тромбоз).

Для гистологического исследования брали фрагменты миокарда межжелудочковой перегородки (МЖП), передней и задней стенки левого желудочка (ЛЖ) с папиллярными мышцами в верхней и средней трети, основание и верхушку сердца. Гистологическое исследование проводили после фиксации образцов 10% нейтральным формалином и стандартной гистологической проводки. Исследованы срезы толщиной 5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. Для оценки остроты ишемии миокарда с учетом временного критерия использована гистохимическая окраска MSB (marcius, scarlet, blue): оранжевое окрашивание - < 8 часов; малиновое - 8-24 часа; голубое - > 24 часов.

Статистическая обработка проводилась с использованием однофакторного анализа ANOVA пакета программ STATISTICA 8.0 (Statistica Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения. Для сравнения между группами использовался критерий Ньюмена-Кейлса. Уровень доверительной вероятности $p < 0,05$ расценивался как статистически значимый.

Результаты. В нашем эксперименте через 7 суток после фармакологического воздействия (введение 5-фторурацила) у животных формировалась сердечная недостаточность (СН). Однако ни одна крыса не погибла.

Данные ЭКГ свидетельствовали о повреждении миокарда у всех животных: отмечалось статистически значимое снижение R-зубца, в среднем, на 66% по сравнению с исходными данными ($91,5 \pm 30,3$ мВ и $60,1 \pm 43,3$ мВ, соответственно исходно и на 7 сутки введения препарат, $p=0,039$), увеличение амплитуды Q-зубца ($32,6 \pm 8,5$ мВ и $48,6 \pm 12,7$ мВ, соответственно исходно и на 7 сутки введения препарат, $p=0,002$). Также происходило удлинение интервала PQ ($16,5 \pm 2,4$ мс и $20,2 \pm 0,9$ мс, соответственно исходно и на 7 сутки введения препарат, $p=0,0001$), что говорило о токсическом воздействии на проводящую систему.

При ЭхоКГ выявлено снижение сократимости в верхушечных сегментах ЛЖ сердца у 5 животных из 10, что привело к увеличению индекса ЛС ЛЖ до $1,2 \pm 0,3$ у.е. против 1 у.е. исходно ($p=0,03$) и уменьшению ФВ ЛЖ ($85,0 \pm 2,6\%$ и $66,6 \pm 7,4\%$, соответственно исходно и на 7 сутки введения препарата, $p=0,00001$). Следует отметить достоверное уменьшение ФИП ПЖ ($49,4 \pm 11,5\%$ и $25,3 \pm 18,9\%$, соответственно исходно и на 7 сутки введения препарат, $p=0,005$) у 9 из 10 животных, при этом у 3 крыс функция ПЖ была значительно нарушена (ФИП была менее 25%).

При оценке маркеров повреждения миокарда выявлено значительное повышение КФК, КФК МВ и ЛДГ в различные временные интервалы (на 7 и 30 сутки). Так, на 30 сутки уровень данных ферментов значительно превышал таковые при исходном исследовании: КФК составлял $2549,81 \pm 1759,71$ ед/л ($p=0,045$, по сравнению с исходными данными), КФК МВ - $4390,60 \pm 2967,24$ ед/л ($p=0,04$, по сравнению с исходными данными), ЛДГ - $2262,63 \pm 1377,32$ ед/л ($p=0,04$, по сравнению с исходными данными). В то же время концентрация миоглобина $78,83 \pm 50,9$ мкг/л ($p=0,26$, по сравнению с исходными данными) свидетельствовала о давности более недели повреждающего воздействия.

При макроскопическом исследовании во всех сердцах присутствовали признаки расстройства микроциркуляции в миокарде ЛЖ и МЖП в виде инъекции сосудов и очагов неравномерного кровенаполнения. В 6 из 10 объектов на передней, боковой и задней стенке ЛЖ выявлены очаговые субэндокардиальные кровоизлияния диаметром до 0,3 см. В 4 сердцах имело место циркулярное обеднение кровенаполнения миокарда в средней трети ЛЖ.

При световой микроскопии во всех случаях выявлены обширные участки острой ишемической дистрофии миокарда ЛЖ, которые при оценке временного критерия укладываются в срок от 8 до 24 часов. В цитоплазме кардиомиоцитов стенок ЛЖ отмечается исчезновение поперечной исчерченности. В миокарде МЖП более распространены контрактурные изменения кардиомиоцитов. В субэндокардиальных отделах ЛЖ периваскулярно имеются кровоизлияния сливного характера с очаговым цитолизом прилежащих кардиомиоцитов без клеточной демаркации. Во всех сердцах в строме миокарда ЛЖ и МЖП отмечается неравномерно выраженный отек.

Выводы. В результате проведенного исследования была разработана модель острого повреждения миокарда, обусловленная прямым токсическим действием препарата с развитием хронического воспаления коронарных сосудов.

Литература:

1. Матяш М.Г., Кравчук Л.Г., Высоцкая В.В., Чернов В.И., Гольдберг В.Е. Не-антрациклиновая кардиотоксичность // Сибирский онкологический журнал. 2009. №5 (35).
2. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. /Schiller NB [et al.]// J Am Soc Echocardiogr. – 1989. - V. 2. – P. 358–367.

MODEL OF CHRONIC MYOCARDIAL ISCHEMIA INDUCED BY 5-FLUOROURACIL

¹Alekseenko O.V., ¹Shilov V.V., ¹Kardash O.F., ³Judina O.A., ¹Krasnenkova T.P., ¹Zabelo O.I., ¹Fedulova E.V., ³Kopach P.S., ³Zherdeckaya N.A., ²Bulgak A.G., ²Koljadko M.G., ²Ostrovsky Y.P.

¹*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Scientific and Practical Center of Cardiology;*

³*City's clinical pathologicoanatomic office*

Fluorouracil is famous remedy for treatment oncopathology has some cardiotoxicity. Several cardiotoxic medicines use to produce experimental chronic heart failure. There is no evidence of modeling cardiac pathology for this drug in animal. In our study we revealed electrocardiographic, echocardiographic, laboratory and histological data that indicated myocardial injuries and chronic inflammation of coronary vessels in SHR and WKI rats due to injection of 25 mg/kg 5-fluorouracil for 7 days i.p.. Thereby, the model of nontransmural myocardial injury without heart dilation in the SHR and WKI rats was obtained.

ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ КУРКУМИНА

Анисович М.В., Пытлев С.И., Афонин В.Ю., Шилов В.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Актуальность проблемы. В работе представлены данные о влиянии субстанции диферулоилметан (основной активный компонент коммерческой субстанции, экстрагированной из *Curcuma longa L.*) на пролиферацию раковых клеток *in vitro*. Препараты куркумина назначают для профилактики и лечения нарушений кровообращения, ревматоидного артрита, остеоартрита, гепатита, нарушений пищеварения, нарушения менструального цикла. В настоящее время в Беларуси продается желчегонный препарат чешского производства «Холагол», в состав которого входит куркума, а в РФ - препарат «Панкурмен» фирмы «BERLIN-CHEMIE» (Германия), предназначенный для нормализации процесса пищеварения.

Цитостатические свойства куркумина хорошо известны и подробно исследованы, однако нерастворимость соединения в воде не позволяет его использовать для инвазивного и внутримышечного введения в организм человека. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке способов адресной доставки куркумина к злокачественным новообразованиям с использованием методов микрокапсулирования, наполнения фуллеренов и стеклянных нанотрубок раствором препарата в жировых эмульсиях и т.д.[1].

Для решения данной проблемы нами была изучена возможность получения стабилизированных водных растворов куркумина методом осаждения в стабилизирующий раствор на основе поверхностно активных соединений.

Получены данные о влиянии температуры и концентрации ПАВ в стабилизирующем растворе стабилизирующего раствора, концентрации спиртового раствора куркумина и их соотношений на размер осаждающихся частиц соединения и их способность к агрегации. Определены оптимальные концентрации. Разработана лабораторная методика получения водных субстанций стабилизированного раствора куркумина.

Цель. Изучить цитостатические свойства разработанных растворов на линии клеток рака легкого (A549).

Материалы и методы. Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе (Herpa Cell) при 37°C, 5% CO₂, относительной влажности воздуха 80% на 96-луночных планшетах (посевная концентрация - 50 тыс. кл./мл). В лунки с прикрепившимися клетками (вторые сутки культивирования) вносили исследуемые фракции диферулоилметана, растворенные в 0,28%-м растворе ТВИН-100. Образцы различались между собой по размерам частиц и добавлялись в концентрациях 0,04-50 мг/л для образцов №1 (смесь различных по размерам частиц куркумина) и №3 (мелкодисперсная смесь куркумина), диапазон изучаемых концентраций для образца №2 (среднедисперсная смесь) находился в пределах 0,16-200 мг/л. После 24-часовой экспозиции исследуемых образцов фотометрически измерялась суммарная активность митохондриальных дегидрогеназ клеток в каждой лунке в метилтетразолиевом тесте (МТТ). Этот тест основан на способности живых метаболически активных клеток переводить соль тетразолина (MTS) в формазан, растворимый в среде культивирования. Таким образом, поглощение формазана прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток в культуре.

Для проведения МТТ использовали набор CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega. Для измерения поглощения формазана клетки инкубировали с MTS в течение 20 минут в термостате, измерение поглощения формазана при $\lambda = 492$ нм проведено на приборе для иммуноферментного анализа фирмы Awareness, Microplate Rider Stat Fax 3200.

Результат оценки статистически обработан средствами Excel. Активность каждого образца оценивалась по показателю IC₅₀ (средняя ингибиторная концентрация – концентрация препарата, которая подавляет на 50% данную клеточную функцию).

Результаты. Анализ полученных данных показал, что наиболее выраженным цитостатическим действием обладает образец №1, минимальная IC₅₀ которого составила 5 мг/л. Отмечено, что при незначительном уменьшении концентрации (1 мг/л и менее) негативный эффект образца №1 на клетки резко сводится к нулю. Увеличение же концентрации исследуемого образца до 50 мг/л при данном сроке экспозиции не привело, как ожидалось, к полному подавлению активности митохондриальных дегидрогеназ, напротив – активность ферментов возросла на 10% по сравнению со значениями при минимальной IC₅₀, указанной выше. Для образцов №2 (среднедисперсная фракция) и №3 (мелкодисперсная фракция) IC₅₀ составили 100 мг/л и 25 мг/л соответственно, при этом, как и для образца №1, наблюдается резкое снижение эффективности исследуемых препаратов при меньших концентрациях. В то же время при увеличении концентраций ингибирующий эффект обоих образцов не изменяется по сравнению со значениями при минимальных IC₅₀.

Выводы. Таким образом, установлена прямо пропорциональная зависимость между значениями эффективных концентраций стабилизированных растворов куркумина и размерами его частиц. Оценка характера действия различных концентраций диферулоилметана позволяет предположить, что цитостатический эффект каждого из образцов будет зависеть не только от размера частиц, но и от времени экспозиции препарата.

Предварительные результаты исследования цитостатических эффектов диферулоилметана, представленные в работе, говорят о том, что дальнейшие разработка способов получения и изучение свойств водных куркуминсодержащих субстанций с различным размером частиц могут оказаться весьма перспективными в лечении и профилактике злокачественных новообразований.

Литература:

1. Bisht, S. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy /S. Bisht, G. Feldmann, S. Soni, // Int. J. Nanomedicine, 2009. P.115-122.

CYTOSTATIC PROPERTIES OF AQUEOUS SOLUTIONS ON THE BASE OF CURCUMIN

Anisovich M.V., Pytlev S.I., Afonin V.Yu., Shilov V.V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The cytostatic properties of stabilized aqueous solutions of polydisperse curcumin have been studied on the human lung epithelial cell line by cell proliferation test. The linear proportional dependence has been detected between effective concentrations of curcumin and particles size. Optimal conditions for synthesis of substances with different particles have been determined.

The further development of methods for obtaining of aqueous substances with curcumin particles of different size may be perspective for working out of drug substances for invasive cure of cancer and cardiological diseases.

НОВЫЙ ИНДУКТОР КЛЕТОЧНОЙ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЯДУ ЭКРАНИРОВАННЫХ ФЕНОЛОВ

¹Бизунок Н.А., ¹Дубовик Б.В., ²Полозов Г.И., ²Шадыро О.И.

¹Белорусский государственный медицинский университет, Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, E-mail: bizunokna@bsmu.by;

²Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14, E-mail: shadyro@open.by

Последнее десятилетие исследований в области свободнорадикальной биологии и медицины завершилось констатацией факта, что важнейшим генератором активных форм кислорода (АФК) в биосистемах являются мембранотропные ферменты НАДФН-оксидазы (НОКС). Обнаружено участие этих ферментов во множестве адаптивных и патологических реакций и не вызывает сомнения актуальность создания фармакологических средств управления их активностью. Большая часть исследований посвящена разработке ингибиторов НОКС, однако с нашей точки зрения, индукторы, как потенциальные лекарственные средства, не менее перспективны, поскольку НОКС-зависимый киллинг является важнейшим механизмом действия ряда противоопухолевых средств и фактором потенцирования противоопухолевой и, возможно, антибактериальной активности [1]. С этих позиций нас заинтересовало соединение BS03 – серусодержащее производное 4,6-ди-трет-бутилфенола, синтезированное группой ученых БГУ, которое способно индуцировать генерацию АФК в НОКС-содержащих клетках in vitro.

Методы исследования. Действие BS03 на НОКС-зависимую генерацию АФК исследовали на резидентных перитонеальных макрофагах крыс. АФК регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на люминометре LKB-Wallac-1251 (Финляндия). Исследование начинали сразу после внесения BS03 в кювету люминометра, содержащую макрофаги и люминол. Конечные концентрации BS03 составляли 10^{-9} - 10^{-4} М.

Регистрацию ЛХЛ проводили при 37°C на протяжении 30 минут. Эксперименты воспроизводили в 3-9 повторностях. Количественную оценку образования АФК проводили по площади под кривой ЛХЛ (AUC). Показатели ЛХЛ проб, содержавших BS03, выражали в % к контрольным.

В качестве ингибиторов BS03-индуцированной продукции оксидантов (BS03-ИПО) исследовали *мелатонин*, *аскорбиновую кислоту*, ингибитор кальциевых каналов *нифедипин*, агонист β -адренорецепторов *изопrenalин*, блокатор Na^+ и K^+ -ионных каналов *хинидин*, ингибитор внутриклеточного транспорта *колхицин* и *3,5-ди-трет-бутилпирокатехин*, (F3) ранее зарекомендовавший себя, как высокоэффективный антиоксидант на модели макрофагальной генерации АФК [2], индуцированной опсонизированным зимозаном.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5%. Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ЛХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации ($\text{IC}_{16} - \text{IC}_{84}$) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,0».

Результаты. BS03 в диапазоне концентраций $6 \times 10^{-6} - 10^{-4}$ М вызывал взрывную генерацию АФК, которая достигала максимальных значений к 6-10 мин исследования, а затем быстро снижалась и на 20-25 мин приближалась к контролю. Если известный индуктор НАДФН-оксидазной генерации АФК опсонизированный зимозан усиливал люминесценцию модельной системы в 10-20 раз, то BS03 превосходил его более чем на порядок. Повторное внесение BS03, также как и опсонизированного зимозана на 15-20 мин процесса не индуцировало генерации АФК в макрофагах. Зафиксирована нелинейная зависимость эффекта от концентрации с экстремумом в значении 3×10^{-5} М (таблица).

Исследование действия биологически активных соединений, эффективно подавляющих зимозан-индуцированную генерацию АФК, на индукцию, вызванную BS03, показало, что антиоксидантная активность хинидина, нифедипина и изопrenalина не отличалась от таковой в тесте с опсонизированным зимозаном. Высокоэффективными ингибиторами в отношении BS03-ИПО оказались аскорбат ($\text{IC}_{50} \sim 1,5 \times 10^{-5}$ М) и соединение F3 ($\text{IC}_{50} \sim 1,3 \times 10^{-8}$ М). Колхицин ингибировал BS03-ИПО до 35% (10^{-4} М); мелатонин существенного влияния не оказывал.

Таблица

Действие BS03 на продукцию оксидантов в макрофагах
(AUC, % к контролю)

C, [M]	n	M \pm SD
10^{-9}	3	98 \pm 47
10^{-8}	3	112 \pm 40
10^{-7}	3	111 \pm 48
10^{-6}	9	113 \pm 60
3×10^{-6}	6	160 \pm 62
6×10^{-6}	4	695 \pm 454
10^{-5}	7	3249 \pm 1500* (P<0,01)
3×10^{-5}	5	3579 \pm 1860* (P<0,02)
10^{-4}	7	2040 \pm 1375* (P<0,01)

Таким образом, в ряду экранированных производных фенола обнаружен новый индуктор клеточной генерации активных форм кислорода (соединение BS03), дальнейшее изучение которого представляется перспективным с позиций изыскания новых средств управления клеточной генерацией оксидантов.

Литература:

1. *Jérôme Alexandre* Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species / Jérôme Alexandre, Yumin Hu, Weiqin Lu, Helene Pelicano, Peng Huang // *Cancer Research*. 2007. V. 67. P. 3512 -3517.

2. *Бизунок Н.А.* Влияние экранированных фенолов на клеточную генерацию свободных радикалов кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // *Рецепт*. 2006. № 6. С. 34-38.

NOVEL INDUCTOR OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION BY CELLS IN A SERIES OF ORTHOSUBSTITUTED PHENOL DERIVATIVES

¹Bizunok N.A., ¹Dubovik B.V., ²Polozov G.I., ²Shadyro O.I.

¹*Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky av. 83, 220016, Minsk, Belarus;*

²*Belarusian State University, Leningradsky str. 14, 220030, Minsk, Belarus*

Novel stimulant of the reactive oxygen species production by macrophages created upon screening of a different orthosubstituted phenol derivatives. It has been 10-20-fold more potent than opsonized zymosan with turning-point concentration 30 μ M. It seems to be interesting further investigations of its pharmacological activity and toxicity.

СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ α -ТОКОФЕРОЛА МОДУЛИРУЮТ ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МАКРОФАГАМИ

¹Бизунок Н.А., ¹Дубовик Б.В., ²Полозов Г.И., ²Шадыро О.И.

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Беларусь, 220016, Минск, пр. Дзержинского, 83, E-mail: bizunokna@bsmu.by;*

²*Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14, E-mail: shadyro@open.by*

Несмотря на то, что в медицинской практике природные и синтетические фенольные соединения давно и широко используются в качестве средств коррекции свободнорадикальной патологии, их терапевтическая эффективность, как правило, не соответствует теоретическим предпосылкам и ожиданиям. Причины неудач многообразны. Одной из них является представление о полифенолах, как «универсальных» антирадикальных агентах, способных ингибировать любые свободнорадикальные реакции *ex vivo*. Действительно, в модельных химических системах показано, что блокирование фенолами окислительных процессов обусловлено их способностью восстанавливать кислород-центрированные органические радикалы до гидропероксидов, давая при этом стабильные, мало активные феноксильные радикалы (PhO•). В то же время, участие фенолов в регуляции процессов окисления, протекающих в сложных биосистемах, не столь однозначно и требует дополнительного изучения на доказательных моделях. В этой связи представляется интересным испытание ряда серосодержащих аналогов α -токоферола на модели генерации кислород-центрированных радикалов в фагоцитарных клетках [1]. Предварительные исследования показали, что эти соединения регулируют свободнорадикальные реакции, протекающие с участием кислород- и углерод-центрированных радикалов при радиоллизе гексана и этанола [2, 3].

Методы исследования. Антиокислительную активность соединений исследовали на резидентных перитонеальных макрофагах крыс. Клетки инкубировали с исследуемыми

соединениями при комнатной температуре в течение 5 минут до внесения индуктора респираторного взрыва (опсонизированного зимозана). Продукцию фагоцитами АФК регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на люминометре LKB-Wallac-1251 (Финляндия). Регистрацию ЛХЛ проводили при 37⁰ С на протяжении 30 минут. Каждый эксперимент воспроизводили 3-6-и кратно. Количественную оценку образования АФК проводили по площади под кривой ЛХЛ. Показатели ЛХЛ проб, содержащих исследуемые соединения, выражали в % к аналогичным показателям контроля. Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления люминесценции, определяя эффективные ингибирующие концентрации (IC₁₆ – IC₈₄) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,0»

Испытанные серосодержащие аналоги α-токоферола представлены в таблице 1.

Таблица 1

Перечень изученных серосодержащих структурных аналогов α-токоферола

Шифр	Название	[С], М ¹
α-ТсОН	α-Токоферол	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
I	6-Гидрокси-1,4-бензоксантин-2(3Н)-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
II	6-Метокси-1,4-бензоксантин-2(3Н)-он	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
III	6-Гидрокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантин-2(3Н)-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
IV	6-Метокси-5,7,8-триметил-1,4-бензоксантин-2(3Н)-он	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
V	6-Гидрокси-3,5,7,8-тетраметил-1,4-бензоксантин-2(3Н)-он	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
VI	2-(6-Гидрокси-5,7,8-триметил-2-оксо-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-3-ил) уксусная кислота	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
VII	5,7,8-Триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
VIII	2,5,7,8-Тетраметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
IX	2-(Гидроксиметил)-5,7,8-триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵
X	2-(2,5-Дигидрокси-3,4,6-триметилфенилтио) уксусная кислота	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁴
XI	2-(2,5-Дигидроксифенилтио) уксусная кислота	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁴
XII	5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
XIII	5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵
XIV	5-Гидрокси-1,3-бензоксатиол-2-тион	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵
XV	5-Гидрокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-тион	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵
XVI	5-Метокси-1,3-бензоксатиол-2-тион	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴
XVII	5-Метокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵

Результаты. На модели респираторного взрыва фагоцитов антиоксидантная активность соединений I, VIII, XI, XVI сопоставима с таковой α-токоферола, соединения II и X на порядок уступали ему, остальные обладали меньшей активностью (таблица 2), либо не проявляли антиоксидантных свойств (соединения IV, VI, VII, XV, XVII).

Таблица 2

Эффективные ингибирующие концентрации (IC) серосодержащих аналогов α-токоферола на модели респираторного взрыва макрофагов (по AUC ЛХЛ)

¹ Диапазон испытанных концентраций.

Шифр	IC, M					Коэффициенты регрессии	
	16	30	50	70	84	<i>a</i>	<i>b</i>
α -TcOH	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$8,8 \cdot 10^{-6}$	—	—	-2,68	-0,53
I	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	—	-6,29	-1,20
II	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	—	-3,68	-0,83
III	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	-5,15	-1,07
V	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$7,8 \cdot 10^{-5}$	—	—	—	-3,00	-0,82
VIII	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$	—	—	-10,17	-2,03
IX	$8,0 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	—	-0,86	-0,31
X	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$	$8,6 \cdot 10^{-5}$	-5,68	-1,22
XI	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	-4,4	-0,86
XII	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$8,7 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	-2,82	-0,63
XIII	$5,6 \cdot 10^{-6}$	$9,7 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	-6,90	-1,45
XIV	$5,8 \cdot 10^{-7}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	-1,90	-0,42
XVI	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	-2,78	-0,53

Анализ полученных результатов показывает, что антиоксидантная активность испытанных соединений зависит от характера и местоположения заместителей в бензольном кольце. Интересно то, что соединения II и XVI, содержащие карбонильную группу, но лишённые гидроксильной, проявляют заметные антиоксидантные свойства в исследованном диапазоне концентраций. Подобный факт зафиксирован нами и ранее при скрининге экранированных производных фенола [4]. Вне зависимости от исходной активности соединения, появление метильных заместителей в положении 5-, 7- и 8- приводит к снижению или полной утрате антиоксидантных свойств (I—III, XI—X, XIV—XV, XVI—XVII). Ранее в тесте радиолитического гексана показано, что антиокислительная эффективность соединений VII и VIII в отношении как алкильных, так и пероксильных радикалов одинакова и сопоставима с таковой α -токоферола, тогда как другие (XIII) менее эффективны в отношении алкильных радикалов или не проявляют антиоксидантных свойств (XVII). Интересно и то, что соединения менее эффективные в отношении кислород-центрированных радикалов, более эффективно блокируют реакции, протекающие с участием углерод-центрированных радикалов (XIII, XVII) [2, 3]. В свою очередь, эти же соединения менее активны в нашем исследовании, что вполне объяснимо, учитывая природу генерируемых фагоцитами АФК [1] и радикальные трансформации самого люминофора.

Проведенный скрининг позволил выделить среди аналогов токоферола соединения, обладающие значительным антиоксидантным потенциалом на модели клеточной генерации активных форм кислорода и перспективные для тестирования на наличие фармакологической активности *ex vivo*.

Литература:

1. Joe V. Production of oxygen-centered radicals by neutrophils and macrophages as studied by electron spin resonance (ESR) / Joe V. Bannister and William H. Bannister // *Environmental Health Perspectives*. 1985. V. 64. P. 37-43.
2. Povalishev V.N. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals / V.N. Povalishev, G.I. Polozov, O.I. Shadyro // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2006. V.16. P. 1236-1239.

3. *Повалишев В.Н.* Влияние α -токоферола и его серосодержащих аналогов на радиационно-химические превращения гексана и этанола / В.Н. Повалишев, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // *Химия высоких энергий*. 2006. Т.40. № 5. С. 349-354.

4. *Бизунок Н.А.* Влияние экранированных фенолов на клеточную генерацию свободных радикалов кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // *Рецепт*. 2006. № 6. С. 34-38.

α -TOCOPHEROL AND RELATED COMPOUNDS MODULATES THE REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION BY MACROPHAGES

¹Bizunok N.A., ¹Dubovik B.V., ²Polozov G.I., ²Shadyro O.I.

¹*Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky av. 83, 220016, Minsk, Belarus;*

²*Belarusian State University, Leningradsky str. 14, 220030, Minsk, Belarus*

Effects of α -tocopherol and a number of the respective sulfur-containing analogues on reactive oxygen species (ROS) generation by macrophages were studied. The test compounds were found to inhibit ROS production by macrophages in dose dependent manner. The presence of a sulfur atom in structures of the respective analogues did not increase its activity versus α -tocopherol.

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА МОДЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

¹*Бизунок Н.А.*, ¹*Дубовик Б.В.*, ²*Шадыро О.И.*

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, E-mail: bizunokna@bsmu.by;*

²*Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14, E-mail: shadyro@open.by*

Полифенолы, обладающие не только антирадикальными свойствами, но и разнообразной фармакологической активностью, относятся к числу наиболее востребованных в медицинской практике антиоксидантов. Центральное место в биосинтезе большинства фенольных соединений (флавонов, халконов, катехинов, кумаринов и др.) у высших растений, используемых в качестве лекарственного сырья, занимает коричная кислота и её гидроксильные производные. Структурные особенности этих соединений – наличие сопряженной системы, включающей ароматическое ядро, виниленовую и карбоксильную группы, создают предпосылки для проявления высокой реакционной способности в отношении активных форм кислорода (АФК) различной природы. Действительно, в модельных химических системах показано, что метилированные и гидроксильные производные коричной кислоты – эффективные ловушки супероксидного и гидроксильного радикалов кислорода [1]. Важнейшим источником супероксидного радикала в организме млекопитающих являются фагоциты, обеспечивающие, тем самым, не только иммунную защиту, но и повреждение молекулярных структур с развитием свободнорадикальной патологии. Целью настоящего исследования было изучить антиоксидантный потенциал производных коричной кислоты в отношении АФК, генерируемых фагоцитами в ответ на индукцию респираторного взрыва по рецептор-зависимому механизму.

Методы исследования. Антиокислительную активность соединений исследовали на резидентных перитонеальных макрофагах крыс, которые получали по общепринятой

методике. Макрофаги инкубировали с исследуемыми соединениями при комнатной температуре в течение 5 минут до внесения индуктора респираторного взрыва (опсонизированного зимозана). Продукцию фагоцитами АФК регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на люминометре LKB-Wallac-1251 (Финляндия). Регистрацию ЛХЛ проводили при 37⁰ С на протяжении 30 минут. Каждый эксперимент воспроизводили 3-6 раз. Количественную оценку образования АФК проводили по площади под кривой ЛХЛ. Показатели ЛХЛ проб, содержащих исследуемые соединения, выражали в % к аналогичным показателям контроля. Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления люминесценции, определяя эффективные ингибирующие концентрации (IC₁₆ – IC₈₄) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,0»

Испытанные соединения: коричную кислоту (I), циннамальдегид (II), (*E*)-3-фенил-2-пропен-1-ол (III), (*E*)-3-(3,4-дигидроксифенил) акриловую кислоту (iV), (*E*)-3-(4-Гидрокси-3-метоксифенил) акриловую кислоту (V), (*E*)-3-(4-Гидрокси-3,5-диметоксифенил) акриловую кислоту (VI) исследовали в концентрациях 10⁻⁸-10⁻⁴ М.

Результаты. Установлено, что на модели респираторного взрыва макрофагов коричная кислота и её производные обладают выраженной антиоксидантной активностью. Исключением явилось соединение III, которое ингибировало совокупную индуцированную клеточную генерацию АФК (по AUC) в максимуме на 30% при концентрации 44,0 мкМ. Активность соединений V и VI, содержащих метокси- и гидрокси- группы в арильном фрагменте молекулы примерно соответствовала активности коричной кислоты, которую на порядок (по DAUC) превосходил циннамальдегид (II). В исследованном диапазоне концентраций наиболее активным и эффективным антиоксидантом оказалось соединение IV, IC₈₄ которого в отношении АФК респираторного взрыва составило 43,0 мкМ.

Таблица

Антиоксидантный потенциал производных коричной кислоты на модели респираторного взрыва макрофагов		
Соединение ²	IC ₅₀ , мкМ ³	
	AUC ⁴ , %	DAUC ⁵ , %
I	46,0 (22,3÷95,5)	73,0 (22,2-240)
II	17,0 (12,6÷21,9)	7,9 (4,6-13,5)
III	>100	NI
IV	9,0 (7,0÷11,4)	4,6 (1,6-12,9)
V	70,0 (33,8÷144)	26,0 (12,3-56,3)
VI	68,0 (26,0÷178,0)	28,0 (11,2-70,5)

Ранее показано, что среди соединений I-IV, последнее является наиболее активным ингибитором генерации супероксидного анион-радикала в тесте аутоокисления эпинефрина [1]. Поскольку известно, что в реакциях свободнорадикального окисления более предпочтительным является участие атомов с наименьшими значениями связевых чисел,

² Соединения I-VI исследовали в диапазоне концентраций 10⁻⁸-10⁻⁴ М.

³ В скобках указан доверительный интервал значений для IC₅₀.

⁴ AUC – IC₅₀ рассчитана по площади под кривой ИХЛ, выраженной в % к контролю.

⁵ DAUC – IC₅₀ рассчитана по площади под кривой ИХЛ, исключая фоновое свечение клеток, в % к контролю.

характеризующих степень «ненасыщенности» атома, авторы исследования объясняют полученный результат наибольшими значениями индекса суммарной ненасыщенности молекулы IV по результатам проведенного ими квантово-химического анализа [2]. Эти данные согласуются с результатами нашего исследования, давая основание считать гидроксипроизводные коричной кислоты эффективными радикальными ловушками, дальнейшее изучение которых представляется перспективным с позиций фармакологии и свободнорадикальной медицины.

Литература:

1. Агаджанян В.С. Целенаправленный поиск соединения-лидера в ряду производных коричной кислоты, обладающих антирадикальной активностью / В.С. Агаджанян, Э.Т. Оганесян, В.Т. Абаев // Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44. №7. С. 21-26.
2. Агаджанян В.С. Применение квантово-химических методов анализа для интерпретации антирадикальной активности в ряду гидроксипроизводных коричной кислоты / В.С. Агаджанян, Э.Т. Оганесян // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. №11. С. 12-17.

ANTIRADICAL ACTIVITY OF CINNAMIC ACID DERIVATIVES IN TEST OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION BY CELLS

¹Bizunok N.A., ¹Dubovik B.V., ²Shadyro O.I.

¹Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky av. 83, 220016, Minsk, Belarus;

²Belarusian State University, Leningradsky str. 14, 220030, Minsk, Belarus

The reactive oxygen species production by macrophages has been studied afore of different hydroxy and methoxy derivatives of cinnamic acid. The high antioxidant activity of (*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acrylic acid has been confirmed, which can be of interest for the creation of new drugs.

РОЛЬ ЭРИТРОЦИТОВ И ГЕМОГЛОБИНА В ТРАНСПОРТЕ И ПЕРОКСИДАЗНОЙ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФЛАВОНОЛОВ

¹Бондарюк Е.В., ²Сенчук В.В.

¹Белорусский государственный университет;

²Белорусско-голландское совместное предприятие «Фармлэнд»

Флавонолы относятся к одной из групп флавоноидов – биологически активных соединений полифенольной природы растительного происхождения [1]. Выполняя в растениях защитные функции, флавоноиды в целом и флавонолы в частности обладают широким спектром активностей и в организме человека и животных, проявляя антиоксидантные, антирадикальные, противовирусные, противораковые и витаминные свойства [1]. Предполагается, что механизмы биологического действия флавонолов включают ингибирующее действие на целый ряд ферментов, среди которых выделяются протеинкиназа С, фосфолипаза А₂, малатдегидрогеназа, ксантиноксидаза и многие другие [2]. Показано, что истинные пероксидазы, такие как тиреопероксидаза, миелопероксидаза, глутатион-пероксидаза могут окислять фенольные соединения, в том числе и флавонолы [2]. Не являясь истинной пероксидазой, но, входя в группу так называемых псевдопероксидаз,

гемоглобин в присутствии H_2O_2 также может окислять различные сравнительно простые фенольные соединения. С другой стороны, показано, что поступающие с растительной пищей флавоноиды эффективно всасываются в желудочно-кишечном тракте, поступают в системный кровоток, где могут свободно проникать и накапливаться в эритроцитах [1,2]. В связи этим темой нашего исследования стало изучение возможной роли эритроцитов и гемоглобина в аккумуляции, распространении и биодоступности флавоноидов циркулирующих в кровотоке. Для этого был поставлен ряд задач: изучение транспорта и накопления флавонолов в эритроцитах; изучение взаимодействия флавонолов с гемоглобином и сывороточным альбумином методом флуоресцентной спектроскопии; кинетический анализ ферментативных процессов окисления флавонолов гемоглобином; спектральный анализ субстратов и продуктов реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов; анализ субстратов и продуктов псевдопероксидазной реакции методом обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии оф-ВЭЖХ (HPLC). Для исследований был выбран ряд структурно родственных флавонолов: кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонол), рутин (3-рутинозид кверцетина), морин (3,2',4',5,7-пентагидроксифлавонол) и физетин (3,3',4',7-пентагидроксифлавонол).

Методы исследования. Реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов при участии гемоглобина, транспорт и накопление флавонолов в эритроцитах исследовали, как описано ранее [3]. Взаимодействие флавонолов с гемоглобином и сывороточным альбумином изучали методом флуоресцентной спектроскопии [4]. Образование продуктов псевдопероксидазной реакции определяли методом обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии оф-ВЭЖХ [5].

Результаты. Кверцетин, физетин и морин, но не рутин, эффективно проникают через мембрану эритроцитов. В присутствии сывороточного альбумина наблюдается выход флавонолов из предварительно нагруженных эритроцитов и установление равновесия между внутри- и внеклеточной концентрацией флавонолов. Можно говорить о системе транспорта флавонолов кровью, которая включает сывороточный альбумин, эритроциты и гемоглобин. Имеет место распределение флавонолов по следующим фракциям: свободные флавонолы в плазме крови; флавонолы, связанные с сывороточным альбумином; внутриэритроцитарный пул флавонолов, который включает свободные флавонолы в строме эритроцитов и флавонолы, связанные с гемоглобином.

Определены каталитические параметры реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов разными формами гемоглобина: начальная скорость, удельная и молекулярная активность (таблица). Лучшим субстратом для псевдопероксидазной реакции, катализируемой восстановленным гемоглобином и мет-гемоглобином, является физетин, затем идут кверцетин, морин и рутин. Для HbO_2 последовательность иная: кверцетин > морин > физетин > рутин. Во всех случаях наиболее активна в превращении флавонолов окисленная форма гемопroteина. Хотя интенсивность псевдопероксидазного окисления флавонолов на 2 порядка ниже в сравнении с окислением флавонолов истинными пероксидазами, можно уверенно говорить о достаточно эффективном метаболизме флавонолов с участием гемоглобина. При этом расходование пероксида водорода в реакциях с истинными пероксидазами в 2-4 раза ниже. То, что имеет место неэффективное расходование пероксида водорода, может играть положительную роль для обезвреживания опасных для организма избытков перекисей. В то же время, доля образующегося метгемоглобина, который является наиболее эффективной формой для катализа данной реакции, незначительна.

Таблица

Молекулярная и удельная активность разных форм гемоглобина в реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов

Субстрат	mHb		Hb		HbO ₂	
	УА	МА	УА	МА	УА	МА
кверцетин	35±0,002	2,397±0,144	17±0,001	1,140±0,068	29±0,003	1,944±0,117
физетин	39±0,003	2,690±0,161	36±0,003	2,472±0,148	24±0,002	1,653±0,099
морин	30±0,002	2,052±0,123	21±0,002	1,414±0,085	26±0,002	1,747±0,105
рутин	14±0,001	0,925±0,056	8±0,001	0,538±0,032	9±0,001	0,606±0,036

УА – удельная активность в нмоль/мин на 1 мг белка

МА – молярная активность в моль/мин на 1 моль белка

Флавонолы являются не только субстратами псевдопероксидазной реакции, но могут одновременно выступать в роли модификаторов катализатора данной реакции. Они эффективно восстанавливают мет-форму гемоглобина, полученную обработкой нитритом натрия, до его окси-формы в том случае если избыток нитрита был удален из раствора. Кверцетин является наиболее эффективным ингибитором нитритиндуцированного метгемоглобинообразования. Эта способность убывает в ряду кверцетин >> морин > физетин > рутин. Все изученные флавонолы кроме кверцетина обладают весьма низкой окислительной активностью по отношению к оксигемоглобину.

Методом UV-Vis-спектрофотометрического анализа показано образование промежуточных и конечных продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов кверцетина, физетина, морина и рутина в системе, содержащей H₂O₂ и гемоглобин в качестве катализатора. В процессе окисления происходит характерное изменение в спектре поглощения флавонолов с исчезновением полосы 1 и 2 и появлением полосы 3 (кроме рутина). Сходство спектральных изменений при пероксидажном и псевдопероксидажном окислении флавонолов заставляет предположить образование сходных как промежуточных, так конечных и продуктов окисления.

HPLC-анализ позволяет установить образование ряда промежуточных и конечных продуктов окисления, среди которых гидроксibenзойные кислоты (максимум поглощения 293 нм) и метиленихиноновые производные, а также неустановленные продукты с максимума поглощения 252-259 и 293 нм. Установлен факт разрыва С-кольца в структуре 2-(фенил)-хромен-4-она, а также критичность для этого процесса доступности свободной гидроксильной группы при С3.

Заключение. Кверцетин, физетин и морин, но не рутин, эффективно проникают через мембрану эритроцитов, которые могут играть роль естественных депо и транспортеров флавонолов. Сравнение кажущихся констант взаимодействия флавонолов с сывороточным альбумином и метгемоглобином, определенных методом линейной регрессии говорит о том, что первичным переносчиком флавонолов служит сывороточный альбумин. Однако внутриклеточный пул флавонолов может играть роль их естественного резервуара. Результаты изучения реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов разными формами гемоглобина показывают, что эффективность окисления флавонолов восстановленным гемоглобином и мет-гемоглобином уменьшается в ряду физетин > кверцетин > морин > рутин. Для оксигенированной формы последовательность иная: кверцетин > морин > физетин > рутин. Окисленная форма гемопотеина наиболее активна в превращении флавонолов. Флавонолы являются не только субстратами псевдопероксидажной реакции, но могут одновременно выступать в роли модификаторов катализатора данной реакции. Таким образом, результаты работы позволяют заключить, что эритроциты и гемоглобин могут выполнять значительную роль в транспорте, накоплении и биотрансформации наиболее распространенных природных флавонолов.

Литература:

1. Andersen O.M., Markham K. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, 2005, 1256 p.
2. O'Brien P.J. Peroxidases // Chem. Biol. Interact. 2000. V.129. P. 113.
3. E.V.Bondaruk, V.V.Sentchouk. Bioaccumulation and biotransformation of flavonols by erythrocytes // Chemistry of natural compounds. Vol.45, N2. 2009.P.174-181.
4. V.V.Sentchouk, E.V.Bondaruk. Fluorescent analysis of interaction of flavonoles with hemoglobin and bovine serum albumin // Journal of Applied Spectroscopy. Vol.74, N5, 2007, P.731-736.
5. Е.В. Бондарюк, В.В. Сенчук. Изучение роли гемоглобина в пероксидазном метаболизме флавонолов // Биохимия. Сборник научных статей / Под общей редакцией В. В. Сенчука - Мн. : БГУ, 2006. - С. 30 - 50.

THE ROLE OF ERYTHROCYTES AND HEMOGLOBIN IN TRANSPORT AND PEROXYDASE BIOTRANSFORMATION OF FLAVONOLS

¹Bondaruk E.V., ²Sentchouk V.V.

¹Belarussian State University;

²Belarus-holland joint venture «Pharmland»

Transport and accumulation of flavonols (quercetin, fizeetin, morin and rutin) in erythrocytes and influence on this process of serum albumin was investigated. Interaction of flavonols with hemoglobin and serum albumin was studied by the method of fluorescent spectroscopy. Analysis of substrates and products of reaction by the methods of UV-Vis spectroscopy and the reversed-phase HPLC-analysis has shown formation of some intermediate and final products of reaction, among which hydroxybenzoic acids and quinon methide derivatives were found. It is assumed that erythrocytes and hemoglobin play an appreciable role in transport, accumulation and biotransformations of the flavonols studied.

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА, L-ГЛУТАМИНА И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Бородинский А.Н., Караедова Л.М.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by

Эффекты этанола на метаболические процессы организма, в частности на углеводный обмен, изучаются с использованием различных моделей при введении различных доз этанола.

Острая алкогольная интоксикация приводит к накоплению восстановительных эквивалентов в ткани печени, что приводит к увеличению стационарной концентрации НАДН [1]. Кроме того, однократно введение этанола (2,5 г/кг) снижает уровень инсулина в сыворотке крови, содержание гликогена изменением активности ферментов гликолиза [2].

Целью работы являлось изучение состояния гликолиза и изучение влияния смеси L-аргинина, L-глутамината и сукцината при острой алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. В эксперименте были использованы белые крысы самцы массой 180-220г. Животные содержались на обычном рационе вивария. Анализ литературных

данных отражающих влияние однократного введения алкоголя на обмен, позволил остановиться на дозах 1; 2,5; 5,0 г/кг массы тела.

Перед декапитацией все животные содержались без пищи при свободном доступе к воде. Крысам контрольной группы внутриастрально вводили 1мл физиологического раствора. Этанол вводили внутриастрально в виде 10% раствора в дозе 1г/кг; в виде 25% раствора в дозе 2,5 г/кг; 25% раствор этанола в дозе 5,0 г/кг массы тела.

Декапитацию проводили через 1 час после введения этанола. Кроме того, на фоне этих 3-х доз этанола совместно внутриастрально вводили смесь L-аргинина (500 мг/кг), L-глутамина (500 мг/кг) и сукцината (50 мг/кг). В гомогенатах печени определяли активность гексокиназы (ГК); фосфофруктокиназы (ФФК) и содержание глюкозы, Г-6-Ф, пирувата, лактата. В плазме крови определяли содержание АТФ. Определение вышеуказанных показателей проводилось общепринятыми методами [3].

Результаты работы оценивали статистически с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Острая однократная нагрузка этанолом приводит к снижению уровня гликемии. Одновременно снижено содержание Г-6-Ф, субстрата находящегося на перекрестке альтернативных путей обмена углеводов, при введении 2,5 и 5,0 г/кг этанола (табл. 1).

Отмеченные эффекты в изменении субстратов начальных этапов гликолиза могут быть следствием изменения активности ГК. Действительно, как видно из результатов приведенных в табл. 2 активность ГК снижена при нагрузке этанолом в дозах 1,0 г/кг и 5,0 г/кг на 46% и 36% соответственно.

Введение препарата повышает активность ГК печени практически до контрольных величин (табл. 2). По всей видимости препарат может увеличивать продукцию инсулина, что приводит к повышению активности ГК печени.

Таблица 1. Содержание некоторых субстратов углеводного обмена и АТФ в плазме крови крыс получавших различные дозы алкоголя.

Показатель	Условия эксперимента						
	Алкоголь 1 г/кг	Алкоголь 1 г/кг + препарат	Алкоголь 2,5 г/кг	Алкоголь 2,5 г/кг +препарат	Алкоголь 5,0 г/кг	Алкоголь 5,0 г/кг + препарат	Контроль
АТФ мкМ/мл	M=0,20±0,01	M=0,33±0,04	M=0,28±0,05	M=0,42±0,03	M=0,23±0,03	M=0,43±0,03	M=0,58±0,02
Пируват мкМ/мл	M=0,09±0,007	M=0,09±0,007	M=0,10±0,007	M=0,1±0,005	M=0,1±0,005	M=0,12±0,07	M=0,08±0,009
Лактат мкМ/мл	M=1,41±0,09	M=1,91±0,17	M=1,35±0,08	M=2,12±0,09	M=1,71±0,07	M=2,21±0,12	M=1,46±0,04
Глюкоза мкМ/мл	M=3,86±0,27	M=4,65±0,19	M=4,10±0,17	M=4,56±0,24	M=5,25±0,30	M=5,26±0,50	M=5,08±0,32
Г-6-ф мкМ/мл	M=0,28±0,01	M=0,36±0,01	M=0,21±0,02	M=0,33±0,01	M=0,16±0,01	M=0,35±0,01	M=0,30±0,01

Таблица 2. Содержание некоторых субстратов углеводного обмена в печени крыс однократно получавших различные дозы этанола.

Показатель	Условия эксперимента						
	Алкоголь 1 г/кг	Алкоголь 1 г/кг + препарат	Алкоголь 2,5 г/кг	Алкоголь 2,5 г/кг +препарат	Алкоголь 5,0 г/кг	Алкоголь 5,0 г/кг + препарат	Контроль
Г-6-ф мкМ/г	M=0,28±0,01	M=0,36±0,01	M=0,19±0,02	M=0,36±0,01	M=0,18±0,02	M=0,28±0,02	M=0,27±0,01
Глюкоза	M=4,86±0,19	M=5,80±0,23	M=5,46±0,24	M=7,13±0,33	M=6,81±0,49	M=7,98±0,34	M=5,13±0,32

мкМ/г							
Лактат мкМ/г	M=1,56±0,06	M=1,66±0,09	M=1,78±0,04	M=1,66±0,12	M=2,15±0,05	M=1,58±0,07	M=1,61±0,05
Активность ГК n моль/мг	M=10,3±0,9	M=17,6±0,6	M=16,3±1,3	M=18,3±1,2	M=11,6±1,2	M=19,0±0,8	M=19,0±1,1
Активность ФФК n М/мг	M=15,0±1,0	M=17,3±1,0	M=14,3±1,4	M=18,3±0,9	M=11,6±1,2	M=19,0±0,8	M=20,3±0,9

Для более полной оценки начальных этапов гликолиза была изучена активность ФФК печени. Анализ результатов представленных в табл. 2 выявил, что вводимый в дозах от 1,0 до 5,0 г/кг этанол привел к снижению скорости ФФК реакции на 22%, 30% и 43%. острая нагрузка этанолом в диапазонах доз от 1,0 до 5,0 г/кг привела к значительному снижению концентрации АТФ. Так у особей получавших этанол 1,0; 2,5; 5,0 г/кг уровень АТФ был ниже на 64%; 52%; 60% (табл. 1).

Введение препарата увеличивает уровень лактата на 35%; 57% и 29% соответственно (табл. 1).

Для более полной оценки начальных этапов гликолиза была изучена активность ФФК печени. Анализ результатов представленных в табл. 2 выявил, что вводимый в дозах от 1,0 до 5,0 гр/кг этанол привел к снижению скорости ФФК реакции на 22%, 30% и 43%. острая нагрузка этанолом в диапазонах доз от 1,0 до 5,0 г/кг привела к значительному снижению концентрации АТФ. Так у особей получавших этанол 1,0; 2,5; 5,0 г/кг уровень АТФ был ниже на 64%; 52%; 60% (табл. 1).

Введение животным препарата увеличило содержание АТФ. Введение препарата нормализовало скорость ФФК реакции лишь у животных которые получали высокую дозу (5,0 г/кг) этанола (табл. 2).

Введение препарата увеличивает уровень лактата на 35%; 57% и 29% соответственно (табл. 1).

Заключение. Острая алкогольная интоксикация сопровождается выраженными метаболическими нарушениями углеводного обмена, что вносит вклад в понимание патохимических нарушений при алкоголизме. Препарат, содержащий в своем составе L-аргинин, L-глутамин, сукцинат оказывает выраженное энергооптимизирующее действие, нормализует некоторые показатели углеводного обмена, что необходимо учитывать при его применении в качестве метаболического корректора при алкоголизме.

Литература:

1. Островский Ю.М., Островский С.Ю. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и печени алкоголизма. - 1995, Минск: Наука и техника. – 279с.
2. Лелевич С.В., Бородинский А.Н. Нарушения метаболизма глюкозы в мускулатуре крыс в динамике. Развитие алкглльного абстинентного синдрома.// Вопросы наркологии. - 2008. - 5. - с.87-92.
3. Мильман Л.С., Юровицкий Л.П., Ермолаева Л.П. Методы биологии развития. -1974, М.: Накуа. - 6-19 с.

EFFECT OF L-ARGININE, L-GLUTAMINE AND SUCCINIC ACID ON THE STATE OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN ACUTE ALCOHOL INTOXICATION

Borodinsky A.N., Karayedova L.M.

The state of carbohydrate metabolism was studied under acute ethanol load. It was shown that the substance containing L-arginine, L-glutamine and succinate exerted a pronounced energy-optimizing effect.

СКРИНИНГ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОМБИНАЦИОННОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА.

Буко В.У., Нарута Е.Е., Белановская Е.Б., Кузьмицкая-Николаева И.А.

*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал,
230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: buko@biochem.unibel.by*

Для лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) в настоящий момент не существует определенных схем, а применение большинства препаратов все еще находится на стадии разработок. При этом большое внимание уделяют препаратам, корректирующим липидный обмен (фибраты), а также обладающим цитопротекторным действием (эссенциале, производные холевой кислоты). Считается, что урсодезоксихолевая кислота (УДХК), которая в настоящее время с достаточно высокой эффективностью используется для лечения холестатических поражений печени, алкогольных стеатогепатитов, может использоваться при стеатогепатитах неалкогольного генеза [1]. Имеется большое количество экспериментальных и клинических данных о применении УДХК в терапии НАСГ. Мы акцентировали наше исследование на комбинационной терапии НАСГ, являющейся на сегодняшний день наиболее прогрессивным подходом к фармакотерапии НАСГ [2] и включающей препараты, которые воздействуют на различные звенья патогенетической цепи исследуемой патологии. Целью данной работы было изучение эффективности ряда комбинаций УДХК для лечения НАСГ у крыс и отбор наиболее эффективных сочетаний для дальнейших исследований.

Материалы и методы. В опыте использованы белые крысы-самцы линии Вистар с начальной массой 180-200 г. Опытные животные в течение 10 недель содержались на диете с повышенным содержанием жира (34%, w/w), дефицитной по холину и метионину (МХДД), со свободным доступом к корму. Контрольные крысы получали стандартный рацион вивария. Все животные были разделены на следующие группы: 1-я – контроль вивария; 2-я – МХДД, 10 недель; 3-я – МХДД+холин (3 г/кг корма) + метионин (2 г/кг корма) – контроль диеты; 4-я – МХДД + УДХК (30 мг/кг). В последующих группах УДХК комбинировалась с препаратами: 5-я – липоевая кислота, 10 мг/кг; 6-я – глицин – 30 мг/кг; 7-я – холин-салицилат, 10 мг/кг; 8-я – симвастатин, 10 мг/кг; 9-я – аminosалициловая к-та, 10 мг/кг; 10-я – пентоксифиллин – 20 мг/кг; 11-я – Zn-гистидин – 2,5 мг/кг; 12-я – α -токоферол – 10 мг/кг. Препараты вводили в комбинации с УДХК (30 мг/кг), ежедневно, в/ж, начиная с 7-й недели опыта и до конца эксперимента. Все препараты вводились в виде раствора в 0,5%-ной карбоксиметилцеллюлозе. Контрольные группы получали воду. По окончании эксперимента у животных забирали печень и кровь.

Степень развития стеатоза оценивали морфометрически на срезах печени, окрашенных Суданом чёрным, с помощью компьютерного сканирования. В сыворотке измеряли активность аланин- и аспаратаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, содержание липидных и липопротеидных фракций, а также триглицеридов печени с помощью наборов

фирмы «Lachema» (Чехия) согласно прилагаемым инструкциям. Уровень глюкозы в крови измерялся с помощью глюкометра Accu-Chek (Roche Diagnostics GmbH, Germany), концентрация инсулина - радиоиммунным способом с набором для определения инсулина «Рио-ИНС-ПГ-¹²⁵I» (Минск, Беларусь). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента, $P < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное отличие.

Результаты исследования. После 6 недель содержания крыс на МХДД в печени примерно на 25% площади паренхимы наблюдался умеренный стеатоз и баллонная дистрофия гепатоцитов. К 10-й неделе скормливания диеты в печени отмечалась макровезикулярная жировая дистрофия, сопровождающаяся рассеянной лимфоцитарной инфильтрацией. Относительная площадь суданофильных областей в этой группе превышала контрольные значения более чем в 4 раза.

Таблица. 1. Площадь суданофильного окрашивания паренхимы и содержание триглицеридов печени крыс, содержащихся на МХДД.

Группы	Площадь суданофильной области, %	Триглицериды, печень, .мг/100 г ткани
Контроль	3,32±0,49	1028±57
МХДД	15,89±2,40 ^a	4926±235 ^a
МХДД+Холин+Метионин	5,98±1,03 ^B	2307±145 ^{a,B}
УДХК+липоевая к-та	8,03±1,17 ^{a,B}	3286±346 ^{a,B}
УДХК+глицин	9,54±0,86 ^a	4282±367 ^a
УДХК+холин-салицилат	9,66±0,94 ^a	2507±348 ^{a,B}
УДХК+симвастатин	11,07±1,07 ^a	3812±512 ^a
УДХК+аминосалициловая к-та	8,27±1,78 ^{a,B}	4123±318 ^a
УДХК+пентоксифиллин	10,04±0,90 ^a	3611±242 ^{a,B}
УДХК+Zn-гистидин	11,32±0,95 ^a	2926±297 ^{a,B}
УДХК+α-токоферол	8,64±0,84 ^{a,B}	4147±284 ^a

Здесь и далее: а - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;
в - $P < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей МХДД.

Таблица. 2. Активность маркерных ферментов сыворотки крыс, содержащихся на МХДД (МЕ/л)

Группы	АлАТ	АсАТ	Щелочная фосфатаза
Контроль	0,51±0,02	0,73±0,03	173±7,42
МХДД+Холин+Метионин	0,67±0,03	0,73±0,02	203,0±13,8
МХДД	1,72±0,05 ^a	2,47±0,09 ^a	422,6±42,6 ^a
УДХК+липоевая к-та	0,67±0,02 ^{a,B}	0,76±0,03 ^B	264,8±29,9 ^{a,B}
УДХК+глицин	0,96±0,05 ^{a,B}	1,11±0,04 ^{a,B}	299,3±24,7 ^{a,B}
УДХК+холин-салицилат	0,87±0,03 ^{a,B}	1,07±0,03 ^{a,B}	287,6±26,5 ^{a,B}
УДХК+симвастатин	0,68±0,03 ^{a,B}	0,70±0,03 ^B	319,0±30,1 ^a
УДХК+ аминосалициловая к-та	0,85±0,05 ^{a,B}	1,02±0,04 ^{a,B}	388,2±21,76 ^a
УДХК+пентоксифиллин	0,65±0,03 ^{a,B}	0,74±0,07 ^B	233,0±31,8 ^B
УДХК+Zn-гистидин	0,92±0,04 ^{a,B}	0,94±0,04 ^{a,B}	332,9±30,7 ^a
УДХК+α-токоферол	1,11±0,05 ^{a,B}	0,91±0,03 ^B	326,4±33,9 ^a

Наличие стеатогепатита подтверждается и результатами биохимических исследований. В сыворотке крыс с НАСГ(10 недель) отмечался рост активности маркерных ферментов –

аминотрансфераз (более чем в 3 раза) и щелочной фосфатазы (в 2 раза), увеличение концентрации глюкозы и уменьшение инсулина.

Содержание липидных фракций снижалось в сыворотке, тогда как в печени интенсивность накопления липидов, напротив, усиливалась. Длительное кормление животных высокожировой МХДД приводило к резкому повышению в печени количества триглицеридов – почти в 5 раз.

Введение УДХК в комбинациях с изучаемыми соединениями приводило к следующим изменениям. Как показали гистологические исследования, при морфометрической оценке срезов печени, окраска которых проводилась с помощью Судана черного, отмечено достоверное уменьшение накопления липидов в группах, получавших УДХК в сочетании с липоевой и аминосалициловой кислотами, а также с α -токоферолом.

Как уже отмечалось, 10-недельное содержание крыс на МХДД приводит к росту концентрации глюкозы в крови и снижению уровня сывороточного инсулина. Относительная нормализация обоих показателей отмечена в группах животных, которым на фоне УДХК вводили липоевую кислоту, либо холин-салицилат. В случае остальных препаратов двойного эффекта не наблюдалось. Положительное влияние на уровень глюкозы крови (но не инсулина) оказывали пентоксифиллин, симвастатин и Zn-гистидин.

Все изучавшиеся препараты ингибировали активность сывороточных аланин- и аспартатаминотрансфераз. Достоверное снижение имело место во всех опытных группах примерно в одинаковой степени. Что касается другого маркерного фермента – щелочной фосфатазы, то здесь достоверные положительные сдвиги отмечены лишь в группах, получавших липоевую кислоту, глицин и пентоксифиллин, остальные комбинации не оказывали влияния на ферментную активность.

После 4-х недельной терапии неалкогольного стеатогепатита исследуемыми комбинациями препаратов практически во всех группах были отмечены положительные сдвиги в уровне триглицеридов печени, однако наиболее выраженным результат был в случаях сочетания УДХК с липоевой кислотой, холин-салицилатом, Zn-гистидином либо пентоксифиллином.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения гепатопротективных свойств комбинации УДХК с липоевой кислотой, показавшей максимальную защитную активность при экспериментальном НАСГ, вызванном скармливанием МХДД, за счёт снижения площади суданофильной окраски срезов печени и угнетения аккумуляции триглицеридов в печени.

Литература:

1. Lukivskaya O., Zavodnik L., Knas M., Buko V. Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis. *Advances in Medical Sciences*, 51: 9-14, 2006
2. Буко В.У Современные подходы к фармакотерапии неалкогольных стеатогепатитов *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия мед. наук.* 2008, № 4, с. 55-62

SCREENING OF PREPARATIONS FOR COMBINATION PHARMACOTHERAPY OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Buko V.U., Naruta E.E., Belanovskaya E.B., Kuzmitskaya-Nikolaeva I.A.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus

The aim of this study was to evaluate the effects of UDCA in combination with proven and promising hepatoprotectors in rats fed methionine and choline deficient diet (MCDD). Male Wistar

rats (180 - 200 g) were fed MCDD during 10 weeks. Rats from 4 MCDD-fed groups were daily administered with UDCA (30 mg/kg, i.g.) in combination with lipoic acid (LA, mg/kg), glycine (Gly, mg/kg), simvastatin (Sim, mg/kg), aminosalicyclic acid (AsA, mg/kg), pentoxyphilline (Ptx, mg/kg), bezafibrate (Bez, mg/kg) and α -tocopherol (Toc, mg/kg) during the last two weeks on the experiment. The data obtained suggest that among the combinations TA with UDCA is more effective as hepatoprotectors.

РОНКОЛЕЙКИН И В-ВИТАМИНЫ В ЛЕЧЕНИИ СЕПСИСА

¹Виноградов С.В., ²Виноградов В.В.

¹*Городская клиническая больница скорой медицинской помощи,
Гродно, ул. Сов. пограничников, 15;*

²*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал,
230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by*

Сформировавшееся в начале века классические представления о сепсисе в последнее десятилетие кардинально изменились. Согласно [1], септический процесс характеризуется фазовым течением: SIRS (синдром системной воспалительной реакции) - CARS (синдром компенсаторного противовоспалительного ответа) - MOD (мультиорганный дисфункциональный синдром). В настоящее время под SIRS подразумевают системный ответ не только на инфекцию, но и на разнообразные экстремальные воздействия и на агрессию - травму, ожоги, повторные оперативные вмешательства, радиационные повреждения, шоки и т.п. При этом ключевую роль в динамике процесса SIRS/MOD играет не генерализованное размножение бактериальной микрофлоры, а реакция организма на повреждение клинически проявляющаяся симптомами SIRS.

Следовательно, сепсис является не столько результатом микробной атаки макроорганизма, сколько следствием стрессобусловленных нарушений в иммунном звене гомеостаза, проходящих в своем развитии от состояния его избыточной активации («фаза гипервоспаления») к состоянию иммунодефицита («фаза иммунопаралича»). Летальность при сепсисе достигает значительных цифр и колеблется в широких пределах от 20 до 40% и прогрессивно нарастает при развитии септических осложнений, таких как полиорганная недостаточность (ПОН) и септический шок от 40 до 70% [196,2]. Причиной этого может быть тот факт, что применяемые лечебные мероприятия не решают реабилитационной задачи, т.е. восстановления имеющегося дефекта гомеостаза.

Ронколейкин (рекомбинантный ИЛ-2), синтезируемый на дрожжевой матрице, впервые появился в поле зрения клиницистов в 1995г., а сейчас уже широко применяется в сепсиологии для иммунокоррекции вторичного иммунодефицита (ВИД). В возникновении ВИД важную роль играет гиперпродукция эндогенных глюкокортикостероидов в результате действия предшествующих сепсису различных видов стресса: операционного, травматического, болевого и др. В опытах на животных показано, что *in vivo* ИЛ-2 вызывает активацию гипотиз-адреналовой системы [2]. Однако стрессогенное действие ИЛ-2 при его введении больным сепсисом клиницистами не учитывается, хотя это может быть важным как для выбора тактики иммунореабилитации, так и для оценки ее эффективности. Поскольку в медицинской литературе практически отсутствуют сведения о влиянии ИЛ-2 на уровень глюкокортикостероидов в крови больных сепсисом, прежде всего необходимо было восполнить существующий пробел.

Материалы и методы. Работа была проведена на базе септического центра Гродненской областной клинической больницы и Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси (Гродненский филиал). В работе использовали иммунологические, биохимические и клинические методы исследования. Диагноз сепсиса выставлялся по критериям принятым на Согласительной конференции Американского колледжа пульмонологии (АССР) и Общества медицины критических состояний (SCCM) в Чикаго в 1991 г. [1]. Тяжесть состояния оценивали по шкале SAPS (Simplified Acute Physiology Score) и системе APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) в баллах с дальнейшим определением % возможных неблагоприятных исходов.

Изучение иммунокорректирующего влияния ронколейкина (500 000 МЕ, в 1-3 приема через сутки) при сепсисе проводили на 12 больных (1 группа), еще 12 больным перед введением ронколейкина вводился комплекс витаминов группы В (2 группа – накануне и за 2 ч до каждой инфузии ронколейкина внутривенно вводили 2 мл 6% раствора витамина В₁, а через 1 ч последовательно 2 мл 5% раствора витамина В₆ и 2 мл 0,01% раствора витамина В₁₂). Контролем служили 12 больных, которым проводилась интенсивная комплексная терапия сепсиса без применения ронколейкина и витаминов (3-я группа)

Результаты исследования. Существующий опыт использования в онкологической клинике [3] дрожжевого рекомбинантного интерлейкина-2, показывает, что наряду с выраженной иммуностимуляцией многочасовое капельное введение ронколейкина часто вызывает у больных развитие лихорадочного состояния, которое может быть проявлением побочного стрессогенного действия препарата, снижающего эффективность иммунокорректирующего лечения.

Экзогенный ИЛ-2 проявляет себя как стрессор и при сепсисе. Об этом свидетельствует двукратное повышение в крови общих, белковосвязанных и свободных 11-оксикортикостероидов (11-ОКС), а также лимфопения наблюдающиеся сразу после завершения первой инфузии ронколейкина. Зеркальный характер сдвигов в системе «11-ОКС - лимфоциты» подчеркивает их взаимообусловленность, т.е. лимитирующую роль гормонов коры надпочечников в оформлении лимфопенической реакции. Исходя из того, что парадоксальный лимфопенический эффект ронколейкина является результатом 4-х часовой активации стероидогенеза под влиянием препарата можно заключить, что для усиления иммуномодулирующих эффектов цитокина необходимо нивелировать стрессогенную составляющую его действия. Неспецифический характер этих изменений подчеркивают антистрессорные витамины, которые в принятых условиях, т.е. при нагрузке септических больных ронколейкином действуют также как и при других видах стресса - достоверно снижают амплитуду стероидогенной реакции и одновременно нивелируют стрессорные сдвиги в системе крови.

Клинический анализ крови показал, что у больных сепсисом исходно наблюдаются такие же изменения, как и при стрессе: лейкоцитоз со сдвигом формулы влево и лимфопения. У больных 3, 1 и 2 групп до лечения (контроль) наличие 2-х, 3-х и 4-х клинических признаков SIRS (системный ответ на агрессию) было выявлено соответственно в 100, 69 и 33% случаев. Оценка исходного состояния пациентов по системе APACHE-II и шкале SAPS (стрессорный статус) показала, что в целом у всех больных до лечения средний балл в первом случае составил - 14, а во втором - 8,0, что позволяло прогнозировать вероятную летальность на уровне 25%. Факт повышения эффективности лечебного действия ронколейкина под влиянием В-витаминов документируется улучшением клинического состояния больных 2 группы, которое проявлялось 2-кратным снижением среднего балла по шкалам SAPS и APACHE-II, ослаблением степени тяжести эндотоксикоза в виде обрыва лихорадки, нормализацией гемодинамики, достоверного снижения лейкоцитоза, лейкоцитарного индекса интоксикации, увеличением относительного и абсолютного количества лимфоцитов, улучшением биохимических показателей крови. У больных 1

группы, получавших ронколейкин, клинический эффект обнаруживался заметно реже, тогда как у пациентов 3 группы (контроль) либо вообще не отмечалось существенной клинической динамики, либо она была отрицательной, хотя и в этом случае регистрировалось умеренное снижение среднего балла по обеим шкалам.

Цитокиноterapia на фоне В-витаминов характеризовалась выраженным иммунокорректирующим действием. При сочетанном применении стресслимитирующих витаминов и ронколейкина коррекция клеточного (сдвиги на уровне иммунокомпетентных клеток) и гуморального иммунитета (сдвиги на уровне иммуноглобулинов) была более выраженной.

Через сутки после первой инфузии ронколейкина общее количество Т-лимфоцитов (CD3) и Т-хелперов (CD4) по сравнению с исходным уровнем изменилось мало, а вот субпопуляция Т-супрессоров (CD8) сократилась почти на четверть. В результате структура кооперативных связей между элементами иммунореактивности в системе Т-клеточного иммунитета формально восстанавливается, однако это вряд ли можно рассматривать как признак иммунореабилитации. Оптимальное соотношение внутрипуловых субпопуляций, обеспечивающих эффективную реализацию специализированной функции иммунокомпетентных Т-клеток, отражает индекс (CD4/CD8), который в норме равен 1,2-1,8. У больных сепсисом исходное снижение индекса (CD4)/(CD8) до 0,8 определяется не только избытком Т-супрессоров, но и подавлением Т-хелперов. Иммунореабилитация ВИД, в принципе, предполагает общее увеличение всего пула Т-клеток, когда же ничего подобного не происходит, а имеет место снижение одной из его субфракций (CD8), то речь здесь может идти в первую очередь об иммуносупрессии, т.е. о стрессогенном влиянии ронколейкина.

Если ронколейкин применять вместе со стресслимитирующими витаминами, то на первый план выдвигается иммунопротекторная составляющая его действия. В этом случае через сутки после первой инфузии цитокина наблюдается существенный рост общего содержания Т-лимфоцитов в крови больных сепсисом (2 группа), главным образом за счет увеличения субпопуляции Т-хелперов и в меньшей степени Т-супрессоров. Нивелирование снижения уровня Т-супрессоров, отмеченное у больных получавших ронколейкин (1 группа), очевидно, может быть еще одним проявлением антистрессорного действия витаминов, поскольку известно, что именно эта субпопуляция лимфоидных клеток (CD8) отличается наибольшей чувствительностью к кортикостероидам. Таким образом, витамины фактически нормализуют нарушенное стрессом функционально важное соотношение CD4/CD8, которое у больных сепсисом после совместного применения витаминов группы В и ронколейкина достигает оптимального значения, что объективно отражает факт иммуномодуляции.

При тяжелом сепсисе (SAPS больше 20 баллов) наблюдается феномен «исчезающих глобулинов» - резкое снижение иммуноглобулинов класса IgA, IgM и особенно IgG, что является поводом для применения соответствующей заместительной терапии антителами. У наших больных при гораздо меньших значениях SAPS - 8 и APACHE - 14 (3 группа) все фракции иммуноглобулинов крови находятся на уровне нижней границы нормы. На следующий день после первой инфузии ронколейкина (1 группа) концентрация IgA, IgM и IgG заметно не изменялась. Введение ронколейкина на фоне действия антистрессорных витаминов (2 группа) в это же время достоверно повышало уровень IgG по сравнению с исходным.

Известно, что стрессорный всплеск стероидогенеза подавляет не только клеточный, но и гуморальный иммунитет, вызывая сбои в работе В-лимфоцитов, препятствующие их превращению в плазматические клетки, что, в конце концов, приводит к угнетению антителообразования. Следовательно, снижение уровня 11-ОКС у больных сепсисом (2 группа), обеспечиваемое антистрессорными витаминами, может быть необходимым условием для проявления иммуномодулирующего действия ронколейкина, которое

распространяется и на В-клетки, а через них и на продукцию IgG. Поскольку синтез IgG зависит от Т-хелперов, которые контролируются инсулином, увеличение этой фракции антител в крови больных сепсисом, получавших ронколейкин вместе с В-витаминами (2 группа), очевидно, можно замкнуть на механизм инсулинового опосредования действия основного компонента комплекса - витамина В₁, как в части ограничения амплитуды стероидогенной реакции, так и в части влияния на пролиферацию иммуноцитов, являющихся клетками-мишенями для данного гормона.

В последней связи важно отметить, что стресслимитирующее действие витаминов существенно повышает терапевтический эффект ронколейкина у больных сепсисом. Результат оценки формализованных показателей SAPS и APACHE II свидетельствует о заметно большем снижении тяжести состояния пациентов после сочетанного применения ронколейкина и антистрессорных витаминов, чем одного ронколейкина. Объективными критериями, подтверждающими этот факт служат также: уменьшение реальной летальности по сравнению с прогнозируемой, уменьшение сроков пребывания в палате интенсивной терапии, которые были всегда самыми значимыми в группе, где применялось сочетанное витаминно-цитокиновое лечение.

Заключение. Таким образом, применение В-витаминов при сепсисе оправдано с позиций патогенетической коррекции ВИД и усиления иммуномодулирующего действия ронколейкина. Стресслимитирующие витамины фактически обеспечивают эндогенную реактивацию иммунной системы в условиях гиперкортицизма и являются пусковым фактором последующей реинтеграции различных звеньев иммунитета под влиянием ронколейкина, что определяет целесообразность их совместного применения в комплексной терапии сепсиса.

Литература:

1. Bone R., Balk R., Cerra F. et al. American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innjvative therapies in sepsis // Crit. Care Med. 1992. V. 20. N 6. P. 864 – 874.
2. Захарова Л.А., Петров Р.В. Медиаторы нейроиммунного взаимодействия // Итоги науки и техники. Иммунология.1990. Т.25. С. 6-47.
3. Бутаков А.А., Щельцина Т.А., Патютко М.Ю. Сравнительная оценка иммуномодулирующей активности отечественных рекомбинантных цитокиновых препаратов: дрожжевого интерлейкина-2 человека (ронколейкина) и α_{26} -интерферона (реальдирон) // Иммунология. 1996. № 5. С. 41-43.

RONKOLEUKIN AND B-VITAMINS IN THE TREATMENT OF SEPSIS

¹Vinogradov S.V., ²Vinogradov V.V.

¹City Clinical Emergency Hospital, Grodno;

²State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus, E-mail: office@biochem.unibel.by

Stress-limiting vitamins allow for endogenous reactivation of the immune system under hypercorticoïdism and are the triggering factor of subsequent reintegration of different immunity units under the influence of ronkoleukin, which determines the expediency of their combined application in the comprehensive therapy of sepsis.

ЭКСТРАКТ ИНХИСТАРА (*PHALLUS INPUDICUS*) СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Воронов П.П., Макарович А.Ф., Макарович Е.А., Самойлик А.А., Буко В.У.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by

Сахарный диабет (СД) – заболевание, развивающееся вследствие относительной или абсолютной недостаточности инсулина, приводящей к нарушению утилизации углеводов, жирового и белкового обмена, проявляющееся хронической гипергликемией и поражением сосудов [1]. Среди эндокринной патологии СД занимает первое место по распространенности (более 50% от всех эндокринных заболеваний [2]) и в популяции достигает 2 – 5%, и в последние десятилетия этот показатель увеличивается [1]. По причинам смертности СД стоит на третьем месте после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний и в настоящее время его относят к социальным болезням [2]. Тысячи научно-исследовательских институтов в мире работают над проблемами поиска патогенетических путей и механизмов развития СД, разрабатывая новые эффективные препараты химического, животного и растительного происхождения. Одним из перспективных источников препаратов гипогликемического действия, по нашему мнению, могут являться базидиальные грибы, такие как рейши, шиитаке и др. Несмотря на огромный потенциал лекарственных грибов, в Беларуси промышленное производство как самих грибов, так и функциональных препаратов на их основе начинает только налаживаться.

Целью данной работы явилось исследование на крысах с аллоксановым диабетом (АД) гипогликемического эффекта [3] спиртового экстракта из плодовых тел базидиального гриба, известного в нашем регионе как веселка обыкновенная (*Phallus inopudicus*), срамник и др. В Польше его называют *sromotnik bezwstydney, pani Biatka*, в Северной и Южной Америке он известен как *terrible smell, dog's (or devil's)-penis, inhestar (IHS)*, в Японии – *stinkhorn*. По тем или иным причинам мы остановимся на рабочем названии Инхистар.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар весом 215 – 280 г. которые находились на обычном рационе вивария. АД моделировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана в дозе 170 мг/кг, однократно. Развитие СД регистрировали по клинической симптоматике (полиурия, жажда, полифагия, снижение веса) и уровню глюкозы в крови. В эксперимент отбирались животные с уровнем глюкозы более 16 ммоль/л. Забор крови и концентрацию глюкозы определяли тест-полосками GS 100 с помощью глюкометра Rightest GM 100 Bionime (Taiwan). В работе использовали экстракт из свежесобранных плодов **IHS** в 20% этаноле. Животные были разделены на 3 группы: 1-ой, не получавшей аллоксан (уровень глюкозы от 4,4 до 5,0 ммоль/л), вводили однократно интрагастрально экстракт **IHS**; 2-ой и 3-ей диабетическим группам (уровень глюкозы от 16,1 до 27,0 ммоль/л) однократно интрагастрально вводили 20% этанол и экстракт **IHS**, соответственно, из расчета 1,0 мл/100 г массы. Всем крысам до введения и через 1, 2 и 5 часов после введения препаратов измеряли уровень глюкозы в крови. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 4. Рост и убыль глюкозы в крови рассчитывали в процентах; за 100% (нулевая точка) брались показатели уровня глюкозы до введения раствора этанола и экстракта **IHS**.

Результаты исследования. Проведенные исследования показали достоверный прирост концентрации глюкозы в крови через 1, 2 и 5 часов у крыс 1, 2 и в первый час 3 группы животных (таблица). Очевидно, что данный эффект связан с воздействием этанола. У крыс 3 группы концентрация глюкозы в крови достоверно снижалась через 2 и 5 часов.

Таблица. Прирост и убыль концентрации глюкозы в крови

Время введения, час	1 группа (здоровые + IHS) n=10	2 группа (АД + 20% этанол) n=8	3 группа (АД + IHS) n=8
0	100	100	100
1	133,5±2,9 Δ	140,8±7,6 Δ	117,3±7,7 Δ
2	118,1±3,8 Δ	145,7±4,7 Δ	82,9±6,9 Δ▼
5	112,3±5,6 Δ	138,4±5,7 Δ	51,1±7,6 Δ▼

Δ - внутригрупповая достоверность роста глюкозы в крови крыс по отношению к нулевой точке ($p < 0,001$);

▼ - достоверная убыль ($p < 0,0001$) глюкозы в крови крыс 3-ей группы в сравнении со 2-ой группой крыс.

Для нивелирования эффектов этанола в метаболических путях глюкозы мы сравнивали диабетическую группу крыс (№ 3), получавшую экстракт **IHS** с диабетической (№ 2), получавшую раствор этанола. В 3 группе получен мощный гипогликемический эффект экстракта **IHS**. При этом у двух животных уровень глюкозы снижался до контрольных значений – с 26,4 до 3,5 ммоль/л и с 16,1 до 5,3 ммоль/л, соответственно.

Как видно из приведенных в таблице данных, у животных, получавших экстракт **IHS**, отмечается выраженное снижение концентрации глюкозы в крови. В то же время, у животных 1 группы (здоровые), получавших экстракт **IHS**, подобного эффекта не наблюдалось.

На наш взгляд, гипогликемическое действие экстракта **IHS** может быть опосредовано либо влиянием компонентов экстракта **IHS** на усиление транспорта глюкозы в гепатоциты, миоциты, адипоциты и другие типы клеток, либо транспорт/метаболизм глюкозы идет по совсем иному, инсулиннезависимому пути.

Заключение. Проведенное нами исследование экстракта **IHS** является первым шагом на пути для дальнейшего изучения его свойств и механизмов действия, и тем не менее, полученные эффекты показали, что экстракт **IHS** обладает мощным гипогликемическим действием и может рассматриваться в будущем в качестве перспективного препарата в практической медицине.

Литература:

1. Шабалов Н.П. Детские болезни: Учебник для вузов. 6-е изд. В двух томах. Т.2.- СПб.: Питер, 2009. – 928 с.: ил. – (Серия «Учебник для вузов»).
2. Потемкин В.В. Эндокринология. – М.: Медицина, 1986. – 432 с., ил.
3. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс: Пер. с англ.-М.: Мир, 1989.-656 с., ил.

INHESTAR'S EXTRACT (*PHALLUS IMPUDICUS*) REDUCES GLUCOSE LEVEL IN THE BLOOD OF ALLOXAN DIABETIC RATS

Voronov P.P., Makarchikov A.F., Makar E.A., Samojlik A.A., Buko V.U.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus,

E-mail: office@biochem.unibel.by

The influence of Inhestar extract on glucose level in blood of alloxan diabetic rats was studied. The extract has been shown to have an expressed reducing effect on the level of glucose.

ЛЕТУЧИЕ ВЕЩЕСТВА ЛИСТЬЕВ И КОРНЕЙ ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ В БЕЛАРУСЬ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ (*ECHINACEA PURPUREA* (L.) MOENCH)

¹Гетко Н.В., ²Субоч В.П., ¹Кручонок А.В., ¹Кабушева И.Н.

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, E-mail: Hetko@list.ru;

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию», 220037, г. Минск, ул. Козлова, 29, E-mail: SubochVP@mail.ru

Введение. Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) является представителем семейства Астровые (*Asteraceae*). Родина – восточная часть Сев. Америки. Широко культивируется в странах Евро-азиатского континента как ценное декоративное и лекарственное растение. В Беларуси интродукция представителей рода *Echinacea* L. была начата с 50 – 60 годов прошлого столетия и никогда не прекращалась: сначала с целью пополнения генофонда декоративных растений, а в последние десятилетия она связана с обогащением генофонда лекарственных растений, селекцией наиболее ценных в этом отношении форм *E. purpurea* [1]. Основной действующей субстанцией надземной части и корней видов рода *Echinacea* L., используемых в медицинских целях (*E. purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida*), является фенольный комплекс. В настоящее время с помощью современных методов экстракции и HPLC-анализа лекарственное сырье, получаемое на основе каждого из перечисленных видов, стандартизировано по уровню содержания в нем действующих веществ [2]. Трава *E. purpurea* стандартизирована по цикориевой кислоте, ее корни – по цикориевой и кафтаровой кислотам. Основной лекарственный компонент корней *E. pallida* и травы *E. angustifolia* – эхинакозид, а цинарин – действующее вещество корней *E. angustifolia*.

Сырье эхинацеи, все его структурные компоненты (листья, корни, стебель, соцветия), обладают характерным запахом, благодаря наличию разнообразных летучих веществ, которые могут вызывать аллергические реакции, свободно экстрагируются спиртом и остаются в лекарственных продуктах. Эти соединения, на наш взгляд, требуют внимательного изучения. В образцах эхинацеи, взятых из природной флоры (Британская Колумбия, Канада) и подвергнутых GC/MS-анализу, выявлено более 70 различных летучих субстанций [3]. Оказалось, что все ткани растений эхинацеи из природной флоры, независимо от вида, содержат ацетальдегид, диметилсульфид, гексанал и ароматические углеводороды, относящиеся к классу терпенов: камфен, β-пинен, лимонен. Климат в Британской Колумбии почти средиземноморский, со среднегодовой температурой 18 – 21 °С, с жарким, без дождей, летом и обильными осадками в зимний период.

В условиях умеренного климата в Беларуси качественный и количественный состав летучих веществ у растений эхинацеи может быть иным. Нами исследован состав летучих компонентов листьев и корней *E. purpurea*, культивируемой в ЦБС НАНБ. В анализ отбирали листья и корни цветущих растений в период заготовки лекарственного сырья (август).

Методика исследования. Исследования компонентного состава экстрактов осуществляли методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием с использованием системы Agilent Technologies 6850 Series II (Network GC System /5975B (VL MSD)). Разделение компонентов проводили на капиллярной колонке HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Условия хроматографического анализа: начальная температура колонки - 40°C (2 мин); нагревание колонки со скоростью 10°C/мин до температуры 240°C; выдержка 8 минут; температура инжектора - 250°C; температура детектора - 280°C; скорость потока газа-носителя (гелий) - 0,5 мл/мин. Пробоподготовку образца к газохроматографическому анализу выполняли с помощью твердофазного микроэкстрактора фирмы Supelco™ (каталожный № 57330-U).

Микроэкстрактор представляет собой шприц, внутри которого помещается волокно с адсорбентом. Для экстракции использовали волокно, покрытое фазой DVB/Carboxen/PDMS StableFlesh™ фирмы Supelco (каталожный № 57328-U). Пробу экстракта готовили внесением во флакон с 10 мл дистиллированной воды, добавляли 0,1 мл экстракта растения. Флакон с образцом помещали в термостат, нагретый до 40°C и выдерживали 15 минут для установления постоянной температуры. Затем через мембрану в паровоздушное пространство флакона вводили шприц твердофазного микроэкстрактора и выдвигали волокно с адсорбентом таким образом, чтобы оно не касалось поверхности жидкости и стенок сосуда. Шприц микроэкстрактора выдерживали во флаконе с открытым волокном 30 минут, затем волокно задвигали внутрь шприца и устройство извлекали из флакона.

Шприц твердофазного микроэкстрактора вводили через мембрану в систему ввода хроматомасс-спектрометра (нагретую до 250°C), выдвигали волокно с адсорбентом, выдерживали в системе ввода 5 минут до окончания десорбции компонентов, затем волокно вводили внутрь шприца и извлекали его из системы ввода. Регистрацию хроматограммы в режиме полного ионного тока начинали сразу после окончания десорбции и 2-минутной задержки для исключения из хроматограммы пиков легколетучих компонентов. После регистрации хроматограмма интегрировалась для определения времен удерживания и площадей пиков. Для каждого пика рассчитывалась относительная интенсивность пика (относительно суммы идентифицированных пиков). По времени удерживания выбирались точки на хроматограмме, по которым восстанавливались экспериментальные масс-спектры из файла данных хроматограммы. Экспериментальные масс-спектры, восстановленные таким образом для каждого пика хроматограммы, использовались для поиска и их сравнения со спектрами библиотеки масс-спектров и их структурных формул NIST05a.L. По совпадению спектров (в пределах 5-10%) осуществлялась идентификация соединений в паровоздушном пространстве анализируемой пробы, а по относительным площадям пиков хроматограммы оценивалось относительное содержание идентифицированных соединений.

Результаты исследований. Как показали полученные результаты, в листьях *E.purpurea* значительная доля летучих субстанций приходится на насыщенные углеводороды: гекса- декан (C₁₆H₃₄) – 21%, тридекан (C₁₃H₂₈) – 16,6%, и сесквитерпены (C₁₅H₂₄): кубибен – 30,1%, копаен – 6,58%, кадинен – 6,38%, кариофиллен – 2,4%. В корнях эхинацеи пурпурной также преобладают сесквитерпены, причем, более всего их приходится на долю бициклических сесквитерпенов (кадинены) – 55.0%, далее следует копаен – 23,45%, эпи- бициклосесквифелландрен – 11%, α-кариофиллен – 5,6%, и этиловый эфир октановой кислоты – 5,3%. Вместе с тем, характерных для растений природной флоры лимонена и пинена в образцах эхинацеи, культивируемой в Беларуси, нами не выявлено. Ацетальдегид и гексанал присутствуют в исследуемых растениях в минорных количествах. Сесквитерпен кубибен, как показали наши исследования (название от Cubeb – *Piper cubeba*, из состава эфирных масел которого он впервые выделен), является доминантным компонентом летучих субстанций листьев эхинацеи пурпурной. Он входит в состав эфирных масел более 50 видов тропических растений. Кадинен (соответственно название от Cade – можжевельник *Juniperus oxycedrus*) – доминантный компонент летучих субстанций корней эхинацеи. Ароматические летучие вещества являются присущими растениям тропиков и субтропиков субстанциями их эфирных масел в качестве адаптивных признаков в условиях высоких температур. Культивирование интродуцированных тропических видов в условиях умеренного климата может вносить определенные изменения в их компонентный состав, что и было показано.

Литература:

1. Hetka N.V., I.N., Kronivetz V.S., A.V. 2006. Selected forms within the cultivated heterogenous population of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) // Scripta Horti Botanici universitatis Vytauti Magni, Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidikla, T.XI: 71 – 75.

2. Perry N.B., Burgess E.J., Glennie V.A. 2001. *Echinacea* Standardization: Analytical Methods for Phenolic Compounds and Typical Levels in Medicinal Species// J. Agric. Food Chem., Vol. 49(4): 1702 – 1706.

3. Mazza G., Cottrell T. 1999. Volatile Components of Roots, Stems, Leaves, and Flowers of *Echinacea* Species // J. Agric. Food Chem., Vol. 47(8): 3081 – 3085.

VOLATILE COMPONENTS OF LEAVES AND ROOTS OF *ECHINACEA PURPUREA* (L.) MOENCH, WHICH IS CULTIVATED IN BELARUS

¹Hetka N., ²Subach V., ¹Kruchonak A., ¹Kabushava I.

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Surganov Str., 2B, Minsk; 220012, Belarus, E-mail: Hetko@list.ru; tel.: +375 172 96-63-16;

²Food Research and Engineering Center, National Academy of Sciences of Belarus, 29 Kozlov Str., 220037, Minsk, Belarus, E-mail: SubochVP@mail.ru; tel.: +375 80296941658.

The component composition of volatile substances of leaves and roots of the *Echinacea purpurea*, which is cultivated in Belarus, has been investigated. Results showed that dominant substances of echinacea leaves and roots were sesquiterpens cubiben and cadinene correspondently.

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПЕРТИРЕОЗА

Глинник С.В., Ринейская О.Н., Романовский И.В., Прокопчик К.Г.

Белорусский государственный медицинский университет, кафедра биоорганической химии, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, E-mail: runeiskaya@mail.ru

Заболевания щитовидной железы занимают одно из ведущих мест в структуре патологии эндокринной системы в мире. В Республике Беларусь серьезную проблему представляет гипотиреоз, что, вероятно, связано и с произошедшей аварией на Чернобыльской АЭС, и с недостаточным поступлением в организм йода и селена вследствие их дефицита в почве и питьевой воде. При нерациональной заместительной терапии гипотиреоза может возникать гипертиреоидное состояние, важнейшим патогенетическим звеном которого является нарушение окислительно-восстановительных процессов. Имеются противоречивые данные о вовлечении тиреоидных гормонов в процесс регуляции свободнорадикального окисления. Ряд авторов указывает на то, что данные метаболиты проявляют антиоксидантные свойства и обезвреживают свободные формы кислорода [1, 5]. Другие работы свидетельствуют об интенсификации процессов перекисного окисления липидов под воздействием тироксина и трийодтиронина [2, 4]. Наши исследования, посвященные разработке схемы коррекции экспериментального гипотиреоза левотироксином и комплексом аминокислот (селенометионин, метионин, серин) указывают на возможность использования данного комплекса для нормализации прооксидантно-антиоксидантного статуса [3].

Целью настоящей работы явилось изучение состояния процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантных систем мозга крыс в условиях экспериментального гипертиреоза и установления влияния на эти процессы эндогастрального введения комплекса аминокислот (селенометионин, метионин, серин).

Материалы и методы исследования. Работа была выполнена на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях освещения и пищевого режима вивария БГМУ. В опыте были использованы следующие препараты: левотироксин натрия (L-тироксин), в таблетках по 25 мкг; селенометионин (30 мкг/кг), в составе селеносодержащего

органического препарата (1 г препарата содержал 1 мг Se-аминокислот: 50% Se-метионина и 25% Se-цистеина); аминокислоты метионин и серин: метионин – 25 мкг/кг, серин – 16 мкг/кг.

Животные были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой):

1 группа – эутиреоидные крысы, получавшие на протяжении 2-х недель эндогастрально обычную воду и на 14-е сутки снятые с эксперимента (контроль);

2 группа – крысы с экспериментальным гипертиреозом (ЭГ), который создавался путем эндогастрального введения крысам L-тироксина в дозе 50 мкг/кг в течение 14 суток;

3 группа – крысы, получавшие эндогастрально на протяжении 2-х недель комплекс аминокислот (селенометионин-30 мкг/кг, метионин-25 мкг/кг, серин-16 мкг/кг);

4 группа – крысы с ЭГ, ежедневно получавшие левотироксин с комплексом аминокислот в вышеуказанных дозах.

Животные снимались с эксперимента под тиопенталовым наркозом (60-80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. Определение содержания в сыворотке крови крыс тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) производилось радиоиммунологическим методом с использованием набора реактивов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма экспериментальных животных оценивалось по изменению уровней диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и активности таких ферментов антиоксидантной защиты как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионредуктаза (ГР) в мозге крыс с помощью общепринятых методик. Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью пакетов программ «Microsoft Excel 2000» и «Statistica 6.0». Для оценки достоверности различий между группами использовали тест Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты. Экспериментальный гипертиреоз у животных 2-й и 4-й групп подтверждался значительным достоверным повышением уровней T_3 и T_4 в сыворотке крови относительно контрольной группы животных.

В мозге животных с экспериментальным гипертиреозом наблюдалось достоверное снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем свидетельствует падение уровней МДА и ДК по отношению к группе контрольных животных на 34,3% и 30,3% соответственно.

Со стороны изученных антиоксидантных ферментов отмечалось достоверное повышение активности ГР на 20,6 % и снижение активности СОД на 11,4% относительно группы «контроль».

У животных получавших комплекс аминокислот (селенометионин-30 мкг/кг, метионин-25 мкг/кг, серин-16 мкг/кг) наблюдалось достоверное увеличение активности ГР на 83% и каталазы на 18,4% что, возможно, объясняет отсутствие достоверных изменений интенсивности процессов ПОЛ в мозге.

Дополнительное введение животным с экспериментальным гипертиреозом комплекса аминокислот сопровождалось незначительным подъемом уровней МДА и ДК в мозге (12,3% и 2,5% соответственно), что обусловило достоверное увеличение активности каталазы на 83,2% и ГР на 60% по сравнению с контрольной группой животных. Однако, по сравнению с группой «гипертиреоз», наблюдалась более интенсивная активация процессов ПОЛ (уровень МДА возрос на 70,9%, ДК – на 47%) и достоверное увеличение активности изученных ферментов антиоксидантной защиты.

Выводы:

1. Экспериментальный гипертиреоз сопровождается активацией глутатионредуктазы в мозге крыс, снижением активности супероксиддисмутазы и уменьшением накопления продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов);

2. Введение аминокислотного комплекса (селенометионин, метионин, серин) эутиреоидным животным вызывает повышение активности в мозге глутатионредуктазы и каталазы, что, возможно, обуславливает отсутствие достоверных изменений интенсивности процессов липопероксидации;

3. Введение комплекса аминокислот гипертиреозидным животным сопровождается интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (по уровню малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) на фоне значительного повышения активности каталазы и глутатионредуктазы в мозге экспериментальных животных.

Литература:

1. Антиоксидантная активность белков острой фазы у детей в зависимости от йодной обеспеченности / С.А. Ляликов [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3. – № 4. – С. 36–41.

2. Макеева Т.И. Тиреотоксикоз как фактор риска развития гипертонической болезни // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. – 2001. – № 5. – С. 17–19.

3. Применение L-тироксина и комплекса аминокислот для коррекции гипотиреозидного состояния у экспериментальных животных / С.В. Глинник, О.Н. Ринейская // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века: материалы 8-й междунар. науч. конф., Минск, 22–23 мая 2008 г. / МГЭУ им. А.Д. Сахарова; под ред. С.П. Кундаса. – Минск, 2008. – С. 125.

4. Ткаченко О.Р. Изменения перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности при гипо- и гиперфункции щитовидной железы // Автореферат диссертации на соискание научной степени кандидата биологических наук. – Львов. – 1994. – 34 с.

5. Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H. ed. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press. – 1991. – P.213–243.

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS OF THE RAT BRAIN UNDER EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM

S.V. Hlinnik, O.N. Ryneiskaya, I.V. Romanovsky, K.R. Prakopchyk
Belarusian State Medical University, bioorganic chemistry department

Lipid peroxidation state processes, antioxidant status of rats and amino acid complex addition (Se-methionine, methionine, serine) effect are investigated under experimental hyperthyroidism. It was observed that experimental hyperthyroidism is attended with glutathione reductase activation in the rat brain, decreasing of superoxide dismutase activity and lipid peroxidation product accumulation. Amino acid complex (Se-methionine, methionine, serine) addition is attended with intensification of lipid peroxidation state processes (due to the malonic dialdehyde and dienic conjugates levels) and increasing of catalase and glutathione reductase activity levels in the experimental rat brain.

НАТРИЕВАЯ СОЛЬ СУЛЬФАТА АЦЕТАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ – ПОЛИМЕР МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТАБЛЕТОК И МАЗЕЙ

Гриншпан Д.Д., Савицкая Т.А., Цыганкова Н.Г., Невар Т.Н., Макаревич С.Е.
*Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,
г. Минск, ул. Ленинградская, 14, E-mail: grinshpan@bsu.by*

В НИИ ФХП БГУ синтезирован сложный смешанный эфир целлюлозы – сульфат ацетат целлюлозы в форме натриевой соли (Na-САЦ), имеющий полиэлектролитную природу и проявляющий мезоморфизм в концентрированных растворах.

Высокая растворимость Na-САЦ в воде (более 50 %), способность к формированию ЖК структур в концентрированных растворах позволили рекомендовать этот полимер в качестве нового вспомогательного вещества-модификатора при производстве готовых лекарственных форм.

С целью оценки безопасности практического использования были проведены доклинические токсикологические исследования Na-САЦ ГП «Диалек». Установлено, что препарат характеризуется чрезвычайно низкой токсичностью (ЛД₅₀ определить не удалось) и является безвредным для организма животных. Он не обладает мутагенным, кожно-раздражающим, кожно-резорбтивным и аллергенным действием и поэтому не имеет ограничений для применения в качестве фармацевтического компонента в составе лекарственных препаратов [1].

В результате проведенных научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ разработан опытно-промышленный технологический регламент производства Na-САЦ на РУП СПО «Химволокно» (г. Светлогорск), изготовлена опытно-промышленная установка мощностью 500 кг/год и проведены ее испытания под технологической нагрузкой. В настоящее время установка позволяет проводить наработку Na-САЦ в промышленных условиях.

Новые быстродиспергируемые угольные таблетки

Модификация активированного угля (АУ) сульфатом ацетатом целлюлозы, которая реализуется за счет физической адсорбции макромолекул этого высокогидрофильного полимера на поверхности частиц, придает АУ уникальные свойства: способность самопроизвольно и быстро диспергироваться в воде с образованием устойчивых суспензий с узким распределением частиц по размерам и высоким содержанием коллоидной фракции. Суспензии модифицированного угля обладают высокой текучестью, минимальным структурообразованием, значительной удельной поверхностью и адсорбционной активностью по отношению к веществам различной природы. Такие коллоидно-химические характеристики угольных суспензий позволяют рекомендовать Na-САЦ для получения быстродиспергируемых твердых лекарственных форм АУ.

Таблетки «Углесорб». Таблетки удобны в применении и в отличие от порошкообразных форм АУ типа «Белосорб» не вызывают першения в горле, отрыжки, рвоты и т. д. Вследствие высокой эффективности, курс лечения резко сокращается, а по сравнению с обычным активированным углем принимаемая доза уменьшается в десятки раз. Чрезвычайно высокая эффективность использования нового энтеросорбента при лечении аллергических заболеваний, при коррекции постлучевых повреждений у больных со злокачественными новообразованиями в грудной клетке и в случае назоинтестинальной интубации в послеоперационных лечених перитонита [2,3].

Таблетки с ацетилсалициловой кислотой. Быстрораспадающиеся таблетки с ацетилсалициловой кислотой (АСК), условно названные «Черный аспирин», в композиции с витамином С отличаются от промышленно выпускаемых быстро растворимых аналогов тем, что не содержат балластных наполнителей (лимонную кислоту и гидрокарбонат натрия). В отличие от обычных таблеток АСК экспериментальные быстро и самопроизвольно диспергируются при контакте с жидкой средой с образованием высокодисперсной суспензии, в которой кристаллы АСК имеют округлую, а не игольчатую форму и окружены коллоидными частицами угля, что мешает непосредственному контакту АСК со слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки. Для новых таблеток характерно одновременное сочетание быстрого действия и пролонгации действия: скорость высвобождения

ацетилсалициловой кислоты примерно в 2,5 раза выше, а время нахождения в крови в 3 раза больше, чем у белых таблеток «Aspirin» производства фирмы «Bayer AG».

Таблетки с карбонатами кальция и магния. Комбинированные таблетки, в состав которых кроме угля входят карбонаты кальция и магния, условно названные «Черный антацид» обладают высокой кислотонейтрализующей способностью. Для этих таблеток характерна также более высокая, чем у известного препарата «Ренни», скорость нейтрализации, что связано с присутствием Na-САЦ, способствующей быстрому самопроизвольному диспергированию препарата и повышению доступности нейтрализующих веществ [4].

Высокогидрофильные мази, содержащие натриевую соль сульфата ацетата целлюлозы

Современные потребности медицины в мазевых препаратах не могут быть удовлетворены только за счёт синтеза новых лекарственных субстанций. В настоящее время значительно более высокими темпами развивается такое направление фармацевтической промышленности, как придание известным лекарственным субстанциям дополнительных фармакологических и фармакокинетических свойств с помощью новых вспомогательных веществ. В этом направлении проведены исследования по использованию полиэлектролитного производного целлюлозы Na-САЦ для получения новых высокогидрофильных мазей. Гидрофильные мази отличаются от гидрофобных малой структурной прочностью, способностью к тиксотропному разжижению при механическом воздействии, хорошо абсорбируются кожей, быстро отдают ей лекарственные вещества и, что особенно важно, комфортны в применении. К сожалению, ассортимент гидрофильных мазей выпускаемых фармацевтической промышленностью РБ очень ограничен, главным образом, из-за отсутствия собственной сырьевой базы. Поэтому Na-САЦ весьма перспективен для использования в качестве основы гидрофильных мазей вследствие его высокой растворимости в воде (более 50 %) и в водно-глицериновых растворах (более 30 %) при оптимальной молекулярной массе 30000–50000.

Выполненные к настоящему времени исследования позволили совместить в растворе Na-САЦ с различными водорастворимыми субстанциями: линкомицином, гентамицином, бензилпенициллином, диклофенаком и др., с низкомолекулярными гомологами полиэтиленоксида, с высокомолекулярными соединениями: хитозаном, с метилцеллюлозой, карбоксиметилцеллюлозой, гидроксиэтилцеллюлозой и полиакриловой кислотой. Выяснилось, что Na-САЦ способна вступать в реакции взаимодействия, в частности, комплексообразования с антибиотиками аминогликозидного ряда, хитозаном образуя соединения, характеризующиеся иными, чем исходные вещества, свойствами. Например, Na-САЦ при определенных соотношениях полимер: гентамицина сульфат образует как водорастворимый, так и нерастворимый комплекс с действующим веществом, а с хитозаном – интерполиэлектролитный комплекс.

Реологическим методом исследованы структурно-механические характеристики экспериментальных образцов гидрофильных мазей гентамицина сульфата, линкомицина гидрохлорида, преднизолон, оксида цинка и их промышленных аналогов. Показано, что мази, полученные с использованием Na-САЦ обладают пределом текучести при сдвиговом деформировании и полностью соответствуют реологического оптимуму консистентных свойств гидрофильных мазей [5].

Определение осмотической активности экспериментальных мазей и мазевых основ, используемых в технологии получения мягких лекарственных форм в качестве гидрофильных, показало, что коэффициент осмотической активности существенно возрастает при наличии в составе мази высокогидрофильного полимера – сульфата ацетата целлюлозы. Это, в свою очередь, позволит повысить проницаемость лекарственных веществ, наносимых на кожу в виде мазей, содержащих Na-САЦ, а также даст возможность создания

на основах подобного типа мазей, обладающих повышенными адсорбционными свойствами, необходимыми для поглощения раневых выделений в случае лечения гнойно-воспалительных заболеваний кожи.

В опытах *in vitro* нами проведена сравнительная оценка релиза диклофенака из экспериментального образца мази и мазей на гидрофильной, гидрофильно-липофильной и липосомальной основах различных промышленных производителей. Показано, что 100%-ное высвобождение действующего вещества с наибольшей скоростью происходит из геля диклофенака, приготовленной по рецептуре НИИ ФХП БГУ с включением в состав гелевой композиции водорастворимого производного целлюлозы – Na-САЦ.

Помимо мазей типа раствора на основе Na-САЦ приготовлены и суспензионные мази, содержащие, наряду с антибиотиками аминогликозидного ряда, оксид цинка, активированный уголь и преднизолона ацетат. С помощью микроскопического дисперсионного анализа показано, что степень дисперсности нерастворимых в воде лекарственных субстанций при использовании САЦ повышается в 2-15 раз. Это приводит к значительно более высокой однородности их распределения в объеме мази и сохранению агрегативной устойчивости суспензионной мази в течение не менее 2-х лет.

Проведены клинические испытания препарата «Гель преднизолона 0,5 %», полученного на новой гидрофильной основе. Установлено, что экспериментальная мазь не обладает токсичностью, кожно-раздражающим и аллергизирующим действием. Отмечены высокая лечебная эффективность и комфортность ее использования при лечении дематита, экземы, псориаза и ее преимущества по сравнению с традиционными мазями, выпускаемыми фармацевтической промышленностью на гидрофильной, и комбинированной гидрофильно-липофильной основах.

В настоящее время определены наиболее оптимальные составы гидрофильных мазевых основ, содержащие Na-САЦ, способы их совмещения с лекарственными субстанциями и предложены мазевые композиции для использования как по традиционному назначению, так и для создания мазей с пролонгированным действием.

Литература:

1. Натриевая соль сульфата целлюлозы ВФС РБ 0490-2000. Угольные таблетки «Углесорб» ВФС РБ 0491-2000. «Гель преднизолона 0,5%» ВФС РБ 0535-2001.
2. Невар Т.Н., Савицкая Т.А., Осипова А.В., Макаревич С.Е., Цыганкова Н.Г., Гриншпан Д.Д. Влияние коллоидно-химических свойств активированных углей на эффективность их применения в медицине // Хим.-фарм.ж. – 2007. – №4. – С. 134-138.
3. Коротков С.В., Руммо О.О., Кирковский В.В., Третьяк С.И., Юрин В.И., Гриншпан Д.Д. Оценка эффективности методики коррекции морфофункционального статуса тонкой кишки при острой кишечной непроходимости различного генеза с помощью тест-объекта *Nitella flexilis* // Медицинский ж. – 2006. – №1. – С. 55-57.
4. Капралов Н.В., Шоломицкая И.А., Гриншпан Д.Д., Невар Т.Н., Савицкая Т.А. Исследование кислотнонейтрализующей эффективности антацидных препаратов // Гастроэнтерология – 2008. – №3. – С.44-48.
5. Гриншпан Д.Д., Цыганкова Н.Г., Савицкая Т.А. реологические свойства мазевых композиций на основе водорастворимых полимеров и гентамицина сульфата // XXIV симпозиум по реологии: тез. докл., г. карачарово, 3-7 июня 2008 г. – С. 44.

SODIUM SALT OF CELLULOSE SULFATE ACETATE – POLYMER FOR MULTIFUNCTIONAL USAGE IN TABLETS AND LINIMENTS PRODUCTION TECHNOLOGY

Grinshpan D.D., Savitskaya T.A., Tsygankova N.G., Makarevich S.E., Nevar T.N.

Cellulose mixed ester – cellulose sulfate acetate (CAS) in the form of sodium salt has been synthesized. It demonstrates polyelectrolyte nature and metamorphism in the concentrated solutions. It can be applied as a new auxiliary substance for medicinal form production because of the high solubility and ability to form liquid crystalline structures in the concentrated solutions. The pilot plant with 500 kg/year has been created at the Svetlogorsk “Khimvolokno”.

Owing to the physical adsorption of polymer macromolecules on the carbon particles surface, modification of activated carbon with CAS confers a unique combination of properties to it, like an ability to disperse in water spontaneously and quickly, forming stable suspensions with narrow particles size distribution and with high content of micro- and submicroparticles. The suspensions of the modified carbon have high fluidity, Newtonian character of the flow and hence the minimal structure formation in wide concentration range, significant specific surface and adsorption activity towards substances of different origin. The stabilizing effect of CAS is due to its high affinity to water and hence high hydrophilization of carbon particles. In this case, along with the structural-mechanical factor, the electrostatic factor of aggregation stability can also play a specific role. These colloid-chemical characteristics of the carbon suspensions allowed to recommend sodium salt of CAS as a binder for obtaining both quickly-soluble solid medicinal forms of different drug substances and hydrophilic liniments. Different quickly disintegrated carbon tablets has been developed: “Uglesorb” on the basis of activated carbon, tablets of activated carbon in the combination with acetylsalicylic acid and vitamin C, antacid preparations on the basis of activated carbon and carbonates of sodium and magnesium. Hydrophilic liniments of antibiotics, prednisolon and activated carbon have been produced and tested.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ D-ПАНТЕНОЛА В МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

¹Гуринович В.А., ¹Катковская И.Н., ¹Омельянчик С.Н., ²Бадун Г.А., ¹Мойсеёнок А.Г.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: val@biochem.unibel.by;

²Московский государственный Университет им. М. Ломоносова, Россия

Пантенол (ПЛ) - спиртовое производное пантотеновой кислоты как биологически активная и фармацевтическая субстанция обладает уникальными свойствами, связанными с его водо- и липидорастворимостью, фармакокинетикой, взаимодействием с клеточными структурами, что обусловило его широкое использование в различных областях медицины, в частности, в дерматологии и офтальмологии как препарата, улучшающего регенерацию тканей, влияющего на метаболические процессы, эффективно модулирующего уровень коферментной формы данного витамина – кофермента А (КоА).

Расширение области применения пантенола связано с его биотрансформацией в предшественники кофермента А и ацил-КоА, активирующими процессы детоксикации и антиоксидантную систему организма и обуславливающие мембранотропные и нейротропные эффекты [1].

В экспериментальном исследовании на животных при синдроме отмены этанола получен корригирующий эффект пантенола на изменение уровня нейроактивных аминокислот в головном мозге. Курсовое введение ПЛ (150 мг/кг) достоверно

нормализовало уровень КоА-SH в печени крыс при моделировании алкогольного абстинентного синдрома [2]. Применение препарата пантенола у больных хроническим алкоголизмом совместно с общепринятой дезинтоксикационной терапией привело к нормализации КоА-зависимых реакций детоксикации, показателей антиоксидантной защиты, ускорению редукции симптомов абстиненции [1,2].

В НПО "Витамины" был реализован синтез пантенола и на его основе разработаны две лекарственные формы - 10% и 25% растворы для инъекций в ампулах по 2 мл. Доклиническое изучение препаратов ПЛ проводилось совместно с Институтом биохимии НАН Беларуси. По активности и по качественным показателям ПЛ, разработанный в НПО "Витамины", не уступал пантенолу фирмы Йенафарм (25% раствор в ампулах по 2 мл). Препарат получил название пантевитол и был использован для клинических испытаний в качестве средства для лечения острой алкогольной интоксикации, абстинентного синдрома, для лечения металкольных психозов, а также в качестве средства, влияющего на моторную функцию желудочно-кишечного тракта. Фармкомитет МЗ РФ разрешил медицинское применение инъекционных форм пантевитола в качестве метаболического средства лечения абстинентного синдрома и острой алкогольной интоксикации [3]. Инъекционная форма пантенола (Йенафарм) впервые была применена в клинике нервных и нейрохирургических болезней БГМУ для снижения послеоперационных неврологических нарушений при оперативном лечении артериальных аневризм головного мозга [4]. Исходя из вышеуказанных нейропротекторных свойств D-пантенола представляло несомненный интерес изучение его фармакокинетических свойств, в частности, особенностей его транспорта в ЦНС.

Фармакокинетические исследования с [¹⁴C]-ПЛ, выполненные в нашей лаборатории Б.Ф. Дорофеевым, показали, что препарат очень быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте ($t_{max} = 3,2$ мин), хорошо захватывается тканями организма, в том числе быстро проникает через гемато-энцефалический барьер. Биодоступность препарата достаточно высока и достигает от 72 до 94,5%. В то же время ПЛ является чрезвычайно малотоксичным соединением. Величина LD₅₀ при в/бр. введении равна $13,8 \pm 1,4$, при в/в - $10,5 \pm 0,7$ и при п/к и оральном введении соответственно $>18,0$ и $20,0$ г/кг [1].

Процессу поступления пантотеновой кислоты в нейроструктуры и ее фосфорилирования в пантотенаткиназной реакции (ключевой в системе биосинтеза CoA) уделяется большое внимание, как возможному патогенетическому фактору возникновения нейродегенеративных расстройств [5]. Однако представляет особый интерес биотрансформация ПЛ в 4'-фосфопантотеновую кислоту, которая образуется преимущественно в печени и транспортируется кровью в места биосинтеза КоА, но может иметь самостоятельные функции, связанные с нейропротекцией [6]. В связи с вышеизложенным нами были проведены исследования процессов метаболического превращения меченого [³H]-ПЛ в тканях крыс [7]. Использовали препарат [³H]-ПЛ с удельной активностью 0,45 Ки/моль, полученный Бадунем Г.А и сотрудниками методом термической активации трития на кафедре радиохимии МГУ им. М. Ломоносова.

Изучение распределения меченых соединений в плазме крови и структурах головного мозга подтвердило высокую биодоступность пантенола, выявило высокий уровень его поступления в мозг. Впервые была показана интенсивная биотрансформация пантенола в структуры ЦНС – гиппокамп, большие полушария, передний мозг, ствол мозга и мозжечок. При этом максимум накопления радионуклида к 180 - 360 мин эксперимента отмечен в гиппокампе, наиболее высокий уровень 4'-фосфопантотеновой кислоты выявлен в коре больших полушарий и гиппокампе. Особенностью дальнейшего превращения этого соединения в мозге является снижение степени внедрения метаболитов в кофермент А по сравнению с таковым процессом в ткани печени. Полученные результаты позволяют обосновать положение, что нейроструктуры наряду с коферментной формой (кофермент А)

аккумулируют продукт пантотенаткиназной реакции, которая может принимать участие в процессах нейропротекции.

Нами проведено исследование накопления метаболитов пантенола в субклеточных фракциях больших полушарий нормальных животных, для чего в сахарозной среде выделяли постмитохондриальный супернатант и синаптосомально-митохондриальную фракцию. Установлено, что основная масса радионуклида метаболизировалась в цитозоле, при этом в обеих исследованных фракциях выявлены значительные количества (до 70%) радионуклидов в виде фосфопантотеновой и пантотеновой кислот. Таким образом, наиболее важным итогом вышеприведенных экспериментов является экспериментальное доказательство высокой биодоступности D-пантенола в ЦНС, наличие высокоэффективной системы транспорта D-пантенола через гематоэнцефалический барьер и способность провитамина аккумулироваться и трансформироваться преимущественно до фосфопантотената и, в меньшей мере, КоА в нейроструктурах головного мозга.

Полученные данные позволяют предполагать, что 4'-фосфопантотеновая кислота, накапливающаяся в нейроструктурах при иницировании биосинтеза КоА в значительных количествах, особенно в случае назначения D-пантенола, несет особые функции, обеспечивающие стабильность нейромембран в условиях окислительного стресса. Высказываются мнения, что такими функциями могут быть мобилизация избытка L-цистеина (образование 4'-фосфо-пантотеноилцистеина) или комплексообразование с двухвалентным железом (блокада реакции Фентона) [5].

Понимание механизмов, определяющих устойчивость ткани мозга к нейродегенерации, будет способствовать выявлению наиболее значимых элементов защиты клеток мозга от повреждений и обоснованию новых подходов к применению средств метаболической терапии с целью предотвращения явлений нейродегенерации при детальном применении препаратов, направленных на стабилизацию системы КоА – ацил-КоА, энергетики митохондрий и их редокс-статуса. Новый способ стабилизации метаболизма в мозге представляется особо актуальным, т.к. нейродегенеративные заболевания встречаются в последние годы все более часто, являются причиной высокой смертности и потери трудоспособности населения и требуют длительных курсов поддерживающей терапии.

Литература:

1. Пантенол и другие производные пантотеновой кислоты: биохимия, фармакология и медицинское применение. Мойсеенок А.Г. (ред.). Матер. междунар. симпозиума. Гродно. 1998. – 232 с.
2. Биохимия, фармакология и клиническое применение производных пантотеновой кислоты. Мойсеенок А.Г. (ред.). Матер. междунар. симпозиума. Гродно. 2003. – 187 с.
3. Сосин И.К. Клинико-диагностические критерии и оказание медицинской помощи при алкогольном опьянении // Медицина неотложных состояний. – 2006. №5(6). – С. 28-35.
4. Способ профилактики и лечения постишемического синдрома головного мозга при хирургическом лечении артериальных аневризм головного мозга: пат. 7743 Респ. Беларусь, А61К 31/164 / А.А. Скороход, Ф.В. Олешкевич, А.С. Федулов, А.Г. Мойсеенок. 2005.
5. Gregory A., Hayflick S. Neurodegeneration with brain iron accumulation // Folia Neuropathol. – 2005. – 43. – P. 286-296.
6. Шевалье А.А. Стабилизация фосфопаном антиоксидантной системы и функционального состояния нейромембран в субклеточных структурах головного мозга крыс при его нейротоксическом поражении // Здоровье и окружающая среда. – 2007. – С. 996-1005.
7. Гуринович В.А., Евкович И.Н., Омеляничик С.Н. и др. Распределение и биотрансформация [³H]-D-пантенола в отделах головного мозга в норме и при

D-PANTHENOL BIOTRANSFORMATION IN NEUROPROTECTION MECHANISMS

¹Gurinovich V.A., ¹Katkovskaya I.N., ¹Omelyanchik S.N., ²Badun G.A., ¹Moiseenok A.G.

¹*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus;*

²*M.Lomonosov State University, Moscow, Russia*

The possibility of application of D-panthenol as a metabolic preparation is discussed due to its high bioavailability in the CNS and effective biotransformation to 4'-phosphopantothenic acid. The results obtained enable us to substantiate a concept that neurostructures, along with the coenzyme form (coenzyme A), accumulate the product of the pantothenate kinase reaction which can participate in neuroprotection. A real mechanism of neuromembrane stabilization is the ability of phosphopantothenate to prevent activation of lipid peroxidation.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА, НОРМАЛИЗУЮЩЕГО РАБОТУ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Демид Д.И., Губина Л.П., Залашко Л.М., Романовский Д.И., Петров П.Т.

ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларусі», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: ifb@academpharm.by

Для лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта, связанных с нарушениями стула, применяют широкий спектр терапевтических средств, в том числе используют слабительные препараты. В настоящее время фармацевтические предприятия Беларуси не производят современных слабительных средств.

Химико-фармацевтическим центром Института фармакологии и биохимии НАН РБ разработано новое оригинальное высокоэффективное слабительное средство осмотического действия, оказывающего нормализующее действие на биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта благодаря комбинации, содержащихся в ней биологически активных веществ: альгината натрия и полиэтиленоксида в сочетании с солями калия и магния.

Альгинат натрия – соль альгиновой кислоты, природный полимер, полисахарид. Способствует нормализации микробного биоценоза кишечника. Не изменяет водно-солевой баланс, не претерпевает метаболических превращений в организме и выводится из него в течение 24 – 48 часов, способствует росту нормальной микрофлоры, подавляет деятельность патогенной микрофлоры. Рекомендуется для борьбы с дисбиозом кишечника, для нормализации микрофлоры после перенесенных кишечных инфекций, при приеме лекарств

(особенно антибиотиков), не токсичен, не обладает алергизирующим, эмбриотоксическим и мутагенным действием, может использоваться в профилактических целях в течение длительного времени [1].

Высокомолекулярный полимер этиленгликоля - полиэтиленоксид (ПЭО) представляет собой линейный полимер, который с помощью водородных связей способен удерживать молекулы воды, увеличивая после приема внутрь объем кишечного содержимого, способствуя восстановлению перистальтики. Вследствие высокой молекулярной массы полиэтиленоксид не адсорбируется из желудочно-кишечного тракта и не подвергается метаболизму [2,3].

Цель настоящего исследования - разработка новой эффективной и воспроизводимой методики количественного содержания альгината натрия и полиэтиленоксида в разработанном препарате. С учетом физико-химических свойств компонентов препарата для аналитического контроля был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который позволяет оценить количественное содержание действующих веществ с высокой точностью, приемлемой правильностью и воспроизводимостью. [4,5].

Материалы и методы. Разделение исследуемых веществ проводили на жидкостном хроматографе HPLC System Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором.

Эффективное разделение компонентов было достигнуто при использовании хроматографической колонки для эксклюзионной хроматографии PL aquagel OH 30 (7,5×300 mm; 8µm). Экспериментально была подобрана подвижная фаза, включающая соли: натрия хлорид, калия хлорид, натрия цитрат - класса чистоты «для ВЭЖХ», и сверхчистую воду с удельным сопротивлением 18,2 Мом/см, полученную на установке «*Milli - Q*» (*Millipore*, США). Оптимальные концентрации солей были подобраны экспериментально. Скорость подвижной фазы 1мл/мин, температура колонки 30 °С, температура рефрактометрического детектора 35 °С, объем инжестируемых проб – 50 мкл. Время анализа составляет 10 мин

В качестве стандартов определяемых веществ использовали субстанции, соответствующие требованиям нормативной документации. Результаты оценивали по временам удерживания и форме хроматографических пиков определяемых веществ.

Оценку количественного содержания исследуемых веществ проводили по методу внешнего стандарта, как наиболее оптимальному для хроматографического анализа смесей лекарственных веществ. При этом наблюдается линейная зависимость между высотой хроматографического пика и концентрацией определяемого вещества в анализируемом растворе в интервале определяемых концентраций.

Для приготовления стандартного раствора точные навески альгината натрия и полиэтиленоксида растворяли в подвижной фазе.

При приготовлении испытуемого раствора для полной экстракции альгината натрия и полиэтиленоксида из препарата в качестве растворителя экспериментально была подобрана вода. Пробоподготовку проводили с дополнительными стадиями разбавления.

Все растворы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Результаты: По предлагаемой методике были проанализированы ряд модельных растворов, а также опытные образцы препарата. Время анализа составляет 20 мин.

Хроматограмма стандартного раствора, содержащего альгинат натрия и полиэтиленоксид, характеризовалась временами удерживания 5,0 и 7,2 мин, соответственно.

Подобранные хроматографические условия удовлетворяют требованиям пригодности и обеспечивают надежность анализа в предлагаемых условиях. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику альгината натрия составляет не менее 1000 теоретических тарелок, по пику ПЭО – не менее 3800 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии для пика альгината натрия составляет 1,2, для ПЭО– 1,0, относительное стандартное отклонение высоты пиков составляет 0,4-0,6 % соответственно, степень разделения пиков - 3,8.

Заключение: разработана методика ВЭЖХ, позволяющая быстро и с достаточной точностью определять количественное содержание альгината натрия и полиэтиленоксида в комбинированном препарате, нормализующем работу желудочно-кишечного тракта.

Установлена высокая эффективность разработанной методики при количественном определении. Разработанная методика включена в нормативную документацию на разрабатываемый препарат для определения показателя «Количественное определение».

Литература:

1. Добродеева Л.К., Белозеров В.П., Кондаков Н. И. и др. Пищевые добавки водорослевого происхождения для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний. Архангельск, 1996. – 12 с.
2. Fordtran J.A., Santa Ana C.A., Cleveland M. A low-sodium solution for gastrointestinal lavage// Gastroenterology. – 1990 - Vol.98 – P.1-16.
3. Ройтберг Г. Е., Струтынский А.В. Внутренние болезни. Система органов пищеварения. М.:МЕДпресс-информ, 2007.
4. Шатц В.Д., Сахартова О. В. «Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии».- Рига: Зинатне,1988.- 390с.
5. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.1. – Минск, 2006.

APPLICATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD FOR ASSAY OF MULTICOMPONENT PREPARATION, WHICH NORMALIZE THE WORK OF GASTROINTESTINAL TRACT.

The optimum chromatographic conditions have been found and a HPLC method for the quantitative determination of the active substances (polyethylene glycol 4000 and sodium alginate) of new combined preparation, which normalize the work of gastrointestinal tract has been developed. The analysis was carried out using an Agilent HPLC system with refractive index detector. The proposed procedure was included in the project of normative documentation.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ НОВОГО КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА «ПАНДЕТОКС»

Демид Д.И., Залашко Л.М., Губина Л.П., Романовский Д.И., Петров П.Т.
ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: ifb@academpharm.by

Капсулы «Пандетокс» - новый оригинальный препарат антиалкогольного действия, обладающим метаболическим антиоксидантным и противогипоксическим корригирующим действием. Лекарственный препарат ускоряет элиминацию этанола из организма, уменьшает его токсическое действие, купирует проявления абстиненции. «Пандетокс» предназначен для лечения отравлений алкоголем и проведения дезинтоксикации организма. В состава препарата входят следующие компоненты: магния аспарагинат, декспантенол и янтарная кислота.

Наличие в препарате трех действующих веществ повлекло за собой необходимость разработки метода анализа, который позволил бы провести определение всех действующих веществ в препарате.

Для количественного определения магния аспарагината используется метод титрования [1,2]. Проведенные исследования показали, что эта методика может быть успешно применима для определения магния аспарагината в капсулах «Пандетокс».

Целью настоящей работы является разработка методики количественного анализа янтарной кислоты и декспантенола в препарате «Пандетокс» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) ».[3]

Материалы и методы. Для приготовления подвижных фаз (ПФ), а также для растворения стандартных и испытуемых препаратов использовали ацетонитрил для градиентной хроматографии (Сигма, США) и очищенную воду с удельным сопротивлением 18,2 Мом/см, полученную на установке «*Milli - Q*» (*Millipore*, США). В качестве стандартов определяемых веществ использовали фармацевтические субстанции, соответствующие всем требованиям нормативной документации. Все остальные использованные реактивы имели квалификацию не ниже «ч.д.а.».

Хроматографический анализ проводили на хроматографе *Agilent 1200* с диодно-матричным детектором. Использовали колонку размером 150×4,6 мм, заполненную обращено-фазовым сорбентом «*Zorbax Eclipse PlusC18*» с размером частиц 5 мкм (*Agilent Technologies*, США). Экспериментально подобранная подвижная фаза включала фосфатный буферный раствор, рН 2,6 и ацетонитрил, линейный градиент от 0 до 10% ацетонитрила за 30 мин. Скорость подвижной фазы составляла 0,5 мл/мин, объем инжестируемых проб – 50 мкл, детектирование проводили при 210 нм.

Для приготовления раствора стандартных образцов (РСО) около 50,0 мг янтарной кислоты и 12,5 мг декспантенола (точные навески) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл фосфатного буферного раствора (0,1 М KH_2PO_4), рН 4,6, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали.

Для приготовления испытуемого раствора около 135,0 мг (точная навеска) порошка тщательно растертого содержимого капсул помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 80 мл фосфатного буферного раствора (0,1 М KH_2PO_4), рН 4,6, встряхивали в течение 30 мин, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали.

Все растворы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Результаты. По предлагаемой методике были проанализированы ряд модельных растворов, а также опытные образцы препарата. Показано, что разработанная методика позволяет быстро и достаточно точно определять количественное содержание янтарной кислоты и декспантенола в препарате «Пандетокс». Время анализа составляет 20 мин.

Хроматограмма стандартного раствора, содержащего янтарную кислоту и декспантенол характеризовалась временами удерживания 8,5 и 19,1 мин соответственно. Подобранный нами система удовлетворяет требованиям пригодности. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику каждого компонента составляет 19619 для янтарной кислоты и 56818 для декспантенола, степень разделения между пиками составляет 36,3, симметрия пиков-1,79 и 1,18 соответственно. Для доказательства специфичности получены хроматограммы плацебо. Показано, что входящие в состав капсул вспомогательные вещества не мешают определению действующих веществ в капсулах «Пандетокс».

Разработанная методика включена в проект ФСП для определения показателя «Количественное определение».

Литература:

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.1. – Минск, 2006.
2. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.2. – Молодечно, 2008.
3. Шатц В.Д., Сахартова О. В. «Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии».- Рига: Зинатне,1988.-390с.

APPLICATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD FOR ASSAY OF NEW MULTICOMPONENT DRUG “PANDETOX”.

The simple and rapid high-performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed for the determination of active substances (succinic acid and dexpanthenol) of new drug “Pandetox”. The analytes were chromatographed under reversed-phase conditions on Zorbax Eclipse Plus C18 column. The proposed procedure may be successfully used for assay of succinic acid and dexpanthenol in drug.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОДОСТУПНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ОСЕЛЬТАМИВИРА ФОСФАТА

Демид Д.И., Кормушина А.Д., Фатеева О.А., Романовский Д.И., Петров П.Т.
ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: ifb@academpharm.by

В данной работе было выполнено исследование противовирусного препарата «Флустоп» на основе осельтамивира фосфата, активного в отношении вируса гриппа АН1N1. Производство препарата освоено на ГП «Академфарм» ИФБ НАН Беларуси. В качестве препарата сравнения использовали препарат «Тамифлю», капсулы 75 мг, производства «Ф.Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария. Лекарственная форма препарата представлена в виде твердых желатиновых капсул с содержанием активного компонента осельтамивира 75 мг.

Целью исследования являлся сравнительный анализ биодоступности препаратов «Флуостоп» в капсулах, 75 мг, производства Государственного предприятия «Академфарм» ИФБ НАН Беларуси и «Гамифлю», капсулы 75 мг, производства «Ф.Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария в тесте сравнительной кинетики растворения *in vitro*, которая заключалась в:

- оценке биодоступности препарата «Флуостоп» в капсулах, 75 мг в условиях *in vitro* в 4-х средах (0,01М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,8), 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2), 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 4,5) и вода;

- оценке биодоступности препарата «Гамифлю», капсулы 75 мг в условиях *in vitro* в 4-х средах (0,01М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,8), 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2), 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 4,5) и вода.

- сравнительной оценке кинетики растворения гранулята «Гамифлю», капсулы 75 мг и гранулята «Флуостоп», капсулы, 75 мг в условиях *in vitro* в 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2).

- валидации методики растворения в каждой среде.

На основании полученных результатов по кинетике высвобождения активного вещества в указанные среды была дана сравнительная оценка биодоступности исследуемого препарата «Флуостоп».

Исследования были выполнены в соответствии с методическими рекомендациями [1-5], в работе использовали прибор ERWEKA DT800с лопастью-мешалкой:

- - объем среды растворения – 900 мл;
- - температура среды растворения – (37±0,5°C);
- - скорость вращения мешалки – 50 об/мин.

Для исследования были выбраны следующие среды растворения:

- 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2);
- 0,01М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,8);
- 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 4,5);
- Вода очищенная.

Отбор проб раствора осуществляли в автоматическом режиме станцией ONLINE растворения, с подачей раствора в кювету для измерения с помощью спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 25 через определённые промежутки времени от начала процесса растворения (3 мин, 6 мин, 9 мин, 12 мин, 15 мин, 20 мин, 30 мин, 45 мин) и последующим возвратом испытуемого раствора в среду растворения.

Для количественного определения содержания осельтамивира фосфата в среде растворения был использован метод абсорбционной УФ-спектрофотометрии.

Оптическую плотность испытуемого раствора регистрировали при длине волны 240 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения соответствующую среду растворения.

Расчёт степени высвобождения осельтамивира фосфата из лекарственной формы в раствор (R%) проводили по отношению к раствору стандартного образца (PCO) осельтамивира фосфата.

Были получены следующие значения коэффициентов подобия (факторов сходимости):

1. $f_2=58,83$ (среда растворения - 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной рН 1,8)
2. $f_2=63,26$ (среда растворения - 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной рН 1,2)

3. $f_2=63,33$ (среда растворения - 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 4,5)

4. $f_2=64,81$ (среда растворения - вода очищенная).

Для сравниваемых препаратов «Флустоп» в капсулах, 75 мг, производства Государственного предприятия «Академфарм» ИФБ НАН Беларуси и «Тамифлю», капсулы 75 мг, производства «Ф.Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария в сравнительном тесте кинетики растворения *in vitro* в модельных средах 0,01М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,8) и 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2) отмечены степени высвобождения действующего вещества за 15 мин, достоверно превышающие критерий 85% [1], что позволяет признать профили подобными.

В средах вода и 0,05 М фосфатный буферный раствор (рН 4,5) значения коэффициентов подобия (факторов сходимости) также соответствуют критериям эквивалентности для теста кинетики растворения.

При проведении сравнительной *оценки кинетики* растворения гранулята «Тамифлю» и гранулята «Флустоп» в условиях *in vitro* в 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (рН 1,2), установлено, что различия в составе вспомогательных компонентов не влияют на кинетику высвобождения активного компонента из капсул и полученный фактор сходимости равен 80,54.

В результате проведенной валидации оценены: избирательность данных методик, линейность (не менее 0,99 для 4-х сред растворения), повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость, правильность.

Таким образом показано, что разработанный препарат «Флустоп» эквивалентен оригинальному препарату «Тамифлю» в тесте сравнительной кинетики растворения.

Литература:

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь/ Минск, «МГПТК полиграфии», 2006 – Т.1 – с.593-594
2. «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств», методические указания/ МЗСР РФ, 2004
3. Общая фармакопейная статья 42-0003-00 «Растворение»
4. «Исследование биодоступности и биоэквивалентности», руководство по клиническим исследованиям 42-7.1:2005/ Киев, МЗ Украины – 2005
5. Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence: CPMP/EWP/QWP/!S)/(*/ The European agency for the evaluation of Medicinal Products; London, 26 July 2001.

COMPARATIVE ESTIMATION OF BIOAVAILABILITY OF MEDICAL PRODUCTS OF OSELTAMIVIR PHOSPHATE.

It has been proved the similarity of the dissolution profiles of the test (Flustop) and comparator (Tamiflu) products. Test drug product and comparator dissolve 85% in 15 min or less in 900 mL buffer pH 1.2 and 1.8, using the paddle apparatus at 50; and test product and comparator show dissolution profile similarity in pH 4.5 and water media.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ СУКЦИНАТ-СОДЕРЖАЩИМ ПРЕПАРАТОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Емельянова А.А., ²Якубовский С.В., ²Чайка Л.Д., ¹Жукова Н.Д.

¹Институт физиологии НАН Беларуси, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, Беларусь;

²Белорусский государственный медицинский университет, 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, Беларусь

Вопрос о структурно-функциональном состоянии поджелудочной железы при абдоминальной инфекции холангиогенного происхождения привлекает к себе особое внимание в связи с тем, что у части пациентов с заболеваниями желчевыводящих путей выявляется острый панкреатит [1]. Причины и механизмы развития холецистопанкреатита окончательно не выяснены. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что в научной литературе практически отсутствуют работы, направленные на изучение ультраструктурных изменений поджелудочной железы на фоне системного воспалительного ответа (СВО), обусловленного деструктивными изменениями стенки желчного пузыря. Имеющиеся в литературе данные о низкой антиоксидантной обеспеченности поджелудочной железы и ее чувствительности к окислительному стрессу [2] позволяют предположить, что одной из причин поражения поджелудочной железы при абдоминальной хирургической инфекции может явиться развитие эндогенной интоксикации и нарушение окислительного гомеостаза - ее составного компонента, способствующие нарушению системных адаптационных механизмов и вызывающие структурные повреждения жизненно важных органов и систем (3). Исследование гистологической и субмикроскопической организации поджелудочной железы в условиях острого экспериментального холецистита может иметь значение как для изучения структурных основ формирования органной дисфункции в условиях СВО, так и для проведения комплексной, патогенетически оправданной терапии абдоминальной инфекции холангиогенной природы.

Цель настоящей работы - изучить изменения структурной организации поджелудочной железы в условиях абдоминальной хирургической инфекции холангиогенного происхождения, а также установить возможность их коррекции с помощью сукцинат-содержащего препарата мексидол (отечественный аналог Мексидел).

Материал и методы исследования. Работа выполнена на 30 морских свинках. Острый деструктивный холецистит (ОДХ) моделировали по способу [4]. Мексидол вводили внутримышечно в дозе 25мг/кг веса. Из эксперимента животных выводили через 24 и 48 часов от начала моделирования ОДХ. Для гистологических исследований образцы ткани брали из правой (дуоденальной) доли поджелудочной железы, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для электронно-микроскопических исследований материал фиксировали в 4% глутаральдегиде, обрабатывали 1% раствором четырехокси осмия, обезвоживали в спиртах восходящей крепости и ацетоне по общепринятой методике [5]. Заливали в смесь аралдитов. Резали на микротоме ЛКВ (Швеция), просматривали на электронном микроскопе JEM 100 CX (Япония).

Результаты исследования. Поджелудочная железа характеризуется типичным строением и является одновременно экзокринным и эндокринным органом, разные структурные элементы которого выполняют эти функции. На окрашенных гематоксилином и эозином препаратах в ацинаритах выявляются апикальная оксифильная и базофильная гомогенные зоны. На субмикроскопическом уровне клетки имеют форму конуса с суженной

верхушкой и широким основанием, где преимущественно располагаются округлой формы ядра с крупными ядрышками. Суженная (апикальная) область содержит зимогенные гранулы различной степени плотности. Цитолемма на апикальной поверхности образует микроворсинки. Цитоплазма богата органеллами и содержит митохондрии, мембранные цистерны, наружные стенки которых усыпаны рибосомами, цистерны и вакуоли аппарата Гольджи, свободные рибо- и полисомы, лизосомы и др. Она интенсивно базофильна, как это можно ожидать в клетках, синтезирующих большие количества белка. Боковые поверхности клеток так плотно прижаты друг к другу, что границы между отдельными клетками не всегда отчетливо видны. В соединительнотканной строме располагаются ретикулярные волокна, кровеносные сосуды, нервные волокна и нервные ганглии вегетативной нервной системы. Эндокринные клетки островков Лангерганса имеют меньшие размеры и содержат секреторные гранулы, которые разных клетках по своим физико-химическим и морфологическим свойствам неоднородны.

Гистологически установлено, что через 24 часа после моделирования ОДХ в ткани поджелудочной железы отмечается отек стромы, в сосудах микроциркуляторного русла явления стаза, диapedезные кровоизлияния, мелкоочаговые лимфогистиоцитарные инфильтраты. Имеет место слабо выраженная базофилия и нечеткость контуров цитоплазмы клеток островков Лангерганса.

Через 48 часов от начала эксперимента изменения в ткани железы выражены в большей степени: нарастает отек междольковой стромы, лимфогистиоцитарная инфильтрация, реакция со стороны сосудов микроциркуляторного русла. Наблюдаются признаки застоя секрета в выводных протоках железы, вакуолизация цитоплазмы клеток паренхимы.

Изменения ультраструктуры поджелудочной железы через 24ч после создания модели ОДХ заметны как в экзокринных, так и в эндокринных элементах органа, страдает структура всех видов цитоплазматических органелл. В митохондриях уменьшается плотность расположения крист и/или их деструкция. Расширяются цистерны эндоплазматического ретикулума. В результате частичного лизиса органелл образуются ограниченные мембранами полости. Увеличивается количество лизосом разной плотности и размера. Изменяется форма ядер и распределение в них хроматина. Изменения в структуре эндотелия микрососудов проявляются повреждением цитоплазматических органелл эндотелиальных клеток, а в структуре нервных волокон вегетативных ганглиев - разрушением их органелл.

Через 48ч после создания модели ОДХ нарушения в ультраструктурной организации ациноцитов прогрессируют и зачастую принимают грубый характер, проявляясь деструкцией, лизисом органелл, появлением значительного числа лизосом и мембранных включений. Иногда происходят разрывы сосудов, что ведет к отеку периваскулярных пространств и выходу форменных элементов крови в межклеточное пространство. Перестройки в субмикроскопической организации островковых (Лангерганса) эндокринных клеток сопровождаются, судя по числу опустошенных эндокринных пузырьков, выходом значительного количества секрета в протоки и в кровеносное русло. Сосуды с нарушенной структурой эндотелия, наряду с имеющимися в поджелудочной железе фенестрированными капиллярами, способствуют этому процессу.

Введение мексидола экспериментальным животным через 24-48 часов от начала эксперимента сопровождается снижением выраженности гистологических изменений ткани поджелудочной железы. У леченых животных отмечается незначительная вакуолизация цитоплазмы ациноцитов и умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла органа. Ультраструктура железы животных после лечения мексидолом на фоне острого деструктивного холецистита свидетельствует о восстановлении большинства клеточных элементов этого органа, структура которых аналогична таковой в контроле. Число и степень деструктивно-дистрофических изменений в оставшихся поврежденных ациноцитах гораздо менее выражены, чем это наблюдалось у животных через 24ч после создания модели ОДХ.

Ядра большинства ациноцитов обычной формы и структуры, цитоплазматические органеллы, как правило, не изменены. Гранулярная эндоплазматическая сеть содержит достаточно большое число рибосом, располагающихся не только на цистернах, но и свободно в клеточном пространстве. Заметно возрастает число энергезированных митохондрий, что свидетельствует о повышении уровня клеточных энергетических процессов и белкового синтеза. Зимогенные гранулы в апикальной части ациноцитов достаточно плотные, а секреторные гранулы в островковых клетках Лангерганса разной степени плотности, что свидетельствует о разной степени синтеза, накопления и выделения секрета. Следует отметить наличие бокаловидных клеток в эпителии протоков, которые в достаточной мере заполнены слизистым секретом. Ультраструктура микроциркуляторного русла и нервных волокон вегетативных ганглиев в основном без особенностей, за исключением некоторых отростков, где выявляется деструкция отдельных цитоплазматических органелл.

Заключение. Итак, развитие острого деструктивного холецистита через 24 – 48 часов от начала эксперимента сопровождается возникновением реактивных и грубых деструктивных процессов в паренхиме и строме поджелудочной железы, экзокринных и эндокринных клетках, в элементах ее микроциркуляторного русла и ганглиях вегетативной нервной системы. Одной из причин указанных изменений, возможно, является продемонстрированное нами ранее развитие окислительного стресса и эндогенной интоксикации в условиях острого экспериментального деструктивного холецистита [6]. Результаты настоящих исследований свидетельствуют о том, что использование сукцинатсодержащего препарата мексидол (отечественный аналог Мексидел), обладающего антиоксидантными и антигипоксантами свойствами, снижает выявленную нами на световом и субмикроскопическом уровнях выраженность повреждений всех структурных элементов поджелудочной железы экспериментальных животных.

Литература:

1. Некрасов, А.В. Холецистопанкреатит / А.В. Некрасов, Д.С. Тарбаев // В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологической и сердечно-сосудистой хирургии. – Таллин, 1976. – ч. 1. – С. 154-157.
2. Черданцев, Д.В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите / Д.В. Черданцев [и др.]. - Красноярск, 2002. – 148 с.
3. Кижаяева Е.С., Закс И.О. Полиорганная недостаточность в интенсивной терапии // Вестн. интенс. терап. – 2004. - №4. – С. 14-18.
4. Shaked, G. Acute acalculous cholecystitis - experimental and clinical observations / G. Shaked [et al.] // Isr. J. Med. Sci. – 1988. – Vol. 24, № 8. – P. 401-404.
5. Боголепов, Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н.Н. Боголепов. – М., изд. 1-го Московск. мед. ин-та, 1976. – 172 с.
6. Якубовский, С.В. Влияние мексидола на течение острого экспериментального холецистита / С.В. Якубовский, С.Л. Анищенко, Е.А. Римжа, А.В. Бокач // Военная медицина. – 2008. - № 3. – С. 33-37.

PANCREAS STRUCTURE CHANGES AT ABDOMINAL SURGICAL INFECTION AND THEIR CORRECTION BY SUCCINATE-BASED PREPARATION IN EXPERIMENT

¹Emelyanova A.A., ²Yakubovsky S.V., ²Chaika L.D., ¹Zukova N.D.

¹*Institute of Physiology of NAS of Belarus. 220072. Minsk, Akademicheskaya Str., 28, Belarus;*

²*Belarusian State Medical University. 220116. Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, Belarus*

It was shown in experimental conditions of acute destructive cholecystitis that administration of succinate-based preparation Mexidol (domestically produced analogue Mexibel), possessing antioxidative and antihypoxic action reduced intensity of all pancreas tissue structural damages revealed on light and submicroscopic levels.

ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА С АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ТЕСТЕ HOT PLATE НА МЫШАХ

Жукова И.А., Павленко В.С., Никифорова И.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: ECPHarm@tut.by

Комбинированные обезболивающие средства имеют ряд преимуществ по сравнению с монокомпонентными анальгетиками. Это, прежде всего, повышение анальгетической эффективности, уменьшение дозы активных ингредиентов и, соответственно, снижение частоты и тяжести побочных реакций. Однако в большой степени эффект комплекса зависит от весового соотношения используемых препаратов и может быть как аддитивным, так и антагонистическим [1].

Задачей настоящего исследования являлось изучение эффективности анальгезии у мышей при применении различных вариантов комбинаций трамадола и парацетамола.

Анальгетическую активность исследуемых препаратов изучали на мышцах-самцах ICR массой 20±2 г при внутрижелудочном способе введения.

Стандартный обезболивающий препарат опиоидной природы трамадол вводили в дозах 5, 10, 20 и 30 мг/кг. Выбор такого диапазона доз основывался на данных литературы, касающихся изучения анальгетической активности данного препарата в экспериментах на лабораторных животных [2]. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду.

Парацетамол вводили в виде суспензии в 1,5 % крахмальном геле в дозах 100, 200, 300 и 400 мг/кг.

Анальгетическое действие комплекса трамадол+парацетамол изучали при соотношениях составляющих ее компонентов 1:9; 1:10 и 1:20 в дозах 50, 100, 200, 300 и 400 мг/кг. Субстанцию вводили в виде 1,5% крахмальной суспензии.

Животные контрольных групп получали растворитель. Объем введения составлял 0,15–0,2 мл/10 г массы тела животного.

Тест Hot Plate заключается в регистрации латентного периода болевой реакции, вызванной термическим раздражением конечностей мыши при помещении ее на нагретую до определенной температуры металлическую пластинку анальгезиметра Hot Plate (Columbus Instruments, США). Латентный период болевой реакции животных регистрировали до введения препарата и через 15 мин, 30 мин, 1 ч и 3 ч после введения (а при наличии эффекта – и дольше) и подсчитывали в абсолютных временных единицах (секунды) и в процентах (%).

MPE – maximal possible effect). Максимальный интервал нахождения животного на пластинке был принят равным 30 секундам [3].

При внутрижелудочном введении трамадола в опытах на мышах-самцах ICR анальгетическое действие его было выявлено при применении двух наибольших доз – 20 и 30 мг/кг. Через 1 час после введения латентный период болевой реакции превышал исходную величину на 64,4 и 36,8% соответственно.

Парацетамол в данном тесте оказалось неэффективным во всем диапазоне испытанных доз.

При введении мышам комплексного препарата трамадол+парацетамол при соотношении составляющих 1:9 анальгетический эффект был зафиксирован уже через 30 минут после введения. Анальгетическое действие комплекса в дозах 200, 300 и 400 мг/кг составило 194,2; 205,3 и 232,4% по сравнению с исходным показателем, принятым за 100%, соответственно, причем действие доз 200 и 400 мг/кг сохранялось свыше трех часов.

При соотношении трамадол:парацетамол как 1:10 болеутоляющий эффект комплексного препарата был зафиксирован у мышей после введения доз от 100 до 400 мг/кг. Через 30 мин вычисляемый показатель анальгетической активности колебался в диапазоне 136,5 – 180,7%. Для дозы 400 мг/кг эффект сохранялся более часа.

При изменении соотношения трамадол:парацетамол на 1:20 было выявлено более медленное, по сравнению с соотношением 1:10, развитие анальгетического действия комплексного препарата. Через 30 мин после введения изучаемый эффект был выявлен только для максимальной дозы 400 мг/кг. Но уже через 60 мин после введения комплекса в данном соотношении удлинение латентного периода ответной реакции наблюдалось во всем диапазоне доз. Порог болевой чувствительности после введения доз 100, 200, 300 и 400 мг/кг превысил исходный показатель на 54,4; 76,3; 50,6 и 92,7% соответственно. Действие дозы 400 мг/кг сохранялось свыше 3 часов. Таким образом, в данном соотношении при совместном применении изучаемых препаратов эффективными оказались дозы, начиная с 5 мг/кг для трамадола и 95 мг/кг – для парацетамола.

Результаты, полученные в тесте Hot Plate в опытах на мышах-самцах, свидетельствуют о том, что наиболее выраженный анальгетический эффект наблюдается именно у комплекса трамадол+парацетамол, причем проявляется он при совместном введении обоих составляющих его препаратов в тех дозах, в которых по отдельности они анальгетического эффекта не проявляли.

Литература:

1. Interaction between metamizol and tramadol in a model of acute visceral pain in rats / R.Poveda [et al.] // *European Journal of Pain*. – 2003 – Vol. 7, No. 5.– P. 439–448.
2. The experimental toxicology of tramadol: an overview / T. Matthiesen et al. // *Toxicol. Lett.* – 1998. – Vol. 95, № 1. – P. 63-71.
3. Woolfe G., Macdonald A. D. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol) // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1944. – № 80. –P. 300–307.

ANALGESIC ACTION OF T AND P SUBSTANCES IN HOT PLATE EXPERIMENTS ON MICE

Zhukova I.A., Pavlenko V.S., Nikiforova I.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

It was studied the analgesic effect of different combinations of tramadol and paracetamol in Hot Plate experiment on male mice. Our data have revealed that combination of tramadol+paracetamol in 1:20 ratio had sharply defined analgesic effect in all investigated doses which had prolonged more than one hour.

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЛАВОНОИДОВ

Забело О.И., Федулова Е.В., Анисович М. В. Афонин В.Ю., Шилов В.В.,
Красненкова Т.П., Ковалева М.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: viktorafonin@ya.ru

Актуальность проблемы. Увеличение заболеваемости сердечно-сосудистой патологией – одна из острейших проблем сегодняшнего дня. Учитывая сложный, многофакторный механизм развития болезней системы кровообращения ведется постоянный поиск лекарственных средств (ЛС), оказывающих комплексное патогенетическое влияние на сердечно-сосудистую систему (ССС). Одним из перспективных направлений фармакологии СССР является использование растительного сырья, содержащего компоненты разнонаправленного действия. За последнее время со стороны многих ученых значительно повысился интерес к растительным флавоноидам. Флавоноиды принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в растениях, и демонстрируют в эксперименте цитопротекторные свойства [1]. Это говорит о необходимости изучения фармакологических свойств растительных флавоноидов и поисков новых аспектов использования препаратов на их основе. Придерживаясь концепции трех R (Replacement, Reduction, Refinement) по сокращению, усовершенствованию и замене экспериментов на млекопитающих в институте применяют альтернативные способы исследований на низших видах живых организмов и культурах клеток.

Из растительных флаваноидов лакрицы *Glycyrrhiza glabra* изготавливают лекарственные средства «Ликвиритон» и «Флакарбин» производства фармацевтической компании «Здоровье», Харьков, Украина, обладающие спазмолитическим, противовоспалительным и умеренным антацидным действиями. Они предназначены для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также для лечения воспаления печени и желчевыводящих путей. Создание этих препаратов было осуществлено непосредственно под руководством профессора Г.В. Оболенцевой из ГП ГНЦЛС РФ.

Цель: Изучить цитопротекторные и гастропротективные свойства растительных флавоноидов.

Материалы и методы. Для оценки гастропротективного эффекта растительных флавоноидов лакрицы (РФЛ) использовали 10 трехмесячных самцов крыс линии Wistar, из которых было сформировано две группы по 5 в каждой. Первой группе вводили интрагастрально ацетилсалициловую кислоту (АСК) в дозе 150 мг/кг, а второй – АСК в той же дозе в сочетании с РФ в дозе 150 мг/кг. Животные получали исследуемый препарат

пятикратно на протяжении трех дней. Состояние слизистой оболочки желудка оценивали после аутопсии по таким параметрам как наличие кровоизлияний и эрозий.

В экспериментах по изучению цитопротекторных свойств использовали культуру эмбриональных фибробластов человека, моллюсков *Lymnaea stagnalis* лабораторного разведения (n=40), полученных от животных природных популяций водоемов Беларуси и бактериальный штамм TA100 *Salmonella typhimurium*.

Фибробласты выращивали в CO₂ инкубаторе (Hera Cell) при 37°C, 5% CO₂, влажности 80% в присутствии РФ, растворенных в 0,1 % ДМСО. Были выбраны следующие концентрации РФ 0,1, 1,0 и 10 мг/л, которые добавляли в культуру клеток при смене среды. В процессе культивирования за 18 ч. до фиксации клеток в культуру добавляли доксорубин гидрохлорид в концентрации 10 мг/л. Клетки фиксировали через 14 суток культивирования и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 («Beckman Coulter»). На основании гистограмм распределения содержания ДНК в клетках изучены основные показатели клеточного цикла (распределение клеток по стадиям), частота клеток с микроядрами и апоптоз (гиподиплоидные клетки).

Моллюскам в среду обитания дважды добавляли РФ со следующими конечными концентрациями: 3, 30 и 100 мг/л. Обработку проводили в течение 24 часов с промежутком в 5 суток. На шестые сутки в воду добавляли нитрат свинца (0,14 г/л). Клетки мантийной жидкости собирали через 24 часа и фиксировали смесью этанола и уксусной кислоты (3:1). На препаратах с использованием световой микроскопии подсчитывали клетки с различными признаками гибели и микроядрами.

В эксперименте с бактериями изучали антимуутагенные свойства РФЛ в концентрациях 3, 30, 100 мг/л с использованием нитрозометилмочевины (1 мг/мл) в качестве мутагена на штамме TA100 *S. typhimurium* в тесте Эймса без метаболической активации.

Для статистического анализа данных использовали однофакторный метод ANOVA, достоверность различий определяли тестом Фишера и Стьюдента.

Результаты. Общее состояние слизистой оболочки желудка у крыс контрольной и опытной групп значительно отличались. В первой группе у 100% особей отмечены кровоизлияния и обширная гиперемия стенок желудка, а крупные изъязвления в 30% случаев. Состояние слизистой крыс второй группы характеризовалось только наличием мелких кровоизлияний у 40% животных, $p=0,038$. Полученные нами результаты согласуются с данными британских исследователей, которые показали, что повреждение слизистой оболочки желудка, индуцируемого у крыс аспирином в дозе 60 мг/кг существенно уменьшается при одновременном приеме деглицирризинованной лакрицы, содержащей помимо комплекса флавоноидов дополнительно небольшое количество глицирризиновой кислоты в дозе 100-500 мг/кг [2].

Для изучения мутагенных и антимуутагенных свойств специй и лекарственных растений широко применяется тест Эймса на культуре бактерий *Salmonella typhimurium* в отсутствие метаболической активации [3]. Данный подход нами считается оптимальным для оценки протекторных эффектов РФЛ в желудочно-кишечном тракте до метаболизма печеночными ферментами. Установлено, что у РФЛ отсутствуют мутагенные свойства. Отмечено, что при действии прямого мутагена нитрозометилмочевины на культуру микроорганизмов с предварительно введенными РФЛ во всех исследуемых дозах (3, 30 и 300 мг/кг), число ревертантов статистически было достоверно ниже, чем в контрольной группе, обработанной индуктором повреждений ДНК. Данный факт свидетельствует о антимуутагенных свойствах РФЛ.

Добавление свинца в среду обитания моллюсков приводит к увеличению гибели клеток, чувствительных к повреждению ДНК, путем апоптоза и пикноза, что в конечном случае приводит к накоплению клеток с репродуктивной гибелью, о чем свидетельствует повышение уровня клеток с микроядрами. Введение РФЛ в концентрациях 3 и 100 мг/мл не

приводит к изменению количества клеток с микроядрами, а добавление в концентрации 30 мг/мл – способствует незначительному увеличению делящихся клеток. На фоне цитотоксического действия свинца в экспериментах на моллюсках было установлено, что РФЛ уменьшают число клеток с признаками гибели, что свидетельствует о наличии селективных цитопротекторных свойств для гетерогенной клеточной популяции амбиоцитов мантийной жидкости моллюсков. Уменьшение клеток с микроядрами по сравнению с контролем на фоне увеличения числа клеток с признаками пикноза указывает на возможность селекции клеток с повреждениями ДНК. Данный факт говорит о том, что РФ ограничивают неэффективную клеточную пролиферацию, которая часто приводит к деструкции тканей или раковым заболеваниям. Снижение уровня клеток на последних стадиях реализации запрограммированной клеточной гибели (апоптотические тела) и накопление клеток на стадии апоптоза при введении РФЛ также указывают на изменение цитогенетических процессов.

В культуре эмбриональных фибробластов установлено, что на фоне действия доxorубина РФЛ в концентрациях 1,0 и 10,0 мг/л обладают как антиапоптотическим так антикластогенным эффектами, которые выражаются в уменьшении числа гиподиплоидных клеток и клеток с микроядрами. Следовательно, действие РФЛ на фоне цитотоксического и мутагенного действия свинца и адриамицина можно охарактеризовать как цитопротекторное.

Выводы. На культуре микроорганизмов *Salmonella typhimurium* выявлены антимуtagenные, а на моллюсках *Lymnaea stagnalis* и культуре клеток человека цитопротекторные свойства РФ. В нашей работе, показано, что растительные флавоноиды проявляют гастропротективные свойства при одновременном введении максимальной суточной дозы АСК, что, возможно, связано с их антимуtagenным и антиапоптотическим действиями.

Литература:

1. Leung, A.Y. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics/ A.Y. Leung, S. Foster // 2nd Ed. Wiley-Interscience. NY, 1995. – P.98 - 99.
2. Rees, W.D.W. Effect of Deglycyrrhizinated Liquorice on Gastric Mucosal Damage by Aspirin/ W.D.W. Rees, J. Rhodes, J.E. Wright et al. // Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1979. Vol. 14, N 5. P.605-607.
3. Higashimoto, M. Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand/ M. Higashimoto, J. Purintrapiban, K. Kataoka // Mutat. Res, 1993. – P.135-142

THE PROTECTIVE EFFECTS OF PLANT FLAVONOIDS

O.I. Zabelo, E.V. Fedulova, V.Yu. Afonin, V.V. Shilov, T.P. Krasnenkova, V. Kovaleva
State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of
the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk,
Republic of Belarus, E-mail: viktorafonin@ya.ru

Plant flavonoids have been used in medicine for the treatment and prevention of various diseases for a long time. In our study we observed the cytoprotective and antimutagenic characters of plant flavonoids. The cytoprotective effect was shown in dose 100 mg/l in toxicity action of plumbum nitrite on mollusc *Lymnaea stagnalis*. The cytoprotective effect was shown in dose 1,0 and 10 mg/l in toxicity action of doxorubicin hydrochloride on human embryonic fibroblasts. The antimutagenic affinity was detected in a range of doses 3, 30, 100 mg/l on *Salmonella typhimurium* culture. Furthermore, we revealed the gastroprotective effect of plant flavonoids in simultaneous

introduction of both the acetylsalicylic acid and plant flavonoids. These effects may be used for the clinical implementation.

**УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОД И УНИФИЦИРОВАННАЯ МЕТОДИКА
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОФОБНЫХ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ
МЕТОДОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ**

^{1,2}Здрачек Е.А., ^{1,2}Егоров В.В., ²Назаров В.А., ¹Календо Р.А.

¹*Белорусский государственный университет, химический факультет
220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14;*

²*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, 220030, г. Минск,
ул. Ленинградская, 14;*

Потенциометрический метод анализа приобретает в последнее время все большее значение для анализа физиологически активных аминов (ФАА). Этот метод характеризуется рядом неоспоримых аналитических достоинств, таких как экспрессность, селективность, чувствительность, что в сочетании с доступностью и невысокой стоимостью оборудования, возможностью совмещения с автоматизированными и компьютерными системами делает его весьма перспективным для фармацевтического анализа.

На практике применяются два варианта потенциометрического метода: прямая потенциометрия (метод, основанный на непосредственном расчете концентрации определяемого вещества по результатам измерения потенциала) и потенциометрическое титрование (метод, основанный на нахождении точки эквивалентности при титровании ФАА соответствующим титрантом). В качестве титранта, как правило, используются высокогидрофобные анионы, так называемые общеалколоидные осадители: тетрафенилборат, пикрат, дипикриламидат, пикролонат, тетраиодкадмиат и др., образующие с катионами ФАА малорастворимые осадки. Резкое изменение концентрации ФАА вблизи точки эквивалентности приводит к скачкообразному изменению потенциала электрода, который в данном случае выступает в роли своеобразного индикаторного средства. Метод потенциометрического титрования обычно проигрывает методу прямой потенциометрии в плане чувствительности и экспрессности, однако отличается большей точностью и надежностью результатов и предъявляет менее строгие требования к характеристикам используемых электродов и квалификации исполнителей. Поэтому в тех случаях, когда высокая чувствительность не является определяющим фактором (например, при определении ФАА в лекарственных формах с достаточно высоким их содержанием) метод потенциометрического титрования является предпочтительным.

Основными требованиями, выполнение которых необходимо для получения надежных результатов, являются соблюдение стехиометрии при взаимодействии ФАА с титрантом (при использовании общеалколоидных осадителей это требование обычно выполняется) и достаточная высота скачка потенциала. Последняя величина непосредственно связана с гидрофобностью титранта и определяемого амина, поэтому данный метод пригоден преимущественно для определения достаточно гидрофобных ФАА.

Методы исследования. Классический вариант потенциометрического титрования предполагает проведение серий предварительного титрования стандартного раствора (для установления титра титранта, корректировки методики анализа) и анализируемого раствора исследуемого вещества с последующим построением кривых титрования и их обработкой

для нахождения точки эквивалентности, что связано с существенными временными затратами.

Современные методы обработки результатов титрования, основанные на нахождении первой или второй производной, позволяют исключить процедуру графического построения кривых титрования, предполагая при этом, что зависимость потенциала от объема титранта является обратимой в любой точке. На практике, однако, скорость установления равновесного значения потенциала вблизи точки эквивалентности может существенно замедляться, в результате чего фиксируемые значения потенциала могут отличаться от равновесных. В итоге, компьютерная обработка полученных данных приводит к появлению пилообразных зависимостей производных потенциала по объему титранта, что может привести к ошибкам в нахождении точки эквивалентности. Получение же равновесных кривых титрования может быть сопряжено с существенным увеличением времени анализа.

Указанные недостатки процедуры проведения потенциометрического титрования и обработки кривых титрования в значительной степени могут быть преодолены в варианте автоматического титрования до заданного значения потенциала, соответствующего потенциалу точки эквивалентности и экспериментально устанавливаемому по результатам титрования стандартного раствора.

Такая процедура весьма удобна при проведении рутинных серийных анализов близких по составу объектов. В случае же одноразовых анализов титрование в автоматическом режиме не обладает существенными преимуществами перед ручным титрованием, поскольку точное установление потенциал точки эквивалентности сопряжено с большими временными затратами.

Результаты. Нами было показано, что при определении высокогидрофобных ФАА, характеризующихся высокими скачками на кривых титрования, указанные неудобства могут быть легко преодолены. А именно, в этом случае нет необходимости в титровании стандартного раствора для установления потенциала конечной точки титрования. Как следует из уравнения Нернста, степень оттитрованности определяемого ФАА более 99% гарантированно достигается при снижении потенциала на 120 мВ. Поэтому достаточно определить начальное значение потенциала исследуемого раствора, установить на блоке автоматического титрования значение потенциала на 120 мВ ниже и провести титрование до данного значения потенциала. Незначительные погрешности (недотитрованность или перетитрованность раствора), обусловленные отклонением истинного потенциала в точке эквивалентности от заданного значения, практически полностью устраняются титрованием близкого по концентрации стандартного раствора в аналогичных условиях. При этом существенным параметром является стабильность потенциала электрода. Это условие соблюдается не всегда, поскольку ионный ассоциат ФАА с титрантом, обладая высокой гидрофобностью, способен экстрагироваться в поверхностный слой мембраны, приводя к изменению его состава, что, в свою очередь, сопровождается дрейфом потенциала.

Экспериментально было показано, что стабильность потенциала может быть существенно улучшена путем оптимизации состава мембраны. Было установлено, что процесс экстракции ионного ассоциата ФАА с титрантом в мембрану может быть в значительной мере ослаблен при использовании пластификаторов с низкой экстрагирующей способностью (термодинамический контроль) и увеличении содержания полимера в мембране (кинетический контроль). В частности, для мембраны, содержащей дибутилфталат в качестве пластификатора, при содержании поливинилхлорида $\geq 35\%$ дрейф потенциала не превышает 10 мВ в течение рабочего дня, что вполне пригодно для проведения анализа.

Основным требованием в данном случае является достаточно высокая гидрофобность ФАА (крайние значения потенциалов начальной и конечной ветвей титрования должны различаться не менее, чем на 200 мВ). Этим условиям удовлетворяет несколько десятков

ФАА. Кроме того, было показано, что можно легко определять целый ряд ФАА с использованием одного универсального электрода.

Методика выполнения измерений. Готовят растворы: титранта – $\sim 10^{-2}$ М NaТФБ; заполнения электрода сравнения – 1 М NaCl и 1 М Na₂SO₄; заполнения ионоселективного электрода – 10^{-3} М HCl и 10^{-3} М Bu₄N⁺. Ионоселективный электрод помещают в стакан и вымачивают в течении суток в растворе $\sim 10^{-2}$ М определяемого ФАА. В мерную колбу на 50, 100 либо 200 мл (в зависимости от числа параллельных измерений) помещают несколько анализируемых таблеток с таким расчетом, чтобы концентрация ФАА была близка к концентрации титранта. В случае плохой растворимости амина либо малого содержания его в таблетке можно приготовить более разбавленный раствор. В таком случае титрование проводится с использованием титранта, разбавленного в 10 раз. Таблетки растворяют в дистиллированной воде, доводят водой до метки и переносят раствор в коническую колбу.

Из раствора ФАА отбирают аликвоту 10 мл и переносят в стакан объемом 50 мл. На блоке автоматического титрования задают коэффициент зоны равный 1 и время выдержки около 50 с. Время выдержки может варьироваться, при этом малые значения повышают экспрессность определения, но снижают точность (возникает опасность перетитрования, так как не успевает установиться потенциал). Большие значения выдержки повышают точность определения, но при этом увеличивается время, затрачиваемое на единичное титрование. После установления потенциала задают конечную точку титрования (потенциал до начала титрования минус 120 мВ) и включают режим автоматического титрования. По окончании титрования снимают показания бюретки. Электрод промывают дистиллированной водой и вытирают фильтровальной бумагой. Проводят повторное титрование.

Было проведено определение количественного содержания ФАА различного строения (амброксол, бромгексин, верапамил, винпоцетин, димедрол, дротаверин, ганглерон, этизин и др.) в таблетках. Случайная составляющая относительной погрешности определения не превышала 1%, время определения – порядка 10 минут, рабочий ресурс электрода при условии 8-часовой ежедневной эксплуатации – не менее 3 месяцев.

UNIVERSAL ELECTRODE AND UNIFORM TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROPHOBIC PHYSIOLOGICALLY ACTIVE AMINES IN DRUGS BY POTENTIOMETRIC TITRATION

^{1,2}Zdrachek E.A., ^{1,2}Egorov V.V., ²Nazarov V.A., ¹Kalendo R.A.

¹ *Belarusian State University, Chemical department*

220030, Minsk, Leningradskaya str., 14;

² *Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University*

220030, Minsk, Leningradskaya str., 14;

Universal ion selective electrode with improved potential stability has been proposed for physiologically active amines determination. Uniform technique for hydrophobic amine (ambroxole, bromhexine, verapamile, vinpocetine, dimedrole, drotaverine, ganglerone, etizine, etc.) determination in pills by potentiometric titration with sodium tetraphenylborate has been developed. Titration is performed in automatic mode. Determination error do not exceed 1%; time of determination is about 10 min; endurance of the electrode under 8h/day exploit condition – no less than 3 months.

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ *ECHINACEAE PURPUREA*

¹Иванов О.А., ²Красненкова Т.П., ²Афонин В.Ю., ¹Домаш В.И.

¹ГНУ «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича НАН Беларуси» 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, E-mail: heleg-zero@mail.ru;

²Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2

Состояние системы гемостаза организма во многом определяется динамическим равновесием между протеиназами, вовлеченными в каскад реакций, приводящих к свертыванию крови, и их эндогенными ингибиторами. При ряде патологий происходит нарушение равновесного состояния системы, что сопровождается избыточной активацией протеолитических ферментов. В настоящее время для контроля такой избыточной активации используют ингибиторы животного происхождения (гепарин). Вместе с тем, появляются данные об эффективном подавлении активности некоторых ферментов системы гемостаза белковыми ингибиторами растительного происхождения [1].

Эхинацея – одно из наиболее применяемых в лечебных целях растение. При этом в практике акцент делается на иммуномодулирующих эффектах экстрактов эхинацеи. Представляет определенный интерес поиск новых форм биологической активности экстрактов и препаратов из этого растения. Ранее в экстрактах корневищ и листьев *Echinaceae purpureae* (Compositae), а также в очищенном препарате ингибиторов была обнаружена значительная ингибиторная активность в отношении трипсина и тромбина [2]. В настоящей работе было исследовано действие препарата ингибиторов трипсина/тромбина из корневищ *E. purpureae* (ЕрI) на показатели свертываемости крови крыс.

Материалы и методы. Препарат ингибиторов трипсина/тромбина получали из муки осенних корневищ *E. purpureae* в два этапа. На первом осуществляли экстракцию белков с последующим их высаливанием при помощи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. На втором этапе проводили очистку ЕрI при помощи гель-хроматографии. Перед дальнейшим использованием полученный препарат ингибиторов обессоливали и лиофильно высушивали.

Активность ингибиторов трипсина и тромбина в полученном препарате *in vitro* определяли по методам [3, 4]. Использовали трипсин с концентрацией 40 мкг/мл, 14,9 тыс. U/мг (Fluka, Германия) и тромбин с активностью 15 НИИ/мл (Sigma, Германия).

Антикоагулянтные эффекты ЕрI исследовали *in vivo* на крысах-самцах линии Wistar (n=11, m=220-260 г). Крысы содержались в стандартных условиях вивария (t=22⁰C, влажность 70%, длительность светлого/темного времени суток=12 ч/12 ч) при доступе к воде и пище *ad libitum*.

Из крыс были сформированы две группы. Группа 1 служила контролем (n=5), крысам которой внутривенно (в.в.) вводили воду для инъекций, группа 2 была экспериментальной группой (n=6), крысам которой в.в. вводился раствор исследуемого препарата (170 мкг/кг массы тела). Забор крови осуществлялся из боковой хвостовой вены через 2 часа после введения ЕрI, кровь помещалась в пробирки с антикоагулянтом. Для получения плазмы было выполнено центрифугирование при 1000 об/мин в течение 15 мин. Параметры коагуляции

(тромбиновое, протромбиновое, активированное частичное тромбопластиновое время - АЧТВ в секундах) регистрировались на коагулометре Solar (Беларусь).

Статистическая обработка данных осуществлялась в прикладном пакете программ Statistica. Данные в таблице представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения. Сравнение между группами было выполнено методами однофакторного анализа ANOVA.

Результаты работы. В результате двухступенчатой очистки из 50 г муки корневищ *E. purpureae* получено 47 мг препарата ЕrI. Выделенный препарат обладал выраженной ингибиторной активностью в отношении трипсина и тромбина *in vitro*. В опыте 80% активности трипсина подавлялось при концентрации 26 мкг/мл ЕrI. 92% активности тромбина в течение времени проведения теста ингибировалось при концентрации препарата 44 мкг/мл.

Результаты опытов *in vitro*, полученные ранее и в настоящей работе, позволили выдвинуть предположение о возможной антикоагуляционной активности ЕrI *in vivo* в модельных опытах на животных.

В таблице 1 представлены данные показателей коагуляции крови крыс контрольной группы и группы, животным которой внутривенно вводили препарат.

Таблица 1 Показатели коагуляции крови у крыс через 2 часа после внутривенного введения препарата ингибиторов трипсина/тромбина.

Показатель	Среднее значение±стандартное отклонение	
	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (в.в. введение препарата)
Тромбиновое время, с	15,7±5,1	28,4±6,1 *) p=0,002
Протромбиновое время, с	20,7±3,2	22,9±2,8
АЧТВ, с	26,7±3,2	29,8±2,7 *) p=0,03

*) различия статистически достоверны по сравнению с группой 1 при уровне значимости $p < 0,05$.

Из представленных в таблице данных очевидно, что наибольший эффект при внутривенном введении у животных экспериментальной группы ЕrI оказывает на тромбиновое время, статистически значимо увеличивая его на 81% по сравнению с показателем контрольной группы; АЧТВ достоверно увеличивается на 12%. Статистически значимых различий в значениях протромбинового времени у крыс контрольной и экспериментальной групп не обнаружено.

Заключение. Таким образом, по результатам исследований эффектов ЕrI можно заключить, что препарат эффективен в отношении тромбина, что выражается в подавлении активности фермента *in vitro*, а также в удлинении конечного этапа свертывания крови *in vivo*. Антикоагуляционные свойства препарата ЕrI *in vivo* проявляются в дозе 170 мкг/кг при внутривенном введении крысам.

Литература:

1. Sohn, H.Y. Screening of thrombin inhibitors from medical and wild plants / H.Y. Sohn [et al.] // Kor. J. Pharmacogn. – 2004. – Vol. 35, № 1. – P. 52-61.
2. Иванов, О.А. Распространение белков-ингибиторов сериновых протеиназ среди различных видов семейства Compositae / О.А. Иванов, В.И. Домаш // Сб. науч. тр. Ботаника / Ин-т экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси. – Минск, 2009. – Вып. 37. – С. 384-393.

3. Гофман, Ю.Я. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха / Ю.Я. Гофман, И.М. Вайсблай // Прикладная биохимия и микробиология. – 1975. – Т. 11, № 5. – С. 777 – 783.

4. Thompson A.R. High affinity binding of human and bovine thrombin to p-chlorobenzylamido-ε-amino-caproilagarose // Biochem. et Biophys. acta. – 1974. – Vol. 60, №1 - P. 175 – 184.

5. Fishbein, M.C. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution / M.C. Fishbein, D. Maclean, P. R. Maroko // Am. J. Pathol. – 1978. – V.90, № 1. – P. 57-70

ANTICOAGULATING ACTIVITY OF PROTEINASE INHIBITORS FROM *ECHINACEA PURPUREA*

¹Ivanov O.A., ²Krasnenkova T.P., ²Afonin V.U., ¹Domash V.I.

¹*Kuprevitch Institute of Experimental Botany NAS of Belarus*

220141, Minsk, Republic of Belarus, Academicheskaya str., 27, E-mail: heleg-zero@mail.ru;

²*State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus*

A novel trypsin/thrombin inhibitor, named EpI, was purified from the roots of *Echinaceae purpureae* by ammonium sulfate precipitation and gel filtration. Purified preparation inhibited thrombin *in vitro* and possessed anticoagulating activity *in vivo*. Thrombin time significantly increased on 80% after injection of EpI with concentration 170 μg/kg in experimental group of rats. Activated partial thromboplastin time increased on 12%. Thus, EpI, obtained from the roots of *Echinaceae purpureae* exerted anticoagulating effects on model animals.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ФЛАВОНОЛОВ: РОЛЬ РЕАКЦИЙ ПЕРОКСИДАЗНОЙ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

¹Иващенко Н.В., ²Сенчук В.В.

¹*Лицей Белорусского государственного университета;*

²*Белорусско-голландское совместное предприятие «Фармлэнд»*

Флавонолы - фармакологически активные фенольные соединения, обладающие Р-витаминными, ангиопротекторными, антирадикальными свойствами, активно применяемые в качестве лекарственных препаратов и биологически активных добавок [1]. Флавонолы относятся к числу важных пищевых факторов для человека [1]. В основе структурного и функционального разнообразия многочисленных природных флавонолов лежат гидроксипроизводные 2-(фенил)-хромен-4-она [1]. Одним из предполагаемых механизмов реализации функциональных свойств может быть вовлечение флавонолов в качестве субстратов и/или ингибиторов гемопротеинов, катализирующих реакции пероксидазного окисления органических и неорганических соединений [2,3]. Пероксидазные реакции, протекающие в организме человека и животных, являются наиболее вероятным путем биотрансформации флавонолов в направлении деградации и инактивации [2,3]. Среди метаболитов пероксидазной биотрансформации флавонолов обнаруживаются продукты одноэлектронного окисления – феноксильные радикалы. Электронодонорные заместители в ароматическом ядре стабилизируют и дезактивируют, а электроноакцепторные, напротив, активируют феноксильные радикалы. Поэтому в ряде случаев в пероксидазных реакциях

наблюдается активация фенольных соединений через образование реакционноспособных феноксильных радикалов, способных включаться в генерацию активных форм кислорода, в запуск перекисного окисления жирных кислот и холестерина, в формирование поврежденных ДНК [2,3]. В связи с этим, нами предпринято изучение возможной активации в реакциях пероксидазного окисления ряда структурно родственных флавонолов (рис.1): кверцетина (2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-хромен-4-он), морина (2-(2,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-хромен-4-он), рутина (3-рутинозид кверцетина), физетина (5-дезоксикверцетин). В работе также изучены возможные продукты пероксидазной биотрансформации флавонолов - изомерных дигидроксибензолов 1,2-дигидроксибензола (пирокатехина), 1,3-дигидроксибензола (резорцина) и 1,4-дигидроксибензола (гидрохинона); изомерных дигидроксибензойных кислот (2,4-дигидроксибензойная, 2,6-дигидроксибензойная, 3,4-дигидроксибензойная, 3,5-дигидроксибензойная); тригидроксибензолов (флороглюцина и флороглюциновой кислоты).

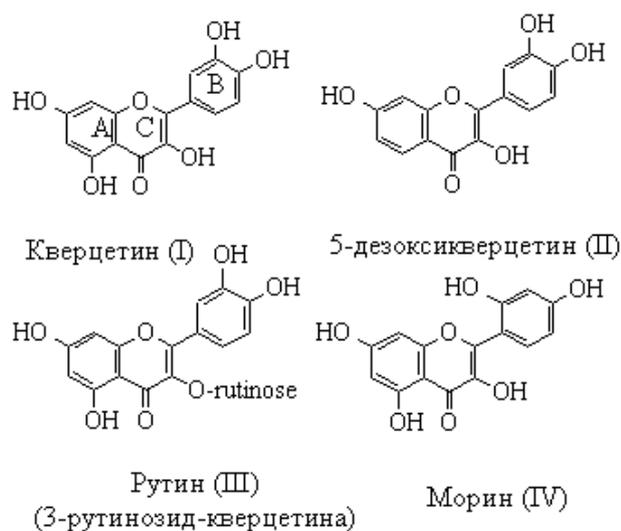


Рис.1. Химическое строение флавонолов.

Целью работы явилось выяснение возможных взаимосвязей между структурой и функцией (активацией и инактивацией) флавонолов и возможных фенольных продуктов пероксидазной биотрансформации флавонолов в реакции пероксидазного окисления.

Методы исследования. Реакции пероксидазного окисления флавонолов при участии тиреоид-пероксидазы человека или пероксидазы из хрена исследовали в среде 0,05 М Na-фосфатного буфера (pH=7,5) методом UV-Vis-спектрофотометрии, как описано ранее [4]. Антиоксидантные свойства флавонолов и дигидроксибензолов изучали в модели Fe-аскорбат-индуцированного перекисного окисления липидов микросом щитовидной железы человека [5].

Результаты. Реакция пероксидазного окисления кверцетина I (но не рутина III или морина IV) начинается с образования нестойкого пурпурного комплекса ($\lambda_{\max}=558$ нм), имеющего, по-видимому, радикальную природу семихинонного типа по кольцу В и/или строение пирилиевого катиона. Для его образования необходимо наличие о-дигидроксибензольного кольца В и свободных ОН-групп в положениях 3 и 7. Короткоживущее пурпурное соединение кверцетина окисляется по катехольному кольцу В до о-хинона с $\lambda_{\max}=509-512$ нм, который легко переходит в CHCl_3 или в диэтиловый эфир. Дальнейшее пероксидазное окисление флавонолов, как показано на схемах рисунка 2, протекает с раскрытием γ -пиронового кольца по C_3-C_4 и $\text{O}-\text{C}_2$, что ведет к образованию серии фенолкарбоновых кислот, среди которых идентифицированы флороглюцинкарбоновая кислота (соединение V, происходит из кольца А кверцетина и морина), изомерные

дигидроксibenзойные продукты превращения кольца В, состав которых различен для морина и кверцетина. Впрочем, флороглюцинкарбоновая кислота вовсе не появляется среди продуктов окисления физетина, тогда как 3,4-дигидроксibenзойная кислота (соединение VI) образуется как при окислении физетина, так и кверцетина. Разрыв γ -пиронового кольца морина ведет к появлению 2,4-дигидроксibenзойной кислоты. Следует заметить, что рутин намного хуже окисляется по пероксидазному механизму, чем другие исследованные флавонолы. При этом схема пероксидазного окисления рутина во-многом похожа на превращение кверцетина.

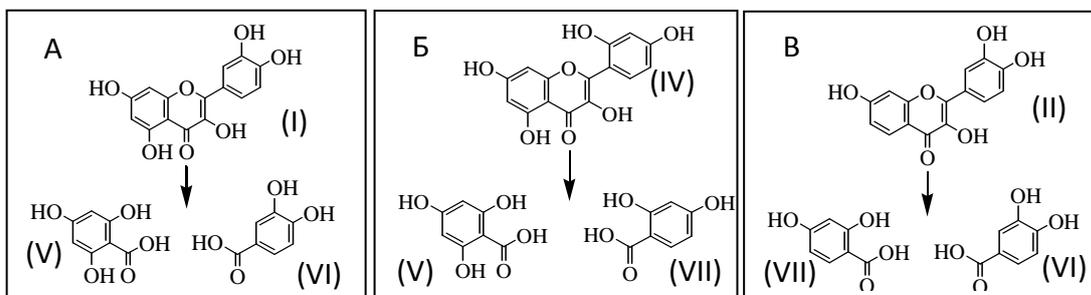


Рис.2. Схема окисления кверцетина (А), морина (Б) и физетина (В) пероксидом водорода при участии пероксидазы из корней хрена или тиреоид-пероксидазы в среде 0,05 М Na-фосфатного буфера (рН=7,5).

Установлено, что антиоксидантная активность флавонолов в модели Fe-аскорбат-индуцированного перекисного окисления липидов микросом щитовидной железы человека эффективно реализуется в концентрациях 0,2-1 мкМ, а гидроксibenзойных кислот – в концентрациях 500-2000 мкМ. В результате реакций пероксидазной биотрансформации флавонолов участии очищенной тиреопероксидазы человека или пероксидазы из хрена происходит не только деградация фенилхромановой структуры, но и ярко выраженное изменение биохимических свойств: антиоксидантная активность продуктов пероксидазного окисления флавонолов после завершения ферментативной реакции уменьшается в несколько тысяч раз по сравнению с исходными флавонолами.

Однако, в случае проведения реакции пероксидазного окисления флавонолов, гидроксibenзолов и гидроксibenзойных кислот при участии тиреопероксидазы микросом щитовидной железы человека наблюдается активирование перекисного окисления липидов микросомальных мембран. Выраженность данного эффекта зависит от строения фенольных соединений:

флавонолы > гидроксibenзолы >>> гидроксibenзойные кислоты;

1,2-дигидроксипроизводные и 3,4-дигидроксипроизводные > 1,4-дигидроксипроизводные, 1,3-дигидроксипроизводные, 2,4-дигидроксипроизводные, 2,6-дигидроксипроизводные, 3,5-дигидроксипроизводные.

Аналогичное явление обнаружено нами ранее при исследовании активации перекисного окисления липидов митохондриальных мембран печени в реакции пероксидазного окисления флавонолов [6].

Установлено, что эффект активирования перекисного окисления липидов микросом щитовидной железы человека непосредственно в ходе пероксидазного окисления изученных флавонолов, гидроксibenзолов и гидроксibenзойных кислот хорошо коррелирует с интенсивностью пероксидазного окисления фенольных соединений.

Такая прооксидантная активность флавонолов в ходе пероксидазного окисления эффективно проявляется в концентрациях 0,1-0,5 мкМ, а при повышении концентрации флавонолов до 2-5 мкМ этот эффект сокращается вплоть до полного исчезновения. Аналогичные результаты получены и для гидроксibenзолов и гидроксibenзойных кислот, но

при гораздо более высоких концентрациях. Основываясь на результатах собственных исследований и данных литературы [1-3], можно предположить активное прооксидантное участие феноксильных радикалов флавонолов, образующихся при пероксидазной биотрансформации по одноэлектронному механизму окисления.

Еще одна принципиальная возможность активации реализуется на примере реакции пероксидазного окисления фенольных соединений по резорциновому кольцу. Инактивация пероксидазы необратима, так как не устраняется после диализа и гель-фильтрации, и не связана с исчерпанием пероксида водорода в реакционной среде. м-Дигидроксибензольная структура окисляемого кольца В создает предпосылки для появления О- и С-центрированных радикалов флавонолов в реакции пероксидазной биотрансформации, что в свою очередь ведет к ковалентной модификации и инактивации пероксидазы, как это было показано ранее при изучении суицидного механизма ингибирования пероксидазы резорцином и его производными [2,3].

Заключение. Получено подтверждение возможности активации флавонолов, индукции перекисного окисления мембранных липидов и инактивации фермента в реакциях пероксидазной биотрансформации, выявлена зависимость эффекта от строения фенольных соединений. Обнаруженное явление может играть важную роль в механизмах биохимической фармакологии фенольных соединений.

Литература:

1. Andersen O.M., Markham K. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, 2005, 1256 p.
2. O'Brien P.J. Peroxidases // Chem. Biol. Interact. 2000. V.129. P. 113.
3. Сенчук В.В., Курченко В.П. Биохимические механизмы пероксидазного окисления ксенобиотиков // Избранные научные труды Белгосуниверситета. 2001. Т. 7. С. 62 – 78.
4. Ледак Е. А., Сенчук В. В. Окисление дигидроксибензолов тиреоид-пероксидазой человека // Вестник Белор. Гос. Ун-та. Серия 2. 2002. № 2. С. 18 – 21.
5. Ледак Е. А., Сенчук В. В. Окисление ряда флавонолов пероксидазой из хрена // Вестник Белор. Гос. Ун-та. Серия 2. 2003. №1. С. 42 – 46.
6. Н.В.Ивашенко, Е.А. Ледак, В.В. Сенчук. Активирование перекисного окисления липидов в реакции пероксидазного окисления флавонолов // Вестник Белор. Гос. Ун-та. Серия 2. 2003. №3, С.13-17.

BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY OF FLAVONOLES: THE ROLE OF PEROXIDASE BIOTRANSFORMATION

¹Ivaschenko N.V., ²Sentchouk V.V.

¹Lyceum Belarussian State University;

²Belarus-holland joint venture «Pharmland»

Antioxidant activity of flavonols and phenolic products of thyroid peroxidase catalyzed oxidation of flavonols was examined. Activation and inactivation of the antioxidant activity of tested compounds as well as suicide enzyme inactivation within the peroxidase oxidation of phenolics depend on their specific structural features. The results confirm the significant role of the reactions of peroxidase biotransformation in biochemical pharmacology of flavonols.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОКОРРЕКТОРОВ В ФОРМЕ ТВЕРДЫХ ЖЕЛАТИНОВЫХ КАПСУЛ

Казючиц О.А., Ильянок Г.А., Климашевич В.Б., Петров П.Т.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 5/3, E-mail: ifb@academpharm.by

Хронический дефицит биологически активных веществ может создавать предпосылки для развития наиболее распространенных заболеваний [1]. Микронутриенты обеспечивают большинство лечебно-профилактических эффектов пищи, их применение является основой первичной профилактики и оздоровления [2].

Биокорректоры применяют перорально, капсульная форма имеет ряд преимуществ перед таблетированной по показателям растворение, биодоступность и технологичность.

Решение технологических задач создания биокорректоров на основе натуральных микронутриентов в форме твердых желатиновых капсул, включая технологические приемы получения капсульной массы, требуют учета особенностей химической природы и физических свойств активных компонентов и адекватного подбора вспомогательных веществ.

При разработке технологии получения препаратов на основе растительного сырья валерианы, мелиссы, мяты и зверобоя было установлено, что капсульная масса на основе тонкоизмельченных растительных компонентов характеризуется слабой сыпучестью/текучестью [3]. Вследствие этого была использована технология влажного гранулирования с последующим опудриванием лубрикантом (магния стеарат в конечной концентрации 1%) с целью уменьшения трения при фасовке гранулята в капсулы. Для предотвращения инактивации действующих компонентов растительного сырья – валепотриатов, флавоноидов и гидроксикоричных кислот - сушку гранулята вели при температуре не выше 40° С до значения влагосодержания 5%.

Указанные технологические приемы были использованы при разработке технологии производства лекарственного средства «Рациум», обладающего седативным действием, а также биокорректора «Ментум» (ТУ ВУ 500043647.003-2010), способствующего нормализации сна и улучшающего переносимость повышенных умственных нагрузок и эмоционального стресса.

Влажное гранулирование с последующим опудриванием лубрикантом оказалось эффективным при создании пероральных форм препаратов на основе высокоочищенных аминокислот, их производных, метаболитов природного происхождения и других биологически активных соединений. Для увеличения скорости выхода активных веществ из гранул капсульной массы нами были использованы супердизинтегранты (кроскармеллоза, прежелатинизированный крахмал, кросповидон) в концентрации 2-5%.

При разработке витаминно-минеральных комплексов Унивит в форме твердых желатиновых капсул влажное гранулирование было исключено из технологии вследствие инактивации витаминов в присутствии макро- и микроэлементов. Для обеспечения высокого показателя сыпучести/текучести (значение угла откоса в пределах 31-35 градусов согласно

классификации Карра) [3] в состав витаминно-минеральной смеси для фасовки в капсулы были введены наполнители (лактоза, крахмал в современных перспективных модификациях).

Созданные с применением описанной технологии поливитаминно-минеральные комплексы «Унивит» (ТУ ВУ 500043647.001-2009) и «Унивит минерал» (ТУ ВУ 500043647.002-2010), предназначенные для восполнения дефицита витаминов и минералов, а также как общеукрепляющие средства, в установленном порядке зарегистрированы, их промышленное производство освоено на Государственном предприятии «Академфарм».

Ряд жирорастворимых активных компонентов, подверженных деградации при контакте с кислородом окружающей среды, изготавливается в виде микрокапсул, покрытых оболочкой. Такая форма обеспечивает равномерную диспергируемость субстанции в водных растворах. Субстанция не окисляется в процессе производства готовой формы и обладает необходимой для процесса автоматического инкапсулирования сыпучестью/текучестью. Концентрация в ней активного вещества (ликопина) не превышает 10%, что дает определенные технологические преимущества, учитывая, что содержание субстанции в одной дозированной единице составляет 7-8 мг.

Технологические приемы работы с такой субстанцией (в данном частном случае с ликопином) весьма специфичны. Применить в этом случае влажное гранулирование невозможно из-за неизбежного повреждения структуры микрокапсул. При получении сухой капсульной смеси с включением таких микрокапсул и вспомогательных веществ не достигается равномерность дозирования субстанции вследствие активного расслаивания ингредиентов сухих смесей.

Поэтапное гранулирование вспомогательных веществ, а также отбор фракций, гранулометрический состав которых соответствовал бы гранулометрическому составу микрокапсул ликопинсодержащей субстанции, не позволили преодолеть расслаивание капсульной массы. Потребовались новые подходы к решению проблемы неравномерности дозирования ликопина. Успешным оказался технологический прием сухого гранулирования, включающий предварительное брикетирование (уплотнение) смеси субстанции со вспомогательными веществами, последующее измельчение и просеивание капсульной массы. В качестве вспомогательных веществ использовали наполнители (лактоза безводная и крахмал кукурузный), связующее (микрористаллическая целлюлоза) и лубриканты (магния стеарат и коллоидный диоксид кремния).

По описанной технологии был получен биокорректор «Томатогенин» (ТУ ВУ 500043647.005-2010). Данный препарат оказывает протекторное действие на клетки различной функциональной специализации, уменьшает отрицательное влияние неблагоприятных факторов внешней среды, повышает сопротивляемость организма к инфекциям, снижает риск возникновения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

Таким образом, разработанные в Химико-фармацевтическом центре ИФБ НАН Беларуси рецептуры и технологии позволили получить ряд фармацевтических продуктов, качественные характеристики которых соответствуют международным фармакопейным требованиям [4] и актуальны для фармацевтического производства страны.

Литература:

1. ВОЗ. Питание и профилактика хронических заболеваний. Отчет совместной группы консультантов ВОЗ и ВСО. Технический отчет ВОЗ № 916, 2002.
2. Питание и здоровье в Европе: новая основа для действий: [перевод] / под ред. А. Robertson. – М.: «Издательство «Весь мир», 2005. – 505 с.
3. Государственная фармакопея Республики Беларусь в 3 т. Т. 2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья /УП «Центр экспертиз и

испытаний в здравоохранении»; под ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Типография «Победа», 2006. – С.33-37.

4. Государственная фармакопея Республики Беларусь в 3 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под ред. Г. В. Годовальникова. – Молодечно: Типография «Победа», 2009. – С. 608-609.

TECHNOLOGICAL APPROACHES IN THE DEVELOPMENT OF HARD SHELL GELATIN CAPSULE DOSAGE FORMS OF BIOCORRECTORS

Kazyuchits O.A., Il'yanok G.A., Klimashevich V.B., Petrov P.T.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 5/3, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Technological approaches of mixing, dry and wet granulation of the active and auxiliary raw materials have been successfully applied in the development of hard shell gelatin capsule dosage forms of biocorrectors on the basis of active substances of different chemical nature and physical properties. Formulations and technologies of excipients providing pharmaceutical quality of products have been developed.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ КАННАБИНОИДНЫХ СВ1- И СВ2-РЕЦЕПТОРОВ ГРУППЫ «АМИНОАЛКИЛИНДОЛОВ» В РАСТИТЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ.

¹Каплин А.В., ¹Винарский В.А., ¹Юрченко Р.А., ²Поляков Ю.С., ¹Лещев С.М., ¹Шевчук Т.А.

¹*Белорусский государственный университет, Химический факультет, 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14, E-mail: chem@bsu.by;*

²*Государственный таможенный комитет Республики Беларусь, Центральная таможенная лаборатория, 220007, г. Минск, ул. Могилевская, 45/1, E-mail: poliakovis@customs.gov.by*

С момента открытия в 1964 г. активного действующего вещества марихуаны Δ^9 -тетрагидроканнабинола (Δ^9 -ТГК) продолжают попытки получения соединения обладающего всем спектром уникальных терапевтических свойств Δ^9 -ТГК, но не проявляющих выраженной психотропной активности. Работы в данной области получили мощный толчок после открытия в 1988 г. эндогенных рецепторов, на которые воздействует Δ^9 -ТГК. Данный тип рецепторов получил название каннабиноидных СВ1- и СВ2-рецепторов [1]. При этом было установлено, что СВ1-рецепторы сосредоточены преимущественно в головном и спинном мозге, отвечают за психотропные свойства Δ^9 -ТГК. СВ2-рецепторы, сосредоточены в периферической нервной системе и лимфатических узлах, отвечают за терапевтическое воздействие Δ^9 -ТГК. С этого момента магистральным направлением работ в данной области стало получение селективных антагонистов СВ2-рецепторов, обладающих низкой активностью по отношению к СВ1-рецепторам.

Работы в данной области активно ведутся во многих лабораториях в мире. Одной из наиболее продуктивных является деятельность лаборатории кафедры химии Клемсонского

университета штата Южная Каролина, США под руководством Джона Хаффмана. В ходе поиска более простых аналогов хорошо известного агониста СВ1-рецепторов WIN 55,212-2, но проявляющих селективное сродство к СВ2-рецепторам, было синтезировано более 400 соединений класса аминокалиндролов, получивших обозначение JWH (инициалы руководителя лаборатории John W. Huffman) [2]. В ходе исследований были получены селективные агонисты СВ2-рецепторов, обладающие всем спектром терапевтических свойств Δ^9 -ТГК и не проявляющие психотропной активности, такие как JWH-015 и JWH-133. В настоящее время проводятся активные исследования с целью использования данных соединений в качестве фармацевтических препаратов. В то же время другие соединения группы «аминокалиндролов», не подходящие для использования в медицинских целях вследствие высокой психотропной активности, получили широкое распространение в качестве активных действующих веществ (АДВ) курительных смесей («спайсов») предлагаемых на легальном и нелегальном рынке в качестве законной альтернативы марихуаны.

Вследствие широкого распространения потребление «спайсов» в молодежной среде и близости структуры и свойств их АДВ к структуре и свойствам перспективных для терапевтического использования соединений группы «аминокалиндролов», нами была проведена работа по разработке рекомендаций к проведению анализа соединений данной группы. В качестве модельных систем нами были использованы растительные смеси, задержанные Минской центральной таможней в ходе плановых рентгеновских исследований почтовых отправлений.

В результате исследования было выявлено содержание в ряде предоставленных образцов соединений группы аминокалиндролов, а именно JWH-018, JWH-081, JWH-250. Анализ проводился методом газовой хроматографии совмещенной с масс-спектрометрией, с жидкостной экстракционной пробоподготовкой.

Была проведена оптимизация условий газо-хроматографического анализа, с целью максимально полного отделения хроматографических пиков определяемых веществ от примесных и маскирующих компонентов. Наиболее оптимальными оказались следующие условия: капиллярная колонка «HP-5MS» (5%-ный дифенил, 95%-ный диметилполисилоксан, 25 м x 0.2 мм x 0,33 мкм), давление газа носителя - 68,9 кПа, начальная температура термостата колонки – 60°C (выдержка 3 мин), подъем температуры со скоростью 10°C/мин до 200°C, подъем температуры со скоростью 15°C/мин до 300°C (выдержка 30 мин).

Было исследовано влияние условий пробоподготовки образцов на чувствительность и точность анализа с целью выявления наиболее эффективного экстрагента и оптимальной процедуры пробоподготовки. Установлено, что степень извлечения определяемых веществ из растительной матрицы выше для неполярных или слабо полярных растворителей.

Экстрагент	Степень извлечения, %	Экстрагент	Степень извлечения, %
Ацетонитрил	27±3	Ацетон	55±4
Метанол	41±3	Гептан	59±2
Хлороформ	45±5	Октан	79±3
Толуол	44±3	Диэтиловый эфир	90±1
Этанол	50±2	Гексан	93±2

Однако при этом полярные растворители извлекают меньшее количество примесей, что облегчает процесс анализа. В то же время использование неполярных растворителей позволяет получить более полное представление о составе пробы, вследствие извлечения большого количества минорных компонентов.

Установлено, что наиболее полное извлечение веществ достигается при соотношении массы растительной смеси к объему растворителя как 1:50, с последующим энергичным встряхиванием в течение 15 минут или обработкой ультразвуком в течение 5 минут.

Установлено, что при использовании для отделения растительной матрицы от экстракта процедуры фильтрования через бумажный или тефлоновый фильтры, определяемые концентрации анализируемых веществ уменьшаются на 25-30%. Поэтому для отделения растительной матрицы рекомендуется использовать центрифугирование при скорости 3500-4000/мин. в течение 5 минут.

Литература:

1. Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. // Mol Pharmacol. 1988 Nov;34(5):605-13.
2. Huffman, J. W.; Szklennik, P. V.; Almond, A.; Bushell, K.; Selley, D. E.; He, H.; Cassidy, M. P.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 4110-4113.

THE “AMINOALKYLINDOLE” GROUP SYNTHETIC AGONISTS OF CANNABINOID CB1- AND CB2-RECEPTORS DETERMINATION IN HERB MIXTURES.

Kaplin A.V., Vinarsky V.A., Yurchenko R.A., Poliakov I.S., Leschev S.M., Chevtchouk T.A.

Determination of synthetic agonists of cannabinoid CB1- and CB2-receptors of “aminoalkylindole” group in herb mixtures is considered in details. Optimized conditions that make possible to carry out the GC-MS determination of JWH-018, JWH-081 and JWH-250 without false-negative results are suggested. Degrees of extraction of JWH-018 and JWH-250 from herb matrix with different solvents are calculated.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ L-АРГИНИНА И L-ГЛУТАМИНА С ЯНТАРНОЙ КИСЛОТОЙ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНЫЕ РЕАКЦИИ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Караедова Л.М., Бородинский А.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by

Проблема медикаментозного лечения и профилактики повреждений печени алкогольной этиологии до настоящего времени остается практически нерешенной. Особенно актуальным является поиск малотоксичных средств метаболического действия для коррекции патологии печени среди природных биологически активных соединений. Из литературы известно, что глутамин снижает суточное потребление этанола в случае его

орального применения [1]. Результаты исследований, свидетельствующие об антиоксидантных, гепатопротекторных свойствах, эндокринном действии аргинина, позволяют считать использование L-аргинина перспективным для коррекции патологических изменений, вызванных приемом алкоголя [2]. Имеются сообщения об использовании соли глутаминовой кислоты и L-аргинина в качестве гепатопротекторного средства при заболевании гепатобилиарной и сердечно-сосудистой систем, в комплексном лечении токсических гепатитов [3]. Все вышесказанное послужило предпосылкой для использования этих аминокислот, как биокорректоров у животных с алкогольной интоксикацией. Изучение фармакокинетики этанола показало, что глутамин, α -кетоглутарат и сукцинат ускоряют элиминацию этанола из организма крыс [4].

Таким образом указанные предпосылки позволили использовать сочетание аминокислот - глутамин и аргинин с субстратом ЦТК - сукцинатом, для коррекции метаболических нарушений, вызванных форсированной алкогольной интоксикацией.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния композиции вышеуказанных аминокислот с янтарной кислотой на дегидрогеназные реакции цикла трикарбоновых кислот печени крыс, подвергнутых острой алкогольной интоксикации различной степени тяжести.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г. Животные содержались на сбалансированном рационе вивария со свободным доступом к воде. Накануне опыта их лишали пищи. Животные были разделены на 7 групп. Крыс подвергали принудительной алкоголизации с использованием метода интрагастральных интубаций за один час до декапитации. Первая опытная группа получала алкоголь в дозе 1 г/кг массы, вторая - 2,5 г/кг массы, третья - 5 г/кг массы. Половине животных всех опытных групп на фоне различных доз алкоголя вводили комбинацию L-аргинина (500 мг/кг), L-глутамин (500 мг/кг) и янтарной кислоты (50 мг/кг). Контрольные животные подвергались тем же манипуляциям, вместо исследуемых препаратов им вводили воду.

В митохондриальной фракции гепатоцитов определяли активность энзимов: тестировали дегидрогеназы пирувата (ПДГ), 2-оксоглутарата (2-ОГДГ, α -КГДГ), сукцината (СДГ) феррицианидным методом. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) регистрировали по образованию восстановленных форм никотинамидных коферментов. Количественное определение белка осуществляли по методу Лоури. Активность ферментов выражали в нмоль субстрата на мг белка в минуту. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Острая алкогольная интоксикация по-разному влияла на изменение изученных показателей в зависимости от дозы (табл. 1). Дегидрогеназа пирувата снижена у животных с наименьшей дозой алкоголя. С возрастанием дозы алкоголя (1-5 г/кг) происходит увеличение активности этого энзима. Наибольшая активность НАДФ-зависимой дегидрогеназы изоцитрата выявлена у животных с наименьшей дозой алкоголя (1г/кг) и в последующем снижается до уровня контрольных величин. Алкоголь усиливал окислительное превращение 2-оксоглутарата уже в небольшой дозе, с сохранением повышенной активности у животных с максимальной нагрузкой этанолом, что согласуется с ранее полученными результатами при кратковременном и длительном курсовом введении алкоголя. Активность сукцинатдегидрогеназы в первой опытной группе увеличена по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1.

Активность дегидрогеназ печени крыс с острой алкогольной интоксикацией различной степени тяжести, получавших комбинацию аминокислот с янтарной кислотой.

	Контроль	Алкоголь 1 г/кг	Алкоголь 2,5 г/кг	Алкоголь 5 г/кг
--	----------	-----------------	-------------------	-----------------

		Алкоголь	Алкоголь + препарат	Алкоголь	Алкоголь + препарат	Алкоголь	Алкоголь + препарат
ПДГ	12,33± 1,39	5,34 *±1,1	3,42 [▲] ±0,62	7,26 ±0,54	5,99± 0,83	9,36 ±1,18	4,6 [▲] ± 0,35
НАДФ-ИДГ	53± 4,87	93 *± 5,9	50 [▲] ± 3,46	58± 6,6	51± 4,8	56± 4,12	38 [▲] ± 3,3
αКГДГ	28,55 ±2,62	37,09 * ±4,25	29,32 ±1,66	30,87 ±2,86	24,45 ±2,8	36,47 ±3,65	16,74 [▲] ±1,2
СДГ	8,53 ±1,14	12,37 ±0,98	11,35 ±0,62	10,1 ±2,11	7,29 ±0,88	9,88 ±1,01	5,3 [▲] ±0,74

Примечание: * - достоверно по отношению к контрольной группе

[▲] - достоверно по отношению к соответствующей опытной группе

Препарат, введенный экспериментальным животным, вызывал значительные изменения исследованных показателей. Комбинация аминокислот с янтарной кислотой на фоне введения алкоголя в малой дозе (1 г/кг) вызывала снижение активности НАДФ(Ф)-зависимых дегидрогеназ: пирувата, изоцитрата, 2-оксоглутарата. Выраженный эффект аргинина на уровень цитрата (контроль - 185±34, опыт - 297±17, p<0,02, н/моль/г ткани) позволяет трактовать некоторое снижение активности ПДГ после нагрузки алкоголизированных животных препаратом, в состав которого входит аргинин, как результат влияния цитрата, поскольку известно, что цитрат ингибирует ПДГ.

У животных получавших препарат на фоне высокой дозой алкоголя (5 г/кг) отмечена тенденция к снижению, либо снижение активности ферментов относительно алкоголизированных животных, хотя степень выраженности этого эффекта у разных энзимов различна (44%-67%). Анализируя приведенные данные следует отметить влияние композиции на СДГ - зарегистрировано снижение либо тенденция к снижению активности дегидрогеназы янтарной кислоты по отношению ко всем опытным группам. Через какие механизмы происходят эти изменения пока сказать затруднительно, поскольку компонентами композиции являются L-аргинин и L-глутамин и сукцинат. Сукцинат, как известно, активирует СДГ. Вероятнее всего имеет место превалирование влияния аргинина на дегидрогеназу янтарной кислоты. Как нами показано ранее [5] введение аргинина нормальным животным уже через один час вызывает ингибирование СДГ. Инициация аргинином L-аргинин-NO-системы вызывает повышение уровня NO, который селективно ингибирует Fe-S-содержащие ферменты цепи тканевого дыхания на уровне I и II комплексов [6]. Выраженный ингибиторный эффект аргинина на СДГ, выявленный у нормальных животных [5, 6], позволяет предположить такой же механизм (через NO) действия его на СДГ у животных с острой алкогольной интоксикацией получавших комбинацию L-аргинина и L-глутамин с янтарной кислотой.

Заключение. Анализируя приведенные результаты в целом необходимо отметить, что исследованный комплексный препарат вызывает нормализацию начальных реакций ЦТК т.е. происходит превращение субстрата по полной схеме цикла, под действием препарата включаются наиболее медленные этапы ЦТК, что приводит к активации процесса энергообеспечения в результате окисления интермедиатов ЦТК. Следует отметить, что препарат, содержащий комбинацию аминокислот с янтарной кислотой, оказывал наибольший эффект у животных, получавших небольшую и среднюю дозу алкоголя (1-2,5 г/кг).

Литература:

1. Астроўскі Ю.М. Магчымыя механізмы уплыву глутаміну на дабраахвотнае спажыванне этанолу у пацукоў. / Ю.М. Астроўскі [і інш.] // Весці АН БССР, сер. Біял. Навук, - 1979, - №2, - С. 81-83.
2. Böger R.H. The clinical pharmacology of L-arginine / R.H. Böger, S.M. Bode - Böger // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2001, - V. 41, - P. 79-99.
3. Апыхтина Е.Л. Перспективы применения препарата глутаргин при свинцовой интоксикации / Е.Л. Апыхтина [и др.] // Лекарственные средства и биологически активные соединения: материалы междунар. научн. конф., - Гродно, - 2007, - С. 4-6.
4. Пронько П.С. Влияние α -кетоглутарата, сукцината, аспарата и глутаминна на метаболізм і токсичнасць этанолу у крыс / П.С. Пронько [и др.] // Лекарственные средства и биологически активные соединения: материалы междунар. научн. конф., - Гродно, - 2007, - С. 133-134.
5. Караедова Л.М. Влияние предшественника монооксида азота - L-аргинина и блокаторов NO-эргической системы на активность дегидрогеназ ЦТК и сопряженные с ним реакции / Л.М. Караедова [и др.] // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии: матер. между. симп. В II ч. - Гродно. - 2006, ч. I - С. 98-104.
6. Жумабаева Т.Т. Ингибирование железосерных ферментов митохондрий печени оксидом азота. / Жумабаева Т.Т., Байдер Л.М., Куроптева З.В. // Роль нейромедиаторов в процессах жизнедеятельности. - Минск, - 1999. - С. 151-153

**EFFECT OF L-ARGININE, GLUTAMINE AND SUCCINIC ACID COMPOSITION
ON DEHYDROGENASE REACTIONS UNDER ACUTE ALCOHOL
INTOXICATION**

Karayedova L.M., Borodinsky A.N.

*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and
Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno,
Republic of Belarus,*

CTA dehydrogenases were studied under acute alcohol intoxication of varying severity. The composition of L-arginine and L-glutamine with succinic acid exerted different effects depending on the degree of severity of acute alcohol intoxication.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК
БИФИДОБАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИЙ
ПРОИЗВОДСТВА БИОДОБАВОК ПРОБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

¹Киселева Е.П., ¹Михайлопуло К.И., ²Ижик А.В., ²Сидоренко А.В., ²Новик Г.И.

¹ ГНУ "Институт биоорганической химии НАН Беларуси", 220141, г. Минск, Беларусь,
ул. Академика Купревича, д. 5, корп. 2, E-mail: epkiseleva@yandex.ru;

² ГНУ "Институт микробиологии НАН Беларуси", 220141, г. Минск, Беларусь, ул.
Академика Купревича, д. 2, E-mail: galina_novik@inmi.by

В соответствии с формулировкой, принятой Всемирной организацией здравоохранения [1], пробиотиками являются живые микроорганизмы, способные при использовании в адекватных дозах оказывать положительные эффекты на здоровье человека. Максимальный практический интерес вызывают бифидобактерии, являющиеся наиболее изученными

представителями симбионтной микрофлоры человека и традиционно используемые в технологиях производства продуктов питания и фармпрепаратов пробиотического действия [2]. Актуальной задачей является разработка точных, воспроизводимых, простых и быстрых в исполнении методов количественного определения клеток этих бактерий в культуральных средах, основанных на использовании высокоспецифичных антител к бактериальным антигенам [3]. Цель работы – разработка тест-системы для количественного определения клеток бифидобактерий в культуральных средах и других растворах методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Методы.

Бактерии. Использовали культуры третьей генерации *Bifidobacterium bifidum* 791, *B. longum* В379М, *B. adolescentis* 94 В1М, *Lactobacillus plantarum* В-01 и *Bacillus cereus* В-491 из научной коллекции типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Бесклеточные фракции (БФ) получали в результате обработки промытых клеток ультразвуком [4].

Иммунизацию шестимесячных самцов-кроликов осуществляли на 1, 14, 28, 60-й дни с начала процедуры. Содержимое каждой ампулы с клетками *B. bifidum* 791 (20 мг сухого вещества), лиофилизированными в условиях, обеспечивающих потерю клетками жизнеспособности, суспендировали в 1 мл стерильного 0,15 М NaCl. 0,1 мл суспензии смешивали с 2 мл полного адьюванта Фрейнда и вводили животным подкожно в область лопаток. Отбор крови осуществляли на 40, 72, 100-й день. Сыворотку хранили при -70 °С.

Уравнивание лиофилизированных клеток бактерий для ИФА. Содержимое каждой ампулы с лиофилизированными клетками *B. bifidum* 791, *L. plantarum* В-01 и *B. cereus* В-491 суспендировали в 500 мкл H₂O. Суспензию клеток каждого штамма вносили по 50, 100, 200 мкл в три пробирки, добавляли H₂O до 200 мкл и 3 мл 30 % серной кислоты. Выдерживали 1 ч. Определяли D_{260} . Для каждого штамма графически определяли объем исходной суспензии в анализируемом образце, соответствующий значению D_{260} , равному 1. Рассчитывали соотношение указанных показателей для трех штаммов. В дальнейшем содержимое ампул с лиофилизированными клетками каждого штамма суспендировали в 1 мл буфера 1, отбирали необходимое количество каждой суспензии в соответствии с рассчитанной пропорцией, и доводили тем же буфером до равных объемов для использования в ИФА.

ИФА. Для определения рабочего титра поликлональных антител (ПАТ) использовали планшеты “Greiner bio-one” (Germany) с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791. Содержимое одной ампулы суспендировали в 2 мл 0,02 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,2 М NaCl (буфер 1), разводили тем же буфером в 250 раз и вносили по 100 мкл в лунки планшетов. Иммобилизацию проводили в течение ночи при 4 °С. Инкубировали иммобилизованные клетки со специфическими сыворотками кроликов, предварительно разведенными в 1/2000 – 1/360000 раз в течение 2 ч при (18-25) °С. Иммуноглобулины (Ig) на твердой фазе выявляли с использованием антител барана против Ig кролика, меченых пероксидазой из корней хрена (ПХ) “Biozyme” (UK) [5]. После проведения и остановки ферментативной реакции ПХ [4] определяли D_{450} в лунках с использованием многоканального спектрофотометра “Униплан” (Россия).

Для количественного определения бактерий в культуральных средах в соответствующие серии пробирок вносили по 0,06 мл гомогенной суспензии клеток *B. bifidum* 791 (серия 1) с известными концентрациями в диапазоне 10^{10} – 10^4 клеток/мл. Суспензии получали в результате последовательного разведения культуральной средой культуры указанных микроорганизмов с известной концентрацией клеток, установленной с использованием камеры Горяева. В качестве контроля использовали пробирку, содержащую 0,06 мл культуральной среды. В каждую пробирку добавляли 0,24 мл предварительно разведенной специфической сыворотки кролика. Титр ПАТ в конечном объеме пробы составлял 1/180000. Инкубировали 1,5 ч при 37 °С. Добавляли в каждую пробирку 0,05 мл 50

% суспензии Sephadex G-25 fine "Pharmacia" (Швеция) и центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин на центрифуге ОПн-3 (СССР). В 2 лунки планшетов с иммобилизованными клетками (или БФ) *B. bifidum* 791 вносили по 0,1 мл надосадочной жидкости из каждой пробирки и инкубировали 1,5 ч при 37 °С. Завершали ИФА как указано выше.

Результаты. В результате иммунизации кроликов целыми клетками *B. bifidum* 791 получены образцы сыворотки крови двух животных, содержащие ПАТ к антигенам указанных микроорганизмов. Титр ПАТ определяли ИФА, используя планшеты с клетками *B. bifidum* 791, иммобилизованными пассивной адсорбцией. После инкубации иммобилизованных клеток со специфическими сыворотками кроликов, предварительно разведенными в определенное число раз, выявляли Ig на твердой фазе с использованием антител барана против Ig кролика, меченых ферментом. Рабочим титром ПАТ считали разведение сыворотки, обеспечивающее в ИФА значение D_{450} , равное 1,5. Установлено, что рабочие титры ПАТ от двух животных составляют 1/180000 и 1/80000.

Для определения перекрестной реакции ПАТ к *B. bifidum* 791 использовали клетки других грам-положительных бактерий - *L. plantarum* В-01 и *B. cereus* В-491. ПАТ инкубировали с суспензиями, содержащими равные количества клеток специфических или потенциально перекрестно-реагирующих бактерий в виде ряда концентраций (B_1 - B_n). Контрольная проба не содержала антигена в растворе (B_0). Отделяли клетки центрифугированием и вносили каждую пробу в соответствующие лунки планшетов с иммобилизованными клетками специфических бактерий. Графически определяли концентрации специфического и перекрестно-реагирующего антигенов, соответствующие значениям B/B_0 , равным 50%. Соотношение этих концентраций, рассчитанное в процентах, являлось показателем перекрестной реакции антител. Установлено, что перекрестная реакция ПАТ, специфичных к *B. bifidum* 791, в реакциях с антигенами других грамм-положительных бактерий составляла менее 1%.

Оказалось, что ПАТ в равной степени взаимодействуют с клетками *B. bifidum* 791 и двух других родственных штаммов (*B. longum* В379М и *B. adolescentis* 94 ВИМ), используемыми в равных концентрациях. Таким образом, в составе ПАТ доминируют Ig, выработанные к родоспецифичным антигенам бифидобактерий. Это является необходимым условием использования ПАТ к антигенам *B. bifidum* 791 в качестве компонентов тест-системы для количественного определения клеток бифидобактерий в культуральных средах (или других растворах на водной основе) методом ИФА.

В такой тест-системе в ходе 1-ой стадии анализа происходит взаимодействие ПАТ с клетками бактерий (в составе калибровочных проб (C_1 – C_n) и анализируемых образцов). В качестве контроля используется проба (C_0), не содержащая клеток бактерий. Разделение ПАТ, свободных и связавшихся с клетками, достигается в результате осаждения последних центрифугированием. Для визуализации осадка используется Sephadex G-25 fine "Pharmacia" (Швеция) или другой хроматографический сорбент, не способный адсорбировать Ig. Далее свободные ПАТ, находящиеся в составе надосадочной жидкости каждой из пробирок, переносятся в соответствующие лунки планшетов для ИФА, содержащие равные количества иммобилизованных антигенов тестируемых микроорганизмов. На 2-ой стадии анализа на твердой фазе происходит образование иммунных комплексов. Для их выявления на 3-ей стадии анализа используют конъюгат "антитела барана против Ig кролика – ПХ". Количество окрашенного продукта ферментативной реакции ПХ прямо пропорционально концентрации свободных ПАТ, находящихся в составе надосадочной жидкости, и обратно пропорционально количеству клеток, находящихся в составе анализируемых образцов и калибровочных проб на первой стадии анализа. Показано, что диапазон достоверно определяемых концентраций бактерий составляет 10^5 - 10^9 клеток/мл. В соответствии с пожеланиями потребителя он может быть смещен в область более низких или высоких концентраций посредством изменения количеств бактериальных антигенов,

иммобилизованных на твердой фазе, и концентраций ПАТ на 1-ой стадии ИФА. Кроме того, в разработанной нами тест-системе антигены бифидобактерий, иммобилизованные на твердой фазе, могут быть представлены как целыми клетками *B. bifidum* 791, так и БФ. Коэффициент корреляции результатов анализа в двух модификациях тест-системы равен 0,91.

Заключение. Получены поликлональные сыворотки (ПАТ) кроликов, иммунизированных целыми клетками *B. bifidum* 791. По результатам ИФА, ПАТ имеют высокий титр (1/80000 – 1/180000), взаимодействуют с родоспецифичными антигенами бифидобактерий и не проявляют перекрестной реакции к антигенам других грамм-положительных бактерий. На основе ПАТ разработана тест-система для количественного определения клеток бифидобактерий в культуральных средах (или других растворах) методом ИФА, предназначенная к использованию в технологиях производства продуктов питания и фармакологических препаратов пробиотического действия.

Литература:

1. Corcionivoschi N., Drinceanu D., Steff L. et al. Probiotics – identification and ways of action // Innovative Romanian Food Biotechnology, 2010, Vol. 6, P. 1-11.
2. Oelschlaeger T.A. Mechanisms of probiotic action – A review // International Journal of Medical Microbiology, 2010, Vol. 300, P. 57-62.
3. Amrouche T., Boutin Y., Moroni O. et al. Production and characterization of anti-bifidobacteria monoclonal antibodies and their application in the development of an immunoculture detection method // J. Microbiol. Methods, 2006, Vol. 65 (1), P. 159-170.
4. Киселева Е.П., Цыганова О.В., Михайлопуло К.И. и др. Возможная роль пробиотических микроорганизмов рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 12, N 1– 2, С. 71 – 80.
5. Wilson M.B. and Nakane P.K. // Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Knapp W., Kalubar K., and Wick G., Eds., Amsterdam: Elsevier. North Holland, 1978, p. 215.

ELISA TEST KIT FOR DETERMINATION OF CONCENTRATIONS OF THE CELLS OF BIFIDOBACTERIUM IN CULTURE MEDIA INTENDED FOR TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF PROBIOTIC DRUGS

¹Kiseleva E.P., ¹Mikhailopulo K.I., ²Izhik A.V., ²Sidarenka A.V., ²Novik G.I.

¹The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;

²The Institute of Microbiology NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Rabbit polyclonal antibodies (PAb) were obtained by immunization with the whole cells of *Bifidobacterium bifidum* 791. The PAb have a high titre (1/80000 - 1/180000) in ELISA, interact with genus-specific antigens of bifidobacteria and show no cross-reaction to the antigens of other gram-positive bacteria. These PAb were used for elaboration of the competitive ELISA test kit for determination of concentrations of whole cells of in culture media and other water solutions. The field of use of the ELISA test kit is technology of production of probiotic drugs.

СИНТЕЗ АЦЕТИЛХОЛИНА В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ ЛИХОРАДКЕ. ВЛИЯНИЕ ГАМК

Кондрашова С.Б., Кохан С.Б., Лаврентьев В.П.

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28,

Реакция повышения температуры тела при различных инфекционных болезнях, действии патогенных раздражителей и накоплении продуктов распада тканей, называемая лихорадочной реакцией, возникает в результате временной перестройки регуляции теплообмена. Причиной этого является стимуляция пирогенами центральных механизмов физиологического термостата. Влияния таких механизмов на перестройку работы организма в напряженной ситуации, вызываемой развитием лихорадки, реализуются через нейромедиаторы и роль их, несомненно, неравнозначна [3]. В предлагаемых моделях участия ацетилхолина (АХ) в функционировании центров терморегуляции показано, что именно холинергические нейроны выполняют интегративную роль в гипоталамических механизмах, контролирующих процессы поддержания температуры тела на определенном уровне [5].

В последние годы появился ряд сообщений, которые касаются вопроса участия компонентов белков в регуляции активности центров терморегуляции в различных ситуациях, включая лихорадочные состояния [1]. Аминокислоты тормозящего действия, в частности ГАМК, обладают непостоянством эффекта: при введении в желудочки мозга она может приводить как к повышению, так и к понижению температуры тела, и зависит это от дозы. Допускается возможность того, что ГАМК в гипоталамусе действует через “непирогенный” механизм и ослабляет влияние веществ, которые ингибируют компенсаторные реакции регуляции теплоотдачи при лихорадке. В то же время, ГАМК в гипоталамусе взаимодействует с другими транзиттерными системами и вместе с АХ участвует в общем конечном пути для теплопродукции. Однако проблема участия аминокислот в центральных механизмах терморегуляции и их взаимодействие с другими нейромедиаторами остается одной из малоизученных. Поэтому, задачей настоящей работы было исследовать влияние ГАМК на активность холинацетилтрансферазы (ХАТ) в гипоталамусе крыс при экспериментальной лихорадке, вызванной введением животным пирогенала.

Материалы и методы исследования. В опытах использовали крыс-самцов линии Вистар массой 180 – 200 г. Животным измеряли ректальную температуру до введения препаратов и через 60 мин. после введения. Все препараты вводили в дозах: 10 мкг/кг, 50 мкг/кг и 100 мкг/кг для пирогенала; 0.2 мл для физиологического раствора; 1 мг/кг для баклофена. Исследование активности ХАТ проводили радиоизотопным методом [4]. Об активности фермента судили по накоплению продукта реакции. Активность ХАТ выражали в процентах по отношению к контролю. Контролем служили животные, которым вводили апиригенный физиологический раствор.

Результаты и обсуждение. Введение животным пирогенала приводило к развитию лихорадки, степень которой зависела от дозы препарата. Температура тела повышалась на 0.1°C, 0.7°C, 1.2°C при действии пирогенала в дозах 10 мкг/кг, 50 мкг/кг и 100 мкг/кг, соответственно. Наблюдали усиление синтеза АХ в гипоталамусе в случаях введения пирогенала в дозе 50 мкг/кг и 100 мкг/кг - на 37% и на 42.8%, соответственно, (P<0.05). Возможно, такие изменения в синтезе АХ при развитии лихорадки можно объяснить потерей ионов натрия и накоплением ионов кальция в ткани гипоталамуса во время подъема температуры тела. Известно, что высокие концентрации ионов натрия способны ингибировать ХАТ, а низкое их содержание приводит к ее активации [5]. С точки зрения функциональной активности, следует иметь в виду, что эти ионы обуславливают возбуждение нервной клетки и влияют на терморегуляцию. Это изменение возбудимости нервных клеток, по всей видимости, является следствием нарушения нейро-медиаторной передачи в гипоталамусе.

При введении животным агониста ГАМК баклофена мы не наблюдали изменений температуры тела животных. Однако при введении пирогенала на фоне баклофена температура тела увеличивалась значительно. Доза пирогенала 50 мкг/кг плюс баклофен вызывала повышение температуры на 1.8 °С, а 100 мкг/кг плюс баклофен – на 2.2°C. Во всех трех сериях

снижалась активность ХАТ: на 32.4%, на 52.4% и на 61% , соответственно ($P < 0.05$). Агонист ГАМК баклофен способствует усилению ее действия, что связано с активацией ГАМК β - рецепторов. И, хотя есть предположение о том, что только серотонинергические клетки медируют эффект такой активации [2], однако исследования с использованием животных моделей продемонстрировали, что действие никотиновых ацетилхолиновых рецепторов присутствует на нейронах различных областей мозга и что активация этих рецепторов замыкается высвобождением тормозного медиатора ГАМК [1]. В то же время, при лихорадочных состояниях, вызванных введением в организм экзогенных пирогенов, ГАМК может стимулировать образование в мозге простагландинподобных веществ, которые, вероятно, вызывают ослабление функциональной активности холинореактивных систем.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что при экспериментальной лихорадке, вызванной введением животным пирогенала на фоне действия агониста ГАМК баклофена, нарушается функциональное состояние холинергических нейронов гипоталамуса, что свидетельствует о сложных взаимоотношениях структур АХ и ГАМК в этой области мозга.

Литература:

1. Alkondon M., Pereira E.F.R., Eisenberg H.M. Abstracts Society for Neuroscience. 29-th Annual Meeting. Miami Beach.- 1999. - P.1023 –1024.
2. Varga V., Sik A., Feund T.F. Abstracts Society for Neuroscience. 29-th Annual Meeting.- Miami Beach. - 1999. - P.1920-1921.
3. Feldberg W.// Proc. Roy. Soc. (London). - 1975. - Vol.191. - P.199-229.
4. Fonnum F.// J. Neurochem. - 1975. - Vol. 24. - P.407-409.
5. Hellon R.F.// Pharmacol. Rev. - 1974. - Vol. 26., N 4. - P.289-321.

SYNTHESIS OF ACETYLCHOLINE IN THE HYPOTHALAMUS RATS AT FEBRE. EFFECTS OF HABA

Kondrashova S.B., Kokhan S.B., Lavrentiev V.P.
Institute physiology of Academy of Sciences Belarus.

In experiments of male Wistar rats, exposed to pyrogenal and baclophen, agonist HABA, the synthesis of acetylcholine in the hypothalamus was determined using radioisotope technique. Suggesting, that agonist baclophen on fone pyrogenal changes in the functional state of hypothalamus cholinoreactive systems.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕСИНХРОНОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ИНБРЕДНЫХ МЫШАХ BALB/C В ТЕМНОТЕ И С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Кравченко Е.В., Асташко Ю.В., Понтелеева И.В.
*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск,
ул. Академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: behaviour@academpharm.by.*

Актуальность. Биологические ритмы, выполняющие адаптивную функцию, приурочивают жизнедеятельность к наиболее благоприятному времени суток, обеспечивают четкую смену процессов «сон/бодрствование». Развитию нарушений биоритмов

способствуют психические, эндокринные и соматические заболевания, стрессовые состояния, неправильный образ жизни, смена часовых поясов. Как следствие десинхроноза развиваются болезненные состояния, хроническая усталость, психические расстройства, нарушение качества жизни. Перспективными являются хронофармакологические исследования новых средств для лечения десинхроноза. Вместе с тем, валидированные модели десинхронозов единичны. Методологическая база хронофармакологических исследований недостаточно разработана.

Цель исследования. Разработать модель десинхроноза у инбредных мышей BALB/c с использованием искусственного освещения как дополнительного модифицирующего фактора.

Задачи исследования. Оценить показатели биоритмов ГДА и ВДА (мезор, амплитуду и акрофазу ритма) у мышей BALB/c при отсутствии освещения, а также в условиях слабой и умеренной освещенности.

Методы исследования. Исследование проводили на 30 инбредных мышках BALB/c в возрасте 2-2,5 месяца, полученных из питомника отдела биомоделей ИФБ НАН Беларуси. Сопоставляли биоритмы активности инбредных мышей BALB/c при разных уровнях освещенности. Запись хронограмм проводили в условиях высадки животных поодиночке в камеры актометра «Универсал 22-32», при стандартизированной температуре воздуха (18-21°C) и относительной влажности (70-72%). Регистрацию локомоторной (ГДА) и исследовательско – ориентировочной (ВДА) двигательной активности (ДА) проводили с использованием 3-х режимов освещения: «отсутствие освещения» (0 люкс), «слабая освещенность» (менее 10 люкс), «умеренная освещенность» (100 люкс). Освещение каждого бокса осуществляли лампами подсвета Я – 100 Л -12 В ($\lambda=670-680$ нм).

Показатели ГДА и ВДА регистрировались автоматически с помощью многоканального регистратора ДА с размерами камер 32 см x 22 см x 19 см с подстилкой, кормушкой, поилкой (условия, имитирующие «домашнюю клетку», соответствующие низкому уровню «опасности»). На протяжении 3-х последовательных суток осуществляли регистрацию биоритмов ГДА и ВДА. Продолжительность каждого сеанса актометрии составляла 24 часа. Высадку животных в камеру актометра проводили в 10.00-12.10. Посредством компьютерной программы методом косинор-анализа определяли основные параметры ритмов: амплитуду ритма (A), акрофазу, т. е. астрономическое время наступления максимума функции (ϕ) и мезор (h), а также иные параметры, необходимые для построения эллипсов ошибок. Наличие или отсутствие достоверных суточных или ультрадианных ритмов определялось графически: существование ритмов считали доказанным, если эллипс не перекрывал начало системы координат. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Origin 6.1, Statistica 6.0, Biostat, Cosinor 2.5.

Формировали 3 экспериментальные группы. Показатели ГДА и ВДА мышей группы №1 ($n=10$, контроль) регистрировали в условиях отсутствия освещения, групп № 2 ($n=10$) и № 3 ($n=10$) - при слабом и умеренном освещении соответственно. Мышам групп №1, №2, №3 вводили внутрибрюшинно дистиллированную воду в количестве 0,1 мл на 10 г массы тела животного на протяжении 3-х суток наблюдения за 30 мин до каждой из высадок в экспериментальную камеру.

Результаты. Показано, что как в условиях отсутствия освещения, так и при слабом и умеренном искусственном освещении у инбредных мышей BALB/c имели место проявления десинхроноза. С помощью косинор-анализа была установлена существенная модификация световым воздействием параметров хронограммы ГДА и ВДА особой названной линии. Так, в 1-е и 3-и сутки акрофаза циркадианного (24-часового) ритма подвижности в горизонтальной и вертикальной плоскостях у мышей BALB/c группы №1 в условиях отсутствия освещения приходилась на ранние вечерние и дневные часы – ϕ ГДА: 18.16 и 18.44, ϕ ВДА: 17.53 и 15.14. Подобное смещение акрофазы на дневные часы можно

рассматривать как дизритмию. При слабой освещенности у мышей группы №2 в 1-е и 3-и сутки имела место еще более выраженная миграция акрофазы подвижности в горизонтальной плоскости - ф ГДА: 17.54 и 16.40. Сдвиг акрофазы в вертикальной плоскости был сопоставим с таковым в отсутствие освещения - ф ВДА: 17.58 и 15.14 соответственно. При умеренной освещенности в 1-е и 3-и сутки наблюдения отмечено смещение акрофазы на вечерние часы (ф ГДА: 19.38 и 20.18, ф ВДА: 19.27 и 19.55), что, в целом, соответствует биоритмам ДА грызунов, ведущих «ночной» образ жизни.

В 1-е сутки (период наиболее острого «стресса новизны») выявлено возникновение статистически достоверных коротких (6-часовых) циклов ГДА (у особей групп №1 и №3) и ВДА (у животных групп №1, №2, №3). На 3-и сутки эксперимента наблюдается нивелирование 6-часовых ультрадианных ритмов ГДА и ВДА у мышей всех экспериментальных групп.

Циркадианные ритмы ГДА и ВДА у животных группы №1 были сформированы хуже, чем таковые у особей групп №2 и №3. Отсутствовали статистически значимые циркадианные ритмы ВДА у мышей группы №1 (но не №2 и №3) во 2-е сутки наблюдения. У особей группы №1 была высока доля ультрадианных составляющих биоритмов ГДА и ВДА, отмечаемых как в 1-е сутки (6-часовые и 12-часовые ритмы), так и во 2-е сутки (12-часовые ритмы) и в 3-и сутки (12-часовые ритмы). У мышей группы №2 6-часовые (ГДА и ВДА) и 12-часовые (ГДА) ритмы были выявлены лишь в 1-е сутки актометрии. У особей группы №3 дизритмия по критерию «возникновение ультрадианных ритмов» была менее выраженной, чем у мышей группы №1, однако более отчетливой, чем у животных группы №2. Так, особи группы №3 характеризовались наличием 6- и 12-часовых ритмов ГДА в 1-е сутки, кроме того – 12-часовых ритмов ГДА во 2-е и в 3-и сутки актометрии.

Повышение интенсивности освещения существенно повлияло на уровень суточной подвижности (ГДА, ВДА) мышей. У особей группы №3 в сравнении с мышами группы №1 отмечено значимое снижение ГДА и ВДА за 24 часа наблюдения: в 1-е сутки – в 1,75 раза и в 2,02 раза; в 3-и сутки - в 2,21 и 1,73 раза соответственно ($p < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса). У мышей группы №3 в сравнении с животными группы №2 уровень ГДА и ВДА в 3-и сутки наблюдения был снижен в 1,88 раза и 1,67 раза соответственно ($p < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса).

В 3-и сутки выявлены статистически значимые межгрупповые различия по показателю «продолжительность периода с низким уровнем активности» (ГДА и ВДА) между особями групп №1 и №3, но не между животными групп №1 и №2, №2 и №3. При этом значения указанного критерия составили в контроле 25% и 8,3%, а у мышей группы №3 - 54,2% и 41,7% соответственно ($p < 0,05$, критерий Z). Детальный анализ динамики поведенческой активности животных показал, что различия между группами статистически достоверны преимущественно за счет патологически повышенного у контрольных особей уровня ГДА и ВДА в утренние и дневные часы, не наблюдаемого у животных группы №3.

Применение слабой освещенности не привело в 1-е сутки наблюдения к изменениям А ритмов ГДА и ВДА в сравнении с контролем. В 3-и сутки наблюдалось увеличение А ритмов ГДА и ВДА особей группы №2 по сравнению с таковой у животных группы №1 в 1,47 раза и 1,3 раза соответственно. При умеренной освещенности в 1-е и 3-и сутки наблюдения отмечено снижение в сравнении с контролем как А ритма ГДА (в 2,09 раза и 1,33 раза соответственно), так и А ритма ВДА (в 1,98 раза и в 2,08 раза соответственно).

Значения как h , так и А ритмов ГДА и ВДА у мышей группы №3 достоверно снизились в сравнении с контролем в 1-е сутки (в 2,32 раза и в 1,85 раза) и в 3-и сутки (в 2,32 раза и в 1,85 раза) - $p < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса. Учитывая, что у мышей BALB/c повышен уровень амплитуды и мезора в сравнении с «условной нормой» (особи ICR), вышеописанное снижение параметров А и h ритмов ГДА и ВДА у мышей группы №3 в сравнении с контролем можно расценивать как признаки корректорного эффекта.

Таким образом, использование слабого освещения вело к еще более выраженному, чем в контроле, патологическому сдвигу акрофазы ϕ ГДА на дневные часы. Наряду с этим в условиях слабого уровня освещенности имело место нивелирование 6- и 12-часовых ритмов ГДА и ВДА в 3-и сутки, тогда как у мышей контрольной группы ультрадианные ритмы были статистически значимыми.

Применение умеренного освещения оказывало определенный корректирующий эффект на биоритмы мышей BALB/c, способствуя нормализации акрофазы ритмов ГДА и ВДА. Вместе тем, влияние указанного светового режима на ультрадианную составляющую биоритмов подвижности было достоверным, однако менее выраженным, чем влияние слабого уровня освещенности.

Как слабое, так и умеренное освещение вызвало однонаправленный эффект в отношении уровня ГДА и ВДА за 24 часа актометрии, подавляя подвижность животных. Наряду с этим, характер модулирующего влияния светового фактора на значения амплитуды и мезора ритмов ГДА и ВДА определялся уровнем освещенности (снижение A и h относительно контроля – при умеренном освещении, увеличение A и h – при слабом освещении). Улучшение биоритмов подвижности у мышей BALB/c в условиях искусственного освещения в определенной мере согласуется с данными о позитивном влиянии световой терапии на состояние больных депрессией [(Lam R.M., Levitan R.D., 2000), характеризующихся нарушениями циркадианных ритмов (Voivin D.B., 2000).

Заключение. Предложенная схема эксперимента может быть использована для моделирования десинхроноза в опытах на мышах. Наиболее выраженная дизритмия у особей BALB/c имела место в отсутствие освещения. Применение искусственного освещения способствовало развитию существенных изменений циркадианных ритмов у мышей BALB/c. Целесообразно дальнейшее изучение влияния светового воздействия и фотосенсибилизаторов на параметры биоритмов.

MODELLING DESYNCHRONOSIS IN THE EXPERIMENT ON INBRED BALB/C MICE IN DARKNESS AND USING ARTIFICIAL LIGHT

Kravchenko E.V., Astashko Y.V., Ponteleeveva I. V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Conclusion. The proposed design of experiment may be used in modeling desynchronosis in BALB/c mice. The mostly expressed dysrhythmia in animals of this line has taken place during the actometry in darkness. The experimental data show that the use of artificial light has promoted significant changes of circadian rhythms of BALB/c mice. The further study of influence of light and photosensitizers on biorhythm parameters seems expedient.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ НЕАССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ У АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ICR В TAIL SUSPENSION TEST

Кравченко Е.В., Максимова Л.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Поведенческие модели, основанные на неассоциативном обучении (одной из наиболее примитивных форм обучения) просты и удобны для изучения мнестико-интеллектуальных функций организма и поиска возможных ноотропов [1]. Существующая методологическая база, применяемая для разработки ноотропных средств, включает в качестве базовых тестов, главным образом, методики выработки условных рефлексов и, следовательно, является однобокой и нуждается в усовершенствовании. Имеются лишь единичные публикации, посвященные разработке и применению в психонейрофармакологии адекватных экспериментальных моделей, предназначенных для оценки процессов неассоциативного обучения [2]. В доступной литературе последних лет представлены преимущественно экспериментальные работы по изучению габитуации и дисгабитуации с использованием метода оценки угашения исследовательско-ориентировочной реакции (ИОР) [2].

Тесты «подвешивание за хвост» (Tail Suspension Test, TST) и «вынужденное плавание» (Forced Swimming Test, FST, тест Порсолта) наиболее часто используются в поведенческих исследованиях для моделирования депрессии. Животные после подвешивания за хвост (TST) или погружения в воду (FST) демонстрируют определенный период иммобильности, по латентности которого можно судить об уровне их депрессивности. Несмотря на то, что предикторная способность этих тестов достаточно высока, для ряда соединений, не обладающих антидепрессантной активностью, выявлены «ложно-позитивные эффекты» [3]. В исследованиях последних лет увеличение продолжительности «замирания» животного при повторном тестировании рассматривается как адаптивная реакция («выученная иммобильность»). В этом случае животные выучиваются принимать неподвижную позу как наиболее «биологически целесообразную», позволяющую снизить энергозатраты. Полагают, что в основе процессов «выученной иммобильности» лежит неассоциативное обучение – габитуация [3], поскольку поведенческие реакции отвечают критериям, обычно применяемым для описания этого феномена [3]. «Выученная иммобильность» при повторных тестированиях в FST объясняется тем, что стрессирующая ситуация становится более «знакомой» животному [3]. Привыкание к условиям эксперимента проявляется увеличением продолжительности неподвижного «зависания» мыши в исследуемом временном интервале.

Тест «подвешивание за хвост» конструктивно близок к FST [4, 5]. TST не только прост и удобен технически, но и более чувствителен к ряду психотропных препаратов, чем тест Порсолта [4]; при его проведении отсутствует переохлаждение и связанные с ним артефакты [4, 5]. В основе оценки процессов неассоциативного обучения с помощью TST лежит предположение о том, что при повторных помещении мышей в знакомую обстановку эксперимента продолжительность активной реакции избавления от стрессирующих условий снижается. Пассивное ожидание быстрого освобождения экспериментатором является биологически более целесообразным, чем безуспешные попытки активного избавления из стрессирующей ситуации. «Выученное» снижение продолжительности активных попыток избавления животных ($T_{\text{активн.}}$, «борьба», с) может расцениваться как привыкание (габитуация). Исходя из вышесказанного, TST может быть предложен в качестве альтернативного FST и использоваться для оценки процессов обучения и памяти. Целью настоящего исследования явилось моделирование процессов неассоциативного обучения (габитуации) у аутбредных мышей ICR в тесте «подвешивание за хвост».

В работе использовали аппаратный комплекс «Tail Suspension for Rodents kontrol» (модель TS100 фирмы Lafayette Instrument, США), оснащенный ПЭВМ. Мышей поочередно подвешивали за хвост при помощи липкой ленты, закрепляемой на расстоянии 1,5 см от кончика хвоста. Расстояние от пола установки до носа животного составляло 2-3 см. Проводили 3 сеанса тестирования с интервалом 1 сутки. В каждом сеансе регистрировали $T_{\text{активн.}}$ на протяжении 6 мин. Учитывали результаты за две первые минуты наблюдения. TST применяли только для изучения процесса межсеансного привыкания. В качестве базового

критерия, характеризующего процесс габитуации у мышей в TST, использовали «выученное» уменьшение продолжительности активных попыток избавления животных. Статистически значимое снижение показателя $T_{\text{активн.}}$ в течение 1-й, 2-й мин или периода 0-2 мин при 2-м и 3-м тестированиях относительно соответствующих значений в 1-м сеансе ($P < 0,05$, критерий Уилкоксона) расценивали как маркер привыкания к стрессорирующим условиям эксперимента.

Учитывая отсутствие в научной литературе данных об использовании TST для экспериментального изучения процессов привыкания, моделировали процессы габитуации в опытах на аутбредных мышах ICR ($N=35$) 3-4-х месячного возраста, для которых в научной литературе не описано патологических изменений ЦНС. Поскольку введение фармакологических веществ или лекарственных препаратов предполагает инъекционный стресс, эксперименты проводили на фоне 4-х кратного в/б введения животным растворителя (последние 3 инъекции – за 30 минут до 1-го, 2-го и 3-го сеансов тестирования).

Результаты исследования показали, что достоверная габитуация наблюдалась у мышей во 2-ю мин 2-х последних сеансов тестирования в сравнении с соответствующим значением в 1-й день эксперимента ($P=0,047$ и $P=0,044$ соответственно). Значения показателя $T_{\text{активн.}}$ в названном временном интервале в 1-м, 2-м и 3-м сеансах тестирования составили $37,58 \pm 1,97$ с; $31,39 \pm 1,95$ с и $30,45 \pm 2,40$ с соответственно. Кроме того, отмечалось статистически значимое ($P=0,027$) снижение суммарного значения показателя $T_{\text{активн.}}$ у животных за период 0-2 мин регистрации от $76,16 \pm 3,5$ с в 1-м сеансе до $63,98 \pm 4,35$ с при 3-м тестировании. Полученные данные свидетельствуют об отчетливо проявляющемся у аутбредных особей ICR процессе габитуации в TST.

Разработанная нами модель, помимо преимуществ в сравнении с FST, имеет ряд достоинств при сопоставлении с тестом угашения ИОР: 1) на результаты исследования не влияет поведенческая реакция «патрулирования», искажающая результаты эксперимента; 2) можно избежать фризинг-реакции; 3) результаты легко интерпретировать. TST целесообразно использовать для оценки ноотропной активности фармакологических веществ или лекарственных препаратов наряду с традиционным тестом угашения ИОР в качестве основного в батарее методик по отбору средств, улучшающих когнитивные функции.

Литература:

1. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 308–319.
2. Островская, Р.У. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1991. – Т. 5, № 12. – С. 498–500.
3. Parra, A. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice / A. Parra [et al.] // Psicothema. – 1999. – Vol. 11, № 2. – P. 239–246.
4. Калуев, А.В. К вопросу о перспективности использования мышей, нокаутных по гену серотонинового транспортера, в качестве генетической модели депрессии / А.В. Калуев // Нейронауки. – 2007. – № 1(9). – С. 19–27.
5. Dunn, A.J. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? / A.J. Dunn, A.H. Swiergiel, R. de Beaurepaire // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. – 2005. – Vol. 29. – P. 891–909.

MODELING OF NONASSOCIATIVE LEARNING PROCESSES IN OUTBRED ICR MICE IN TAIL SUSPENSION TEST

Kravchenko E.V., Maksimova L.V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

Proceeding from the necessity to improve the methodologic basis of development of nootropic agents, the modeling of nonassociative learning processes (habituation) was carried out on outbred ICR mice in tail suspension test (TST). The TST seems expedient to use in assessment of nootropic activity of pharmacologic substances or medicinal preparations as a principal method of selection of drugs that improve cognitive performance.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОПНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ПРОЦЕССЫ НЕАССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ У АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ICR В TAIL SUSPENSION TEST

Кравченко Е.В., Максимова Л.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Одной из распространенных форм поведения является привыкание (габитуация), называемое также «негативным обучением», поскольку оно состоит не в приобретении поведенческих реакций, а в их угашении [1]. Эта форма неассоциативного обучения отчетливо выражена как у млекопитающих, так и у беспозвоночных животных.

Не вызывает сомнений высокая актуальность поиска новых соединений, обладающих облегчающим действием на когнитивные функции. Вместе с тем, методологическая база для оценки указанного вида фармакологической активности недостаточно разработана. В настоящее время для экспериментального изучения ноотропного действия фармакологических веществ и лекарственных препаратов в отношении процессов неассоциативного обучения используется только тест угашения исследовательско-ориентировочной реакции, предложенный Островской Р.У. (1991) [1]. Вместе с тем, для изучения процесса габитуации могут быть использованы поведенческие модели, основанные на стрессовых ситуациях, сопровождающихся «выученной иммобильностью» (тесты «вынужденное плавание» – Forced Swimming Test, FST и «подвешивание за хвост» – Tail Suspension Test, TST) [2]. Благодаря ряду конструктивных особенностей TST более предпочтителен, чем FST при моделировании процессов габитуации в эксперименте [3, 4].

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов нейротропных олигопептидов в отношении процессов неассоциативного обучения в TST у аутбредных мышей ICR.

Процесс привыкания в TST при повторном подвешивании за хвост проявляется снижением двигательной реакции. «Выученное» уменьшение продолжительности активных попыток избавления животных ($T_{\text{активн.}}$, «борьба», с) может расцениваться как габитуация.

В работе использовали аппаратный комплекс «Tail Suspension for Rodents kontrol» (модель TS100 фирмы Lafayette Instrument, США), оснащенный ПЭВМ. Проводили 2 сеанса тестирования с интервалом 1 сутки. В каждом сеансе регистрировали показатель $T_{\text{активн.}}$ на протяжении 6 мин. Учитывали результаты за две первые минуты наблюдения. TST применяли только для изучения процесса межсеансного привыкания. Статистически значимое снижение показателя $T_{\text{активн.}}$ в течение 1-й, 2-й или 2-х первых мин при повторном тестировании относительно соответствующих значений в 1-м сеансе ($P < 0,05$, критерий Уилкоксона) свидетельствовало о хорошо выраженном процессе габитуации.

В исследованиях использовали 156 особей аутбредных мышей ICR. Оценивали влияние нейротропных олигопептидов на процессы неассоциативного обучения в TST в 2-х независимых экспериментальных сериях (таблица 1). Все исследуемые образцы вводили животным внутривенно (в/б) трижды, в том числе 2 последних введения – за 30 мин до 1-го и 2-го сеансов тестирования. В качестве препарата сравнения использовали пролинсодержащий олигопептид с ноотропным действием и доказанным влиянием на процессы памяти и обучения – семакс [5]. Учитывая проблематичность соблюдения точности дозирования мышам препарата в условиях интраназального введения, семакс применяли в/б в дозе, сопоставимой с приведенной в литературе для указанного способа введения [5].

Таблица 1 – Влияние нейротропных олигопептидов (в/б) на процессы габитуации у аутбредных мышей ICR в Tail Suspension Test

Группа, доза (мг/кг) / число мышей в группе	Продолжительность активных попыток избавления, $T_{\text{активн.}}$, с					
	1-я минута		2-я минута		2 минуты	
	Сеанс 1	Сеанс 2	Сеанс 1	Сеанс 2	Сеанс 1	Сеанс 2
<i>Серия 1</i>						
I. Контроль N=35	38,58±1,93	36,17±1,84	37,60±1,97	31,39±1,95*	76,16±3,5	67,56±3,41
II. Семакс, 0,01 N=9	41,65±3,30	41,59±2,87	41,44±2,19	41,34±3,46	83,09±5,08	82,93±4,94
III. Ноопепт, 0,1 N=7	37,12±2,64	34,94±2,80*	40,37±4,47	27,74±5,39*	77,49±5,85	62,67±7,06*
IV. ИФБ-30, 0,1 N=9	35,24±3,97	32,95±4,44	27,62±5,03	26,30±3,64	62,86±8,73	59,25±5,93
V. ИФБ-30, 0,5 N=8	40,47±2,65	30,30±3,52	35,67±3,02	23,69±4,40	76,14±4,58	53,99±6,76*
VI. ИФБ-30, 5,0 N=9	37,93±2,31	31,48±2,93	32,78±3,03	27,11±4,15	70,70±3,31	58,59±6,62
VII. А-702, 0,1 N=9	43,59±2,96	39,01±3,27*	38,79±4,15	37,62±4,38	82,39±5,45	76,63±7,33
VIII. А-702, 0,5 N=8	37,26±2,72	36,52±2,51*	33,31±3,74	36,54±2,56*	70,56±6,15	73,06±4,41*
IX. А-702, 5,0 N=9	36,28±3,38	35,49±4,20	33,38±3,38	28,48±4,84	69,66±4,95	63,97±56,02
<i>Серия 2</i>						
Ia. Контроль N=17	41,95±2,78	41,23±2,85	36,65±3,21	36,37±3,54	78,60±5,07	77,60±6,0
X. Glu-Cys, 0,1	40,51±2,28	42,63±2,43	35,08±3,33	39,37±5,10	75,59±5,23	82,00±7,15

N=9						
XI. Glu-Cys, 0,5 N=10	41,01±2,94	36,32±4,99*	38,39±4,73	35,99±5,10*	79,40±6,76	72,31±9,81*
XII. Glu-Glu, 0,1 N=8	36,94±3,87	38,31±3,44	33,33±4,93	36,82±3,90	70,27±8,42	75,13±6,50
XIII. Glu-Glu, 0,5 N=9	42,68±3,59	38,89±4,15	38,47±4,00	41,49±3,34	81,15±7,37	80,38±6,84

Примечание – * – различия статистически значимы в сравнении с соответствующим показателем в 1-м сеансе тестирования (межсессионная габитуация, $P < 0,05$, критерий Уилкоксона)

Результаты исследования показали, что в контроле процессы привыкания выражены слабо. У особой группы I в серии I (таблица 1) значения показателя $T_{\text{активн.}}$ существенно снижались во 2-ю мин повторного тестирования в сравнении с тем же промежутком времени в день 1, однако суммарное значение названного показателя за 2 мин статистически значимо не изменялось от 1-го ко 2-му сеансу. Во второй экспериментальной серии в контроле показатели $T_{\text{активн.}}$ за указанные интервалы наблюдения в 1-м и 2-м сеансах статистически значимо не отличались между собой, вероятно, вследствие меньшего числа животных в выборке (N=17) в сравнении с таковым в серии I (N=35).

У мышей ICR на фоне применения ИФБ-30 в дозе 0,5 мг/кг при повторном тестировании в TST отмечалось достоверное ($P < 0,05$) увеличение суммарной продолжительности иммобилизации за 2 мин относительно исходного уровня (1-й день). У животных, получавших исследуемое соединение в дозах 0,1 мг/кг и 5,0 мг/кг, регистрируемые показатели не отличались от таковых в контроле и существенно не изменялись при повторном тестировании, что указывает на отсутствие эффекта у дипептида ИФБ-30 при в/б введении в названных дозах в отношении процессов неассоциативного обучения в TST (таблица 1).

Применение А-702 в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг приводило к достоверному ($P < 0,02$ и $P < 0,05$ соответственно) снижению значений показателя $T_{\text{активн.}}$ за 1-ю мин наблюдения при повторном тестировании относительно соответствующего значения в 1-й день эксперимента. У особой контрольной группы в те же сроки статистически значимой габитуации не наблюдалось. В группе мышей, которым назначали названный дипептид в дозе 0,5 мг/кг, во 2-м сеансе подвешивания за хвост выявлена инверсия эффекта: значения $T_{\text{активн.}}$ во 2-ю и за период продолжительностью 2 мин достоверно ($P < 0,05$ и $P < 0,05$) возрастали по сравнению с таковыми при 1-м тестировании. При введении в дозе 5,0 мг/кг А-702 не оказывал существенного влияния на продолжительность иммобилизации у аутобредных особей ICR (таблица 1).

Назначение мышам дипептидов ноопепт (0,1 мг/кг) и Glu-Cys (0,5 мг/кг, но не 0,1 мг/кг) сопровождалось существенным ускорением процессов привыкания во всех анализируемых интервалах наблюдения, о чем свидетельствует статистически значимое снижение значений $T_{\text{активн.}}$ в 1-ю, 2-ю и за период 0-2 мин ($P < 0,05$) при 2-м тестировании относительно соответствующих показателей в 1-й день эксперимента (таблица 1). Необходимо подчеркнуть, что в контроле при большем числе наблюдений (N=17 в сравнении с N=7 и N=10, соответственно) статистически достоверной габитуации не отмечалось.

Введение животным семакса (0,01 мг/кг) и дипептида Glu-Glu (0,1 и 0,5 мг/кг) не сопровождалось статистически значимыми изменениями значений показателя $T_{\text{активн.}}$ в 1-ю, 2-ю и за период 0-2 мин при повторном тестировании относительно соответствующих значений в 1-м сеансе TST (таблица 1).

Таким образом, наиболее эффективными в отношении габитуации у мышей ICR в тесте «подвешивание за хвост» являются дипептиды ноопепт (0,1 мг/кг) и Glu-Cys (0,5 мг/кг). В меньшей степени увеличению продолжительности «выученной иммобильности» животных

способствовали соединения А-702 (0,1 и 0,5 мг/кг) и ИФБ-30 (0,5 мг/кг). Дипептид Glu-Glu и ноотропный препарат пептидной природы семакс (0,01 мг/кг) не оказывали статистически значимого влияния на исследуемые процессы.

Литература:

1. Островская, Р.У. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1991. – Т. 5, № 12. – С. 498–500.
2. Parra, A. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice / A. Parra [et al.] // Psicothema. – 1999. – Vol. 11, № 2. – P. 239–246.
3. Калугев, А.В. К вопросу о перспективности использования мышей, нокаутных по гену серотонинового транспортера, в качестве генетической модели депрессии / А.В. Калугев // Нейронауки. – 2007. – № 1(9). – С. 19–27.
4. Dunn, A.J. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? / A.J. Dunn, A.H. Swiergiel, R. de Beaurepaire // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. – 2005. – Vol. 29. – P. 891–909.
5. Ноотропное средство и фармацевтическая композиция ноотропного действия: пат. 2045958 РФ, МПК6 А 61 К 38/08 / Л.А. Андреева, И.П. Ашмарин, А.А. Каменский, Н.Ф. Мясоедов, В.Н. Незавибатько, Т.В. Рясина; заявитель Институт молекулярной генетики РАН – № 94010496/14; заявл. 28.03.1994; опубл. 20.10.1995.

EFFECT OF NEUROTROPIC OLIGOPEPTIDES ON THE NONASSOCIATIVE LEARNING PROCESSES IN OUTBRED ICR MICE IN TAIL SUSPENSION TEST

Kravchenko E.V., Maksimova L.V.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

The effects of neurotropic oligopeptides on the nonassociative learning processes have been studied on outbred ICR mice in tail suspension test (TST). The dipeptides “noopept” (0.1 mg/kg) and “Glu-Cys” (0.5 mg/kg) have turned out the most efficient relating to the habituation in ICR mice in TST. The compounds “A-702” (0.1 and 0.5 mg/kg) and “IFB-30” (0.5 mg/kg) have promoted the increase of duration of “learned immobility” of animals in a lesser scale. The dipeptide Glu-Glu and nootropic preparation of peptide nature Semax have not exerted any significant effect on studied processes.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ НЕАССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ У МЫШЕЙ В ТЕСТЕ TAIL FLICK

Кравченко Е.В., Максимова Л.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Неассоциативное обучение – одна из наиболее примитивных форм обучения, рассматривается как простейшее нейрорадаптивное поведение, встречающееся как у низших, так и у высших животных. Выделяют два основных взаимодополняющих вида неассоциативного обучения – габитуация (привыкание или угашение) и сенситизация, отражающие соответственно ослабевающую и усиливающуюся со временем ответную реакцию животного на повторяющиеся стимулы [1].

Поведенческие модели, основанные на неассоциативном обучении просты и удобны для изучения мнестико-интеллектуальных функций организма и поиска возможных ноотропов. Однако имеются лишь единичные публикации, посвященные разработке и применению в психонейрофармакологии адекватных экспериментальных моделей процессов неассоциативного обучения [2].

Тест «отдергивание хвоста» (Tail Flick, TF) широко применяется в психонейрофармакологии для оценки уровня болевой чувствительности (БЧ) экспериментальных животных. Метод основан на регистрации латентного периода болевой реакции, проявляющейся в отдергивании животным хвоста при действии на него сфокусированным тепловым пучком [3]. Как тепловое болевое воздействие TF тестирования, так и воздействия, связанные с инвазивной процедурой введения фармакологических веществ, вызывают сложный ответ со стороны нервной системы. Болевая реакция отдергивания хвоста находится под контролем ЦНС; привыкание к условиям TF тестирования может служить одной из наиболее простых моделей отражения таких центральных (психических) феноменов, как ожидание, память, обусловленных научением животного.

Учитывая вышесказанное, а также тот факт, что описанные в литературе габитуация [4] и сенситизация [5] в TF ранее не предлагались для оценки ноотропного действия фармакологических веществ и лекарственных препаратов, целью настоящей работы явилось моделирование процессов габитуации и сенситизации у мышей в тесте «отдергивание хвоста» с перспективой последующего применения в психонейрофармакологии.

Исследования проведены на аутбредных мышах ICR (N=67, «условная норма») 2-3-х месячного возраста. *Инъекционный стресс* моделировали 4-х кратным внутрибрюшинным введением растворителя экспериментальным животным (в том числе, 3 последних введения за 30-60 сек до 1-го – 3-го сеансов тестирования соответственно). Доставку лабораторных мышей из питомника отдела биомоделей ИФБ НАН Беларуси осуществляли за 3 суток до 1-го сеанса тестирования.

Животное предварительно фиксировали в специальном пенале. Обжигающий луч света фокусировали на дорзальную поверхность хвоста мыши на расстоянии 2-3 см от корня. Наносили 4 болевых стимула в каждом сеансе тестирования. Временной интервал с момента начала нагревания хвоста и до его отдергивания в ответ на ноцицептивное раздражение регистрировали автоматически. Данные выражали в секундах. При отсутствии реакции у животного после применения теплового стимула продолжительностью более 12 с отключение болевого воздействия производилось вручную. Учитывали данные измерений ЛП при 1-й ($ЛП_1$) и 2-й ($ЛП_2$) стимуляции в 1-м сеансе и при 1-й стимуляции в каждом из 2-х последующих сеансов тестирования ($ЛП_3$ и $ЛП_4$ соответственно). Межстимульные интервалы варьировали и составили: 30 с – между 1-м и 2-м нанесением болевого раздражения в 1-м сеансе, 24 ч – между 1-м и последующими сеансами стимуляции.

Применение болевого раздражителя в TF может сопровождаться как сенситизацией (при нанесении стимулов с коротким интервалом, 30-60 с), так и габитуацией (при длительных перерывах между сеансами стимуляции, 24 ч), что соответствует данным научной литературы о зависимости процессов неассоциативного обучения в системе «стимул-ответ» от продолжительности межстимульного интервала [1]. Достоверное снижение значений $ЛП_2$ относительно исходного уровня болевой чувствительности ($ЛП_1$)

оценивали как *сенситизацию* к болевому воздействию, вызванному нанесением 2-х последовательных ноцицептивных раздражений с незначительным межстимульным интервалом (30 с). При увеличении межстимульного интервала до 24 ч *габитуация* к слабому болевому воздействию на модели ТФ проявлялась статистически значимым возрастанием значений $ЛП_3$ и $ЛП_4$ относительно соответствующего показателя при 1-м нанесении ноцицептивного раздражения ($ЛП_1$).

Сенситизация, сопровождающаяся снижением порога БЧ, развивалась у мышей при резко выраженной болевой реакции, обусловленной нанесением тепловых импульсов непосредственно друг за другом. Так, статистически значимое снижение значений $ЛП_2$ на 13,7% в ответ на повторное применение болевого стимула через 30-60 с ($P < 0,0001$, критерий Уилкоксона) в 1-й день эксперимента свидетельствовало о развитии статистически значимой сенситизации.

При увеличении интервала между воздействиями болевого раздражителя до 1 суток повторная стимуляция вызывала умеренно выраженную болевую реакцию и расценивалась животным как биологически незначимая, т.е. не угрожающая его жизни. В названных условиях порог БЧ экспериментальных животных возрастал и отмечалась габитуация – замедление реакции отдергивания хвоста при повторном предъявлении болевого раздражителя. Выявлено достоверное ($P < 0,05$, критерий Уилкоксона) возрастание значений $ЛП$ отдергивания хвоста у мышей во 2-м (на 19,6%, $ЛП_3$) и 3-м (на 19,5%, $ЛП_4$) сеансах тестирования в сравнении с соответствующим исходным показателем ($ЛП_1$), что служит маркером привыкания животных к болевому раздражителю.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными научной литературы о том, что процессы сенситизации и габитуации дополняют друг друга, и неассоциативное обучение в этом случае носит дуалистический характер [1].

Учитывая развитие статистически значимой габитуации у мышей ICR во 2-й день эксперимента, при оценке ноотропной активности фармакологических веществ и лекарственных препаратов считали достаточным проведение 2-х сеансов ТФ-тестирования.

Таким образом, в ходе наших исследований разработаны режим нанесения аверсивного стимула и интенсивность болевого воздействия, обеспечивающие получение воспроизводимых результатов при моделировании в ТФ как процессов габитуации, так и сенситизации. Учитывая, что последняя не может быть воспроизведена в тестах угашения исследовательско-ориентировочной реакции и «подвешивание за хвост» (ТСТ), тест ТФ незаменим при оценке психофармакологической активности средств, влияющих на неассоциативное обучение. Целесообразно использование ТФ-тестирования по предложенной схеме в качестве одной из основных моделей для отбора фармакологических веществ и лекарственных средств, эффективных в отношении процессов неассоциативного обучения.

Литература:

1. Poon, C.-S. Nonassociative learning as gated neural integrator and differentiator in stimulus–response pathways / C.-S. Poon, D.L Young // Behavioral and Brain Functions. – 2006. – Vol. 2 (29). – 21 p.
2. Островская, Р.У. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1991. – Т. 5, № 12. – С. 498–500.
3. Мулик А.Б. Уровень общей неспецифической реактивности организма (Разработка, оценка, практического применения) / ред. Шестакова А.В. // Монография– Волгоград, 2001. – 144 с.

4. Carstens, E. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus–response function, suppression by morphine and habituation / E. Carstens, C. Wilson // *J. Neurophysiol.* – 1993. – Vol. 70. – P. 630–639.

5. Tail–Flick Latency and Self–Mutilation Following Unilateral in Rats / N. Kříž [et al.] // *Physiol. Res.* – 2006. – Vol. 55. – P. 213–220.

MODELING OF NONASSOCIATIVE LEARNING PROCESSES IN MICE IN TAIL FLICK TEST

Kravchenko E.V., Maksimova L.V.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

In our study, we have developed the aversive stimulus regimen and pain stimulation intensity which provide reproducible results of modeling in tail flick test (TF) of both habituation and sensitization processes. Taking into account that this can not be reached in tests of exploratory-orienting response extinction and tail suspension (TST), TF test is indispensable in the assessment of psychopharmacologic activity of agents that affect the nonassociative learning. The use of TF test with proposed regimen is expedient as one of principal models for selecting pharmacologic substances and medicinal agents efficient respecting to nonassociative learning processes.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ НЕЙРОТРОПНЫХ ДИПЕПТИДОВ НА ПРОЦЕССЫ НЕАССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ У МЫШЕЙ В ТЕСТЕ TAIL FLICK

Кравченко Е.В., Максимова Л.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Учитывая высокую актуальность поиска новых средств коррекции когнитивных нарушений, изучали эффекты нейротропных дипептидов с предполагаемой ноотропной активностью в отношении способности мышей к неассоциативному обучению в тесте «отдергивание хвоста» (Tail Flick, TF) – сенситизации или габитуации – при использовании слабого болевого воздействия в качестве авersive стимулирующего фактора.

Исследования проведены на аутбредных мышях ICR (N=222) 2-3-х месячного возраста, характеризующихся отсутствием патологических изменений ТФС и ненарушенным поведением. Доставку лабораторных мышей из питомника отдела биомоделей ИФБ НАН Беларуси осуществляли за 3 суток до начала тестирования. В работе использовали аппаратный комплекс Analgesia Tail-Flick Apparatus (модель TF-1 фирмы «Columbus Instruments», США) с двухлинзовым конденсором, создающим сфокусированный луч света. Проводили 2 сеанса тестирования (4 болевых стимула в каждом) с интервалом 24 ч. Временной интервал с момента начала нагревания хвоста и до его отдергивания в ответ на ноцицептивное раздражение регистрировали автоматически. Данные выражали в секундах.

Оценивали эффекты соединений дипептидной природы в отношении процессов неассоциативного обучения у аутобредных мышей ICR при повторном применении болевого раздражителя с коротким (30-60 с, сенситизация) и длительным (24 ч, габитуация) межстимульным интервалом. Определяли уровень болевой чувствительности мышей при 1-й ($ЛП_1$) и 2-й ($ЛП_2$) стимуляции в 1-м сеансе и при 1-й стимуляции во 2-м сеансе тестирования ($ЛП_3$). Все исследуемые образцы вводили внутривенно (в/в) трижды, в том числе 2 последних введения – за 30-60 с до 1-го и 2-го сеансов тестирования. Вследствие использования большого числа животных было проведено 4 независимые серии экспериментов (таблица 1).

В контроле двукратное нанесение животным теплового раздражителя с межстимульным интервалом, равным 30-60 с, сопровождалось статистически значимым снижением ЛП отдергивания хвоста от 1-го ко 2-му измерению (сенситизация) и его возрастанием от 1-го к 3-му сеансу тестирования (габитуация) в трех из четырех проведенных серий эксперимента (таблица 1). Статистически значимых межгрупповых различий значений регистрируемого показателя в контроле во всех 4-х сериях эксперимента не отмечалось ($P > 0,05$, ANOVA однофакторный).

Пролинсодержащий дипептид ИФБ-30 препятствовал развитию сенситизации в дозе 0,5 мг/кг (но не 0,1 мг/кг). Этот эффект может быть связан с описанным в научной литературе для *Z*-пролил-*D*-лейцина анальгетическим действием [1]. Последнее подтверждается и установленным нами статистически значимым повышением порога болевой чувствительности у аутобредных особей ICR на фоне применения исследуемого образца в дозе 0,5 мг/кг, о чем можно судить по увеличению $ЛП_1$.

Таблица 1 – Влияние нейротропных дипептидов (в/в) на процессы неассоциативного обучения у аутобредных мышей ICR в тесте Tail Flick

Группа, доза (мг/кг) / число животных	Показатели реакции отдергивания хвоста, с		
	$ЛП_1$	$ЛП_2$ (сенситизация)	$ЛП_3$ (габитуация)
<i>Серия 1</i>			
Ia. Контроль (N=20)	2,869±0,242	2,216±0,075 $P_1 < 0,02$	3,417±0,347 $P_1 < 0,02$
IIa. Ноопепт, 0,5 (N=10)	2,372±0,212	2,190±0,156 $P_1 < 0,05$	3,024±0,155 $P_1 < 0,02$
III. ИФБ-30, 0,1 (N=10)	3,335±0,433	3,683±0,722 $P_1 < 0,05$	4,314±0,657 $P_1 < 0,05$
IV. ИФБ-30, 0,5 (N=9)	4,186±0,694 $P_2 < 0,05$	3,099±0,543	2,971±0,126
V. ИФБ-30, 5,0 (N=10)	2,674±0,195	2,490±0,397 $P_1 < 0,05$	2,810±0,143 $P_1 < 0,05$
<i>Серия 2</i>			
Iб. Контроль (N=18)	2,424±0,061	2,168±0,107 $P_1 < 0,05$	3,114±0,382 $P_1 < 0,020$
IIб. Ноопепт, 0,5 (N=10)	2,757±0,098	2,100±0,130 $P_1 < 0,020$	2,731±0,097 $P_1 < 0,05$
VI. Glu-Lys, 0,1 (N=10)	2,488±0,135	2,068±0,143 $P_1 < 0,020$	2,58±0,12 $P_1 < 0,05$
VII. Glu-Lys, 0,5 (N=10)	2,482±0,119	2,122±0,134 $P_1 < 0,048$	2,73±0,25 $P_1 < 0,05$
VIII. Glu-Lys, 5,0 (N=10)	2,954±0,377	3,070±0,860 $P_1 < 0,05$	2,54±0,08 $P_1 < 0,05$

Однозначная интерпретация результатов по позитивному влиянию на процессы неассоциативного обучения может быть дана только для *серии 3*, так как в этой серии в контроле сенситизация и габитуация не носят статистически значимого характера (тенденция, *undertraining*). В этих условиях отмечено усиление сенситизации до уровня статистической значимости на фоне применения ноопепта (0,1 мг/кг) и А-702 (во всех изученных дозах – 0,1, 0,5 и 5,0 мг/кг). В той же *серии 3* при отсутствии статистически значимой габитуации в контроле у дипептида А-702 (0,5 мг/кг, но не 0,1 мг/кг) выявлено достоверное облегчающее действие на исследуемый процесс. Кроме того, достоверный, но неглубокий мнемотропный эффект, противоположный таковому в контроле, отмечен в отношении сенситизации – для ИФБ-30 (0,1 мг/кг, *серия 1*) и Glu-Lys (5,0 мг/кг, *серия 2*), а в отношении габитуации – для ноопепта (0,1 мг/кг, *серия 4*), Glu-Lys (5,0 мг/кг, *серия 2*) и Glu-Glu (0,5 мг/кг, *серия 4*).

Таким образом, выбранные дипептиды проявили выраженную активность в отношении процессов неассоциативного обучения при адаптации к применению авersive стимула. Целесообразно продолжение исследований фармакологических эффектов дипептидов ноопепт, ИФБ-30, А-702, Glu-Cys и Glu-Glu с использованием других тестов.

Литература:

1. Direct analgesic effects of Z-prolyl-d-leucine and Z-prolyl-L-leucine in the rat yeast-paw test / R.E. Chipkin [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1983. – Vol. 226, № 1. – P. 164–170.

STUDY OF EFFECTS OF NEUROTROPIC DIPEPTIDES ON THE NONASSOCIATIVE LEARNING PROCESSES IN MICE IN TAIL FLICK TEST

Kravchenko E.V., Maksimova L.V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

Taking into account the high actuality of search of new correcting agents for cognitive defects, the effects of neurotropic dipeptides with probable nootropic activity respecting to the mice' capacity for nonassociative learning have been studied in tail flick test (TF) – sensitization or habituation. Slight algetic stimulus has been used as aversive stimulus. The studied dipeptides have manifested an expressed activity relating to the nonassociative learning processes at the adaptation to aversive stimulus.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕЙРОТРОПНОГО ДИПЕПТИДА ИФБ-30 НА ГЛЮТАМАТ- И ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Забродоцкая Е.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск,

Актуальность. Биологические ритмы, выполняющие адаптивную функцию, приурочивают жизнедеятельность к наиболее благоприятному времени суток, обеспечивают четкую смену процессов «сон/бодрствование». В последние десятилетия в клинической практике широко используют лекарственные средства пептидной природы. Возрос интерес к применению олигопептидов как возможных нейротропных средств, что обусловлено их нейротрансмиттерной, модулирующей и регуляторной активностью в отношении ЦНС. Перспективным являются хронофармакологические исследования нового пролинсодержащего дипептида ИФБ-30 с целью оценки его возможного использования для коррекции биологических ритмов организма.

Цель исследования. Целью работы является оценка влияния нейротропного дипептида ИФБ-30 на глутамат- и холинергические механизмы регуляции циркадных ритмов поведенческой активности.

Задачи исследования. Дать оценку возможного хронофармакологического действия ИФБ-30 и изучить нейротрансмиттерные механизмы реализации его эффекта.

Методы исследования. В экспериментах использовано 66 крыс линии WKY в возрасте 2-3-х мес. и 70 крыс линии SHR в возрасте 2-3-х мес., полученных из питомника экспериментально-биологической клиники ИФБ НАН Беларуси. Сопоставляли биоритмы активности крыс SHR и WKY. Запись хронограмм проводили однократно в условиях высадки животных поодиночке с помощью актометра «Универсал 22-32», при стандартизированной температуре воздуха (22°C) и относительной влажности (73%). Все манипуляции с животными в ходе эксперимента, а также регистрация горизонтальной (локомоторной, ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности проводились в режиме «свет : темнота» - 12 часов: 12 часов (светлый период – 07:00-19:00, темный период – 19:00 – 07:00).

В качестве базисных критериев, характеризующих моторику животных, использовали показатели ГДА и ВДА, оцениваемые в многоканальном регистраторе двигательной активности с размерами камер 32 см x 22 см x 19 см. Высадку животных в камеры актометров осуществляли однократно - на 24 часа, в 13.00-13.10. Посредством компьютерной программы методом косинор-анализа определяли основные параметры ритмов: амплитуду ритма (A), акрофазу, т. е. астрономическое время наступления максимума функции (ϕ) и мезор (h), а также иные параметры, необходимые для построения эллипсов ошибок. Наличие или отсутствие достоверных суточных или ультрадианных ритмов определялось графически: существование ритмов считали доказанным, если эллипс не перекрывал начало системы координат. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Origin 6.1, Statistica 6.0, Biostat, Cosinor 2.5.

С целью модификации процессов неассоциативного обучения использованы следующие фармакологические «зонды»: 1) блокатор m_1 -холинорецепторов – скополамин; 2) агонист холинергической нейромедиаторной системы – ареколин; 3) антагонист NMDA-рецепторов - МК-801 (дизоцилпин).

Определяли влияние ареколина, скополамина, МК-801 на модулируемую дипептидом ИФБ-30 габитуацию локомоторной и вертикальной двигательной активности крыс WKY. Формировали 18 экспериментальных групп.

В первые 9 групп включали инбредных крыс SHR. Крысам группы 2а вводили накануне актометрии однократно подкожно скополамин, особям группы 5а – однократно внутрибрюшинно ареколин, животным группы 8а – однократно внутрибрюшинно МК-801. Инбредным крысам SHR групп 1а, 4а, 7а применяли растворитель (здесь и ниже - дистиллированная вода), эти особи служили контролем в проводимых экспериментах. Особям групп 3а, 6а, 9а фармакологические «зонды» вводили на фоне применения

дипептида ИФБ-30 (крысам группы 3а – скополамин, группы 6а – ареколин, группы 9а – МК-801).

В следующие 9 групп включали инбредных крыс WKY. Крысам группы 2б вводили накануне актометрии однократно подкожно скополамин, особям группы 5б – однократно внутрибрюшинно ареколин, животным группы 8б – однократно внутрибрюшинно МК-801. Инбредным крысам WKY групп 1б, 4б, 7б применяли растворитель (здесь и ниже – дистиллированная вода), эти особи служили контролем в проводимых экспериментах. Особям групп 3б, 6б, 9б фармакологические «зонды» вводили на фоне применения дипептида ИФБ-30 (крысам группы 3б – скополамин, группы 6б – ареколин, группы 9б – МК-801).

Результаты исследования. В результате построения хронограммы выявлено отсутствие четко сформированных циркадианных ритмов (24-часовых) ГДА и ВДА у крыс линий SHR и WKY. На фоне применения фармакологического «зонда» - м-холиноблокатора скополамина – у крыс линии SHR обнаружены достоверные циркадианные ритмы ГДА ($\phi = 13:15$), но не ВДА. Введение дипептида ИФБ-30 совместно со скополамином не оказывало влияния на вызванные скополамином изменения циркадианного ритма ГДА. В то же время имела место отчетливая модификация ИФБ-30ом биоритмов ВДА при его назначении вместе со скополамином. У инбредных крыс SHR, которым вводили названную комбинацию, зарегистрированы достоверные циркадианные ритмы ВДА ($\phi = 14:30$), в отличие от животных, которым применяли только скополамин. На фоне применения другого фармакологического «зонда» - агониста холинергической нейромедиаторной системы ареколина - у крыс линии SHR выявлены достоверные ритмы ГДА ($\phi = 23:54$), но не ВДА. Введение дипептида совместно с ареколином не влияло на формирование циркадианного ритма ГДА крыс SHR в сравнении с использованием м-холиномиметика. Блокатор NMDA-рецепторов МК-801 существенно не изменял биоритмы подвижности (ГДА) крыс SHR. Вместе с тем, введение комбинации МК-801 и ИФБ-30а способствовало формированию достоверного циркадианного ритма ГДА ($\phi = 9:14$). Фармакологические «зонды» ареколин и МК-801, а также их комбинации с дипептидом не влияли на циркадианные ритмы ВДА. У крыс линии WKY введение всех вышеперечисленных фармакологических «зондов» либо их комбинаций с дипептидом не модифицировало суточные циркадианные ритмы ГДА и ВДА.

У крыс линии SHR в контроле суточная горизонтальная и вертикальная активность была несколько выше, чем у крыс WKY (тенденция). Показано статистически достоверное увеличение суммарного 24-часового уровня ГДА (но не ВДА) у особей SHR под влиянием как скополамина, так и совместно применяемых ИФБ-30 и скополамина. Введение крысам WKY скополамина, ареколина, МК-801, а также их комбинаций с ИФБ-30 не оказывало существенного влияния на суммарные показатели ГДА и ВДА за 24 часа регистрации.

Назначение особям SHR скополамина и ареколина существенно изменяло значения акрофазы ритмов ГДА, а применение дипептида совместно с соответствующими «зондами» не препятствовало сдвигам указанного показателя. Применение ареколина и его комбинации с ИФБ-30 не вызывало сдвигов акрофазы ВДА у крыс линии SHR. ИФБ-30 у крыс SHR полностью предотвращал тенденцию к сдвигу акрофазы ВДА, индуцированному введением МК-801.

Продолжительность периода покоя по критерию «динамика снижения ГДА в сравнении с 1-м часом» у крыс линии SHR была достоверно выше, чем у крыс линии WKY. Введение скополамина существенно увеличивало продолжительность периода со сниженным уровнем ВДА (но не ГДА) у крыс SHR. На фоне применения скополамина совместно с дипептидом не происходило существенных изменений продолжительности периода со сниженным уровнем ГДА и ВДА относительно такового у особей, которым вводили скополамин. У крыс WKY изменения продолжительности периода покоя под действием скополамина, а также скополамина и дипептида не были достоверными. Введение

ареколина существенно уменьшало продолжительность периода покоя у крыс SHR (ГДА и ВДА) и у крыс WKY (только ГДА). Применение ИФБ-30 статистически значимо предотвращало эффекты указанного фармакологического «зонда» в отношении только ВДА - у крыс SHR; только ГДА – у крыс WKY. Введение МК-801 статистически достоверно уменьшало продолжительность периода со сниженным уровнем активности (ВДА, но не ГДА) у крыс SHR, не вызывая значимых эффектов в отношении того же показателя (ГДА, ВДА) у особей WKY. Применение дипептида совместно с МК-801 вело к существенному уменьшению относительно контроля продолжительности периода со сниженной активностью по критерию суточной динамики ГДА, не препятствуя при этом вызванным МК-801 изменениям 24-часовой динамики ВДА. У крыс линии WKY указанные изменения были не достоверными.

Заключение. Нейротропный дипептид ИФБ-30 оказывал отчетливое хронофармакологическое действие в отношении циркадианных ритмов двигательной активности, модулируемых введением м-холиноблокатора скополамина (суточные ритмы ВДА) и блокатора NMDA-рецепторов МК-801 (суточные ритмы ГДА). Перспективно дальнейшее исследование влияния ИФБ-30 на ритмы биологической активности млекопитающих.

ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF IFB-30 ON GLUTAMATE- AND CHOLINERGIC MECHANISMS OF REGULATION OF CIRCADIAN RHYTHMS OF BEHAVIOURAL ACTIVITY

Kravchenko E.V., Olgomets L.M., Zabrodotskaya K.V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

IFB-30 – one of neurotropic dipeptides – exerts chronopharmacologic effect relating to circadian rhythms of motor activity after the introduction of scopolamine as m-cholinergic antagonist (VMA daily rhythms) and МК-801 as NMDA receptor blocker (HMA daily rhythms). The further study of influence of IFB-30 on biological activity rhythms in mammals seems promissory.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩЕГО ДИПЕПТИДА ИФБ-30 НА ВЫРАБОТКУ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У КРЫС WISTAR

Кравченко Е.В., Понтелеева И.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141 г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: behaviour@academpharm.by

В последние десятилетия отмечается резкий рост числа исследований, посвященных изучению нарушений мнестико-интеллектуальных функций и способам их коррекции. К числу эффективных и безопасных средств, улучшающих когнитивные функции, относятся нейропептиды – эндогенные соединения, которым принадлежит важная роль в регуляции синаптической передачи, нейродегенеративных процессов. Известно, что особой устойчивостью в организме отличаются пептиды, в состав которых входит остаток (остатки) аминокислоты пролина, наличие которого защищает названные соединения от расщепления рядом протеиназ. Практическому применению пролинсодержащих нейропептидов в

медицинской практике препятствует недостаточная стабильность указанных соединений и быстрая деградация в организме, а также недостаточная проницаемость для них гематоэнцефалического барьера. В связи с этим возрастает интерес к их активным и более стабильным фрагментам.

Класс дипептидов характеризуется сравнительно высокой устойчивостью и специфической биодоступностью для мозга. Дипептиды эффективны при приеме внутрь вследствие высокой устойчивости к действию ферментов щеточной каймы энтероцитов кишечника. Известны пролин-содержащие дипептиды, улучшающие состояние больных с нарушениями функций головного мозга - N-капроил-L-пролил-L-тирозин и ноопепт. Последний широко применяется в качестве лекарственного препарата с ноотропным действием.

Ранее нами было показано облегчающее влияние нейротропного дипептида ИФБ-30 на неассоциативное обучение в тесте угашения исследовательско-ориентировочной реакции [1]. ИФБ-30 обладает свойствами ингибитора ангиотензинпревращающего фермента, что может обеспечить дополнительное лечебное действие, например, снижение артериального давления, у больных с нарушениями высших интегративных функций мозга на фоне артериальной гипертензии.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния пролинсодержащего дипептида ИФБ-30 на выработку условной реакции (УР) с негативным подкреплением у лабораторных грызунов с ненарушенным поведением (крысы Wistar). В задачи исследования входила оценка влияния дипептида ИФБ-30 на показатели, характеризующие способность к выработке условной реакции пассивного избегания (УРПИ) - латентный период перехода в темный отсек (*ЛП*), доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек, и продолжительность нахождения в светлом отсеке (*T_{св.}*).

Методы исследования. Исследование влияния пролинсодержащего дипептида ИФБ-30 на выработку УРПИ проводили на крысах-самцах Wistar ($n=15$, средняя масса $186,4 \pm 7,3$ г) в возрасте 2-х месяцев, полученных из отдела биологических моделей ИФБ НАН Беларуси. В качестве модели обучения с негативным подкреплением использовали УР пассивного избегания ударов электрического тока. Эксперименты проводили с использованием экспериментальной установки, представляющей собой камеру, разделенную перегородкой на 2 отсека размером $24 \times 23 \times 23$ см с электродным полом, один из которых освещался сверху лампой мощностью 1 люкс. Светлый отсек сообщался с темным отсеком прямоугольным отверстием размером 7×8 см.

Животным основной группы (группа №2, $n=8$) однократно за 60 мин до обучения внутрибрюшинно применяли ИФБ-30 в дозе 0,5 мг/кг, крысы контрольной группы (группа №1, $n=7$) получали растворитель (дистиллированная вода).

На этапе I у животных проводили выработку УРПИ. Крысу помещали в освещенный отсек камеры хвостом к отверстию. После того, как животное вследствие норкового рефлекса совершало переход в темный отсек, закрывали металлическую дверь и на лапы животного подавали электрический ток (0,5 мА в течение 2 с). Животных, не совершивших переход в темный отсек, исключали из эксперимента. Указанный режим подкрепления обеспечивал выработку УРПИ лишь у незначительного числа животных в контроле (режим недостаточной обученности – *undertraining*). Известно, что ноотропные средства неэффективны у субъектов с хорошо выраженными памятью и обучаемостью. Низкоинтенсивная аверсивная стимуляция позволяла моделировать «дефицит обученности» у молодых здоровых животных, что, в свою очередь, давало возможность выявить ноотропное действие тестируемого соединения.

Через 24 ч после обучения осуществляли воспроизведение УР (этап II), при этом повторяли процедуру выработки навыка без болевого подкрепления. Переход считали

завершенным, когда животное пересекало линию перегородки всеми 4-мя лапами. Если за 180 с крыса не переходила в темный отсек, считали, что *ЛП* составляет 180 с.

Основными критериями оценки влияния пролинсодержащего дипептида ИФБ-30 на способность к выработке УР являлись: *ЛП*, $T_{св}$ и доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек. Увеличение на этапе II значений первых двух из названных показателей и снижение третьего под действием тестируемого вещества свидетельствует о его облегчающем действии на выработку УР [2, 3].

Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики для множественных сравнений. Анализ данных предшествовала проверка распределений значений показателей на соответствие их критериям «нормальности». В случае нормального распределения применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA или ANOVA для повторных измерений, в противном случае – критерий Крускала-Уоллиса или критерий Уилкоксона. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Excel 2000, Statistica 6.0, Biostat.

Результаты. На первом этапе эксперимента все животные характеризовались умеренно выраженной исследовательско-ориентировочной реакцией, перемещались по камере и совершали переход через отверстие в перегородке (значения *ЛП* в группах №1 и №2 составили $22,3 \pm 6,0$ с и $32,4 \pm 13,2$ с, соответственно; таблица).

В условиях тестирования сохранности УРПИ через 24 часа (этап II) большинство животных контрольной группы (85,7%) забывали о полученном болевом раздражении и заходили в темную камеру. Значения показателей *ЛП* и $T_{св}$ в контроле на этапе II значимо не отличались от таковых на этапе I ($P > 0,05$, критерий Уилкоксона; таблица).

Применение ИФБ-30 способствовало улучшению способности к выработке УР. Большинство животных группы №2 помнили об электрическом стимуле, нанесенном в предпочитаемом отсеке, и оставались в освещенной части установки. Так, доля животных в названной группе, совершивших переход в темный отсек, составила менее половины от общего числа особей в группе (37,5%; таблица). Значения $T_{св}$ у животных основной группы существенно превышали таковые в контроле – в 2,3 раза ($P < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса; таблица). У крыс названной группы статистически значимо повысились по сравнению с уровнем этапа I значения показателей *ЛП* и $T_{св}$ (в 4,0 и 4,8 раза, соответственно, $P < 0,05$, критерий Уилкоксона; таблица).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о достоверном облегчающем эффекте ИФБ-30 (0,5 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) на выработку УРПИ у молодых крыс Wistar с ненарушенным поведением в условиях применения низкого уровня аверсивного (электроболевого) подкрепления. Целесообразно продолжение исследований влияния ИФБ-30 на ассоциативное обучение в психофармакологических экспериментах.

Таблица.

Влияние пролинсодержащего олигопептида ИФБ-30 на выработку УРПИ у крыс Wistar

Показатель	Этап	Группа №1 (n=7)	Группа №2 (n=8)
<i>ЛП</i> , с	I	$22,3 \pm 6,0$	$32,4 \pm 13,2$
	II	$47,4 \pm 22,4$	$128,9 \pm 26,3$ *
Доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек, %	I	100,0 (7/7)	100,0 (8/8)
	II	85,7 (6/7)	37,5 (3/8)

$T_{св.}, с$	I	22,3±6,0	32,4±13,2
	II	66,7±20,3	155,1±13,4 * [×]

Примечания: 1. I - обучение; II – воспроизведение через 24 часа. 2. Различия статистически достоверны по сравнению: * - с уровнем этапа I, $P < 0,05$, критерий Уилкоксона; [×] - с контролем, $P < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса.

Литература:

1. Кравченко, Е.В. Изучение ноотропной активности соединения ИФБ-30 в отношении дисаботуации у крыс линии SHR / Е.В. Кравченко, Л.В. Максимова Экология и животный мир. - 2009. - №1-2. – С. 128-134.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 308-319.
3. Сравнительная активность ноопепта и пирацетама на модели интрацеребральной посттравматической гематомы / К.С. Ус, В.А. Крайнева, И.П. Галаева, Т.Л. Гарибова, Р.У. Островская, Т.А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. – 2006. - Т. 6, Выпуск 1–2. – С.1156-1163.

STUDY OF EFFECT OF PROLINE-DIPEPTIDES IFB-30 ON PASSIVE AVOIDANCE RETENTION IN WISTAR RATS

Kravchenko E.V., Ponteleeva I.V.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The data of study show that the proline-dipeptide IFB-30 (0.5 mg/kg, intraperitoneally) exerts verifiable facilitating effect on passive avoidance retention in young Wistar rats with undisturbed behavior. It seems expedient to continue the study of IFB-30 effect on the associative learning in psychopharmacologic experiments.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАД «НООТРИЦИН» НА ВЫРАБОТКУ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У КРЫС ЛИНИИ SHR

Кравченко Е.В., Понтелеева И.В., Петров П.Т.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141 г. Минск, ул. академика В.Ф.

Купревича, 2, E-mail: behaviour@academpharm.by

В последние десятилетия отмечается устойчивая тенденция возрастания числа пациентов с расстройствами когнитивного и амнестического характера, преимущественно за счет группы больных 60-80 лет. Не менее важным является рост нарушений памяти, речи и мышления в педиатрической практике (отставание в развитии). Указанный феномен представляет достаточно серьезную проблему как в социальном, так и в экономическом плане.

Несмотря на продолжительные усилия ученых, до сих пор не решена проблема разработки достаточно эффективного ноотропного средства, способного существенно

улучшить состояние больных с когнитивными нарушениями. Одним из путей повышения эффективности терапии является комбинированное использование лекарственных средств, характеризующихся различными механизмами действия на память и интеллектуальные способности.

Известно, что использование α -липоевой кислоты позволяет ослабить проявления когнитивных нарушений, связанных с процессами старения, у мышей линии SAMP8 в условиях тестирования в Т-лабиринте, не влияя при этом на двигательную активность [1]. Комбинация α -липоевой кислоты и ацетил-L-карнитина улучшает пространственную память у крыс в водном лабиринте Морриса [1]. Мнемотропный эффект этой комбинации связан со снижением уровня перекисного окисления липидов, белков, окислительного повреждения ДНК и РНК, а также митохондриальной дисфункции в клетках головного мозга, которые играют важную роль в патогенезе таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, паркинсонизм и др. [1]. С учетом приведенных выше данных [1], в ИФБ НАН Беларуси разработана биологически активная добавка «Ноотрицин» в виде капсул, содержащих в качестве активных ингредиентов α -липоевую кислоту, N-ацетил-L-карнитин и экстракт гинкго билоба, предназначенная для приема внутрь в качестве нейрокорректорного и восстанавливающего средства.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния БАД «Ноотрицин» на выработку условной реакции пассивного избегания (УРПИ) в условиях моделирования амнезии, вызванной действием максимального электрошока (МЭШ), у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR. В *задачи* исследования входила оценка влияния БАД «Ноотрицин» на показатели, характеризующие способность к выработке УРПИ - латентный период перехода в темный отсек (*ЛП*), доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек, и продолжительность нахождения в светлом отсеке (*T_{св.}*).

Методы исследования. Исследование влияния БАД «Ноотрицин» на выработку УРПИ проводили на инбредных крысах-самцах SHR (n=41, средняя масса 98,7±1,6 г) в возрасте 5-6 недель, полученных из отдела биологических моделей ИФБ НАН Беларуси. Животные названной линии служат экспериментальной моделью для изучения когнитивной дисфункции на фоне гипертонической болезни в разнообразных тестах, связанных с памятью и обучаемостью, включая условное избегание и пространственное обучение [2].

Эксперименты проводили с использованием экспериментальной установки, представляющей собой камеру, разделенную перегородкой на 2 отсека размером 24 × 23 × 23 см с электродным полом, один из которых освещался сверху лампой. Светлый отсек сообщался с темным отсеком прямоугольным отверстием размером 7 × 8 см.

Все животные были разделены на 5 экспериментальных групп. Особям основных групп (№2 - №5) подостро применяли «Ноотрицин» в дозах, соответствующих дозам α -липоевой кислоты 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 5,0 мг/кг и 10,0 мг/кг, соответственно (режим введения – 1 инъекция в сутки, 5 дней в неделю). Крысы контрольной группы (№1) получали растворитель (дистиллированная вода) в том же режиме. На момент 6-го введения образцов проводили выработку УР пассивного избегания (этап I). Через 30 минут после перорального введения образцов крысу помещали в освещенный отсек камеры хвостом к отверстию. После того, как животное вследствие норкового рефлекса совершало переход в темный отсек, закрывали металлическую дверь и на лапы животного подавали электрический ток (0,5 мА в течение 2 с). Животных, не совершивших переход в темный отсек, исключали из эксперимента.

Сразу после нанесения электроболевого подкрепления у животных моделировали амнезию посредством нанесения МЭШ через электроды, наложенные на поверхность ушных раковин (200 Hz, 60 mA, 0,4 c) [3].

Через 24 ч после обучения осуществляли воспроизведение УР (этап II), при этом повторяли процедуру выработки навыка, включая введение исследуемых образцов, но на

этот раз переход животного в предпочитаемый отсек не сопровождался аверсивным подкреплением. Переход считали завершенным, когда животное пересекало линию перегородки всеми 4-мя лапами. Если за 180 с крыса не переходила в темный отсек, считали, что *ЛП* составляет 180 с.

Основными критериями оценки влияния БАД «Ноотрицин» на способность к выработке УР являлись: *ЛП*, *T_{св.}* и доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек. Увеличение на этапе II значений первых двух из названных показателей и снижение третьего под действием тестируемой БАД свидетельствует о его облегчающем действии на выработку УР [4, 5].

Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики для множественных сравнений. Анализ данных предшествовала проверка распределений значений показателей на соответствие их критериям «нормальности». В случае нормального распределения применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA или ANOVA для повторных измерений, в противном случае – критерий Крускала-Уоллиса или критерий Уилкоксона. Для оценки межгрупповых различий по показателю доли животных в группе, совершивших переход в темный отсек, использовали точный критерий Фишера. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Excel 2000, Statistica 6.0, Biostat.

Результаты. На первом этапе эксперимента все животные характеризовались умеренно выраженной исследовательско-ориентировочной реакцией, перемещались по камере и совершали переход через отверстие в перегородке (значения *ЛП* в группах №1 - №5 составили от 43,5±8,6 с до 60,4±21,1 с; таблица).

В условиях тестирования сохранности УРПИ через 24 часа (этап II) большинство животных контрольной группы (66,7%) забывали о полученном болевом раздражении и заходили в темную камеру. Такое поведение свидетельствовало о амнезии УРПИ, вызванной МЭШ.

На фоне использования «Ноотрицина» в исследуемых дозах отмечено повышение способности животных к выработке УР: практически все особи групп №2 - №5 помнили об аверсивном стимуле, нанесенном в темном отсеке, и предпочитали находиться в освещенной части установки. В названных группах доля животных, совершивших переход в темный отсек была статистически значимо ниже, чем в контроле ($P < 0,05$, точный критерий Фишера; таблица). Значения показателей *ЛП* и *T_{св.}* у крыс основных групп существенно превышали таковые в контроле ($P < 0,05-0,01$, критерий Крускала-Уоллиса; таблица).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что БАД «Ноотрицин», содержащий в качестве активных ингредиентов α -липоевую кислоту, N-ацетил-L-карнитин и экстракт гинкго билоба, обладает выраженным антиамнестическим эффектом в отношении выработки УРПИ в условиях моделирования нарушений памяти, вызванных МЭШ, у крыс линии SHR.

Таблица.

Влияние БАД «Ноотрицин» на выработку УРПИ у крыс линии SHR

Показатель	<i>ЛП</i> , с		Доля животных в группе, совершивших переход в темный отсек, %		<i>T_{св.}</i> , с	
	I	II	I	II	I	II
Группа №1 (n=9)	60,4±21,1	144,3±21,2 *	100 (9/9)	66,7 (6/9)	60,4±21,1	155,2±14,3 _£

Группа №2 (n=8)	47,4±7,3	180,0±0,0 **##	100 (8/8)	0,0 (0/8) ×	47,4±7,3	180,0±0,0 [£] #
Группа №3 (n=8)	49,3±5,9	180,0±0,0 **##	100 (8/8)	0,0 (0/8) ×	49,3±5,9	180,0±0,0 [£] #
Группа №4 (n=8)	43,5±8,6	167,1±12,9 **##	100 (8/8)	12,5 (1/8)	43,5±8,6	176,3±3,8 [£] #
Группа №5 (n=8)	47,0±4,1	180,0±0,0 **##	100 (8/8)	0,0 (0/8) ×	47,0±4,1	180,0±0,0 [£] #

Примечания: 1. I - обучение; II – воспроизведение через 24 часа. 2. Различия статистически достоверны по сравнению: * - с уровнем этапа I, $P < 0,05$, ANOVA для повторных измерений, ** - то же, $P < 0,01$; # - с контролем, $P < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса, ## - то же, $P < 0,01$; × - с контролем, $P < 0,05$, точный критерий Фишера; £ - с уровнем этапа I, $P < 0,05$, критерий Уилкоксона, $P < 0,05$.

Литература:

1. Liu, J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient α -lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview / J. Liu // *Neurochem. Res.* – 2008. - №33. – P.194–203.
2. Hernandez, C. M. Spontaneously hypertensive rats: further evaluation of age-related memory performance and cholinergic marker expression / C.M. Hernandez, H. Hoifodt, A.V. Terry // *J. Psychiatry Neurosci.* – 2003. – Vol. 28, №3. – P. 197–209.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 308-319.
4. Кравченко, Е.В. Изучение ноотропной активности соединения ИФБ-30 в отношении дисабутиации у крыс линии SHR / Е.В. Кравченко, Л.В. Максимова *Экология и животный мир.* - 2009. - №1-2. – С. 128-134.
5. Сравнительная активность ноопепта и пираретама на модели интрацеребральной посттравматической гематомы / К.С. Ус, В.А. Крайнева, И.П. Галаева, Т.Л. Гарибова, Р.У. Островская, Т.А. Воронина // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2006. - Т. 6, Выпуск 1–2. – С.1156-1163.

STUDY OF EFFECT OF FOOD ADDITIVE «NOOTRICINE» ON PASSIVE AVOIDANCE RETENTION IN SHR RATS

Kravchenko E.V., Ponteleeva I.V., Petrov P.T.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The data of study show that the food additive «Nootricine» containing as active ingredients α -lipoic acid, N-acetyl-L-carnitine and extract of *Ginkgo biloba* exerts expressed anti-amnesic effect in relation to passive avoidance retention in the conditions of modeling of MES-induced memory disturbances in SHR rats.

НОВЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСТЕРОИДНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ И АНТИБИОТИКОВ

Кукса О.И., Гулевич А.Л., Ковалевич В.А.

*Белорусский государственный университет, 220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 4,
E-mail: nefutbol@yandex.ru*

Жидкостная экстракция является одним из наиболее эффективных методов извлечения веществ из водных растворов. Анионообменные экстракционные системы на основе растворов четвертичных аммониевых солей в несмешивающихся с водой органических растворителях широко используются для экстракционного извлечения различного рода анионов, а также для проведения экстракционно-фотометрических и потенциометрических измерений.

Для повышения селективности анионообменного экстракционного извлечения используют либо анионообменные экстрагенты специальной структуры (например, с повышенной доступностью к катионному центру для извлечения одних анионов и, наоборот, с заблокированным катионным центром при экстракции других), либо оптимальный (в зависимости от природы извлекаемого аниона) растворитель ЧАС.

Однако наиболее эффективным путем повышения эффективности ионообменного экстракционного извлечения является использование в фазе экстрагента наряду с жидким анионообменником так называемых нейтральных переносчиков – производных трифторацетилбензола $R-C_6H_5-CO-CF_3$. Такого рода соединения, имеющие жесткий электрофильный центр на атоме углерода карбонильной группы, хорошо сольватируют анионы и тем самым способствуют их экстракции в органическую фазу.

Установлено, что нитро- и хлорпроизводные трифторацетилбензола выполняют роль сольватирующих добавок относительно анионов анальгетиков и антибиотиков и позволяют до 5 порядков увеличить соответствующие константы экстракции и тем самым резко повысить селективность и чувствительность их определения. Экстракционно-фотометрическим методом установлены составы образующихся в органической фазе сольватов, рассчитаны константы сольватации и средние сольватные числа.

Рассмотрены существующие методы анализа нестероидных анальгетиков – производных фенилпропионовой, фенилуксусной, индолуксусной и антраниловой кислот (ибупрофена, ортофена, напроксена, индометацина, кетопрофена), а также антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового ряда (ампициллина, бензилпенициллина, оксациллина, цефазолина и др.) Отмечены недостатки и преимущества ВЭЖХ-метода, потенциометрии, экстракционной фотометрии, используемых для определения такого рода веществ.

Нами в качестве простого и надежного метода определения карбоксилсодержащих анальгетиков и антибиотиков в таблетках, мазях и растворах для инъекций предложен экстракционно-фотометрический метод, основанный на анионообменной экстракции этих веществ высокоселективным экстрагентом – комбинированным раствором пикрата тринилоктадециламмония и динитрохлортрифторацетилбензола в органическом растворителе.

Проведено сравнительное количественное определение ряда анальгетиков и антибиотиков в лекарственных препаратах (таблетках и растворах для инъекций) и показана полная сходимость полученных результатов с ВЭЖХ-методом, используемым в качестве референтного.

NEW REAGENTS FOR DETERMINATION OF NON-STEROIDAL

ANALGETICS AND ANTIBIOTICS

Kuksa V.I., Gulevich A.L., Kovalevich V.A.

Belarussian State University, 220050, Minsk, Leningradskaya str.,4

Simple and valid extraction-photometrical method for determination of carboxylate-containing analgetics and antibiotics in tablets, ointments and injection solutions was proposed. The method is based on anion-exchange extraction of these substances with highly selective extragent – combined solution of trinonyloctadecylammonium picrate and dinitrochlorotrifluoroacetylbenzene in organic solvent.

Comparative determination of a number of analgetics and antibiotics in pharmaceutical forms (tablets and injection solutions) was conducted. Complete convergence of the obtained results with HPLC method used as a referent method was shown.

СРАВНЕНИЕ УРОВНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ ХЛОРИНОВ В АКТИВИРОВАННЫХ И ПОКОЯЩИХСЯ Т-КЛЕТКАХ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ

^{1,2}Логацкая М.А., ¹Савицкий В.П., ¹Афанасенко Д.А., ²Зорин В.П.

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, 223040, Минский р-н, пос. Лесной, Беларусь,

E-mail: Savitskiy_V@mail.ru;

²Белорусский государственный университет, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, Беларусь

Введение. Реакция трансплантат-против-хозяина (graft-versus-host реакция, РТПХ) является одним из основных побочных эффектов при пересадке пациенту гематopoэтических стволовых клеток костного мозга и развивается в 50% случаев. Неселективная элиминация всей популяции зрелых Т-лимфоцитов долгое время рассматривалась как мера предупреждения РТПХ, но такой подход ведет к побочным эффектам (повышение риска отторжения трансплантата и развитие инфекционных осложнений)[1]. По этой причине актуальным является поиск методов избирательной элиминации аллореактивных Т-лимфоцитов. Одним из перспективных способов решения этой задачи является фотодинамическая терапия (ФДТ), в основе которой лежит комбинированное воздействие на патологические клетки и ткани сенсibilизаторов и видимого лазерного света. Целью работы является оценка возможности использования порфириновых сенсibilизаторов хлорина е6 и его диметилового эфира для избирательного фотодинамического воздействия на активированные Т-лимфоциты пациентов с острыми лейкозами после пересадки костного мозга и здоровых доноров. Данные сенсibilизаторы обладают высокими коэффициентом экстинкции в красной области спектра и квантовым выходом синглетного кислорода (0,5 – 0,6). На их основе разработаны отечественные препараты для фотодинамической терапии, успешно прошедшие клинические испытания.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были выбраны сенсibilизаторы хлорин е6 (Хл е6) и диметилловый эфир хлорина е6 (ДМЭ). Исходные растворы фотосенсibilизаторов готовили в ацетоне, концентрацию определяли по величине оптической плотности на 664 нм и 663 нм для Хл е6 и ДМЭ, коэффициент молярной экстинкции 50000 см⁻¹ М⁻¹ и 54000 см⁻¹ М⁻¹ соответственно. Мононуклеарные клетки периферической крови доноров и пациентов после трансплантации костного мозга выделяли центрифугированием в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma). Клеточную суспензию помещали в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4). Жизнеспособность клеток перед проведением

исследований составляла не менее 95%. Иммунофенотипический анализ клеток проводили с использованием моноклональных антител (МКА). Окраску клеток МКА, меченными флуоресцеинизотиоцианатом и фикоэритрином, проводили по стандартной методике.

Для исследования процессов накопления порфирины предварительно инкубировались в ФСБ с 3% добавлением эмбриональной сыворотки телят (ЭСТ) в течение 40 мин при температуре 37°C в темноте (концентрация пигмента $3 \cdot 10^{-6}$ М). Затем сывороточный раствор сенсibilизатора добавлялся к мононуклеарным клеткам, окрашенным МКА, и клетки инкубировались при тех же условиях. Через определенные интервалы времени отбиралась аликвота суспензии клеток для проведения цитометрического анализа.

Исследование процессов накопления Хл еб и ДМЭ проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). В качестве источника возбуждения использовался аргоновый лазер с длиной волны 488 нм (15 мВт). Интенсивность флуоресценции и светорассеяния регистрировали с использованием системы оптических фильтров для отсекающего фонового сигнала и выражали в относительных единицах. Обработку полученных данных проводили с использованием статистических пакетов цитометра CellQuestPro. С использованием стандартных методов иммунофенотипирования выделяли пулы покоящихся и активированных *in vivo* Т-лимфоцитов. Для каждой популяции определяли средний уровень интенсивности флуоресценции пигмента. Для исследования фотодинамического повреждения клетки инкубировались в присутствии ДМЭ ($3 \cdot 10^{-6}$ М) и 3% ЭСТ, затем клетки дважды отмывали ФСБ. Образцы клеток облучали диодным лазером ИЛМ-660-0,5 ($\lambda=660$ нм) производства ЛЭМТ (Минск, Беларусь) при постоянном перемешивании. Затем проводили цитометрический анализ повреждения клеточной мембраны по степени накопления ДНК-специфичного зонда пропидиум иодида. Для этого образцы клеток окрашивали раствором PI 10 минут при комнатной температуре.

Результаты. Выделение популяции лимфоцитов проводилось по параметрам прямого и бокового светорассеяния, положительно коррелирующих с размерами клетки и гранулярностью цитоплазмы соответственно. Из суммарной фракции лимфоцитов выделялись Т-клетки интенсивно окрашенные МКА CD3, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом. Т-лимфоциты, в свою очередь, по степени окраски МКА HLA-DR, меченного фикоэритрином, разделялись на активированные и покоящиеся. При таком подходе исключается анализ клеток, не относящихся к субпопуляциям Т-лимфоцитов.

Хлеб и ДМЭ обладают практически идентичными спектрально-флуоресцентными характеристиками, что позволяет использовать для оценки уровня накопления сенсibilизаторов в клетке величину интенсивности флуоресценции на 660 нм.

Установлено, что при инкубации клеток в присутствии исследуемых порфиринов происходит более интенсивное окрашивание активированных Т-лимфоцитов, чем покоящихся. Такой характер накопления наблюдается для клеток периферической крови как здоровых доноров, так и пациентов после трансплантации костного мозга. Для Хл еб средний уровень интенсивности флуоресценции в активированных Т-лимфоцитах здоровых доноров в 1.2 превосходит такую величину для покоящихся клеток. Аналогичное соотношение для ДМЭ составляет 1.4.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, опубликованными ранее при сравнении процессов накопления в активированных и покоящихся лимфоцитах других порфириновых фотосенсibilизаторов. Активация Т-лимфоцитов, вызванная различными факторами (конкавалином А, антителами к CD3), приводит к повышенному накоплению клетками производной бензопорфирина – вертепорфина [2,3]. Можно предположить, что одной из причин повышенной аффинности Хл еб и его производных к активированным клеткам являются структурные перестройки лимфоцитов. Процесс активации Т-клетки сопровождается существенными структурными и морфологическими изменениями: растет объем и степень гранулированности цитоплазмы, изменяется липидный состав

цитоплазматической мембраны и растет общий объем мембранных структур[4]. Изменение липидного состава цитоплазматической мембраны активированных клеток также может играть существенную роль в регуляции связывания порфириновых сенсibilизаторов. Было показано, что сродство Хл еб и его производных к модельным и клеточным мембранам сильно зависит от относительного содержания холестерина и некоторых структурных параметров липидного бислоя[56]. В этой связи пониженное содержание холестерина и обусловленная этим пониженная вязкость мембраны, присущие активированным клеткам, может рассматриваться как один из основных факторов избирательного накопления Хл еб и ДМЭ в активированных Т-лимфоцитах. Кроме изменения липидного состава мембраны, для активированных Т-клеток характерны интенсифицированные процессы обмена с внешней средой и накопление белков плазмы, в частности, липопротеинов низкой плотности. Поскольку значительная часть порфириновых сенсibilизаторов, в особенности ДМЭ, при введении в плазму связывается с липопротеинами низкой плотности[57], можно предположить, что ускоренное накопление данных белков активированными клетками приводит к повышенному накоплению Хл еб и ДМЭ.

Полученные данные свидетельствуют о различной способности исследуемых сенсibilизаторов связываться с Т-лимфоцитами. Уровень накопления ДМЭ в 2.4 и 2.1 раза превосходит уровень накопления Хл еб в клетках пациентов после трансплантации костного мозга и здоровых доноров соответственно. Обнаруженные различия в степени сродства Хл еб и ДМЭ к клеткам могут быть связаны с особенностями физико-химических характеристик сенсibilизаторов. У ДМЭ две карбоксильные группы этерифицированы метильными. Такое изменение химической структуры не затрагивает спектрально-флуоресцентных свойств ДМЭ, но понижает его полярность по отношению к Хл еб. Неполлярная структура ДМЭ позволяет молекулам более быстро диффундировать через мембрану клетки и обеспечивает повышенное по сравнению с Хл еб сродство ДМЭ к клеткам[5].

В связи с более высокой степенью накопления ДМЭ в белых клетках этот сенсibilизатор был выбран для исследования фотоиндуцированного повреждения Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Темновая инкубация клеток в сывороточном растворе ДМЭ, а также облучение не нагруженных порфирином клеток в широком интервале экспозиционных доз не приводит к снижению жизнеспособности Т-лимфоцитов и изменению их активационного статуса. Установлено, что активированные Т-лимфоциты более подвержены фотодинамическому воздействию, чем покоящиеся. При облучении суммарной фракции Т-лимфоцитов дозой 0,32 Дж/см² процент погибших активированных клеток в 2.7 раза превышает процент погибших покоящихся Т-лимфоцитов. При увеличении дозы различия в фотоиндуцированном повреждении несколько снижаются. Установлено, что степень повреждения клеток не зависит от мощности лазерного облучения и определяется только экспозиционной дозой.

Заключение. Уровень накопления порфириновых сенсibilизаторов в Т-лимфоцитах определяется как активационным статусом клетки (структурно-морфологическими свойствами клетки), так и физико-химическими свойствами пигментов. Селективность накопления порфиринового сенсibilизатора ДМЭ приводит к избирательному повреждению активированных лимфоцитов при фотодинамическом воздействии. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования порфириновых сенсibilизаторов в методах лечения иммунных заболеваний, связанных с избыточной активацией иммунокомпетентных клеток.

Литература:

O'Reilly R. G., Collins N. H., Kernan N / Transplantation of marrow depleted T cells by soybean lectin agglutination and E-rosette depletion: major histocompatibility complex related graft

resistance in leukemic transplant recipients // Transplantation Proceedings. - 1995. - Vol. 17, №. 1. – P. 455–461.

Hunt D. W. [et al.]/ Consequences of the photodynamic treatment of resting and activated peripheral T-Lymphocytes// Immunopharmacology. - 1999. - Vol. 41. – P. 31–44.

Hunt D. W., Levy G./Immunomodulatory aspects of photodynamic therapy //Exp. Opin. Investig. Drugs. - 1998. - Vol. 7. – P. 57-64.

Yarilin, A.A. Principles of immunology / A. A. Yarilin. - Moscow: Medicine, 1999. – 608 p.

Zorin V. P. [et al.]/The distribution of chlorine e6 derivatives in biological systems. Investigation of pH-effects//Proceedings of SPIE. - 1996. - Vol. 2625. – P. 146-155.

COMPARISON OF CHLORINS UPTAKE BY ACTIVATED AND RESTING T-LYMPHOCYTES AND THEIR SENSITIVITY TO PHOTODYNAMIC DAMAGE.

^{1,2}Logatskaya M.A., ¹Savitskij V.P., ¹Afanasenko D.A., ²Zorin V.P.

¹*Belarusian Center for Pediatric Oncology and Hematology, Lesnoy, Minsk region, 223040, Belarus;*

²*Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Ave., Minsk, 220030, Belarus*

The ability of intact activated and resting human peripheral blood T-lymphocytes to bind and retain photosensitizers with different physicochemical properties was estimated. The expression of T-lymphocyte markers and the fluorescence intensity of cell-associated chlorins were determined by flow cytometry at different time points of incubation with sensitizers. Activated T-lymphocytes accumulated higher amounts of chlorines as compared to their resting counterparts. Activated in vivo T-lymphocytes displayed approximately 1.2 and 1.4 times greater uptake of chlorin e6 and its dimethylether than resting cells. It was observed that T- lymphocytes with high expression of the activation marker (HLA-DR) uptook greater amounts of photosensitizers than cells with low HLA-DR expression. The selective phototoxicity chlorin e6 dimethylether of has been observed in activated lymphocytes.

КОРРЕКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ НА ФОНЕ РАЗДЕЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ СЕЛЕНОМЕТИОНИНА И ПАНТЕНОЛА

Лукиенко Е.П., Королёв П.М., Гроховская Т.Ч., Пеховская Т.А., Коваленчик И.Л.
Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК-50, E-mail: office@biochem.unibel.by

Иммобилизация является мощным стрессорным воздействием. Установлено, что при иммобилизации у животных увеличивается экскреция катехоламинов, кортикостерона, усиливаются процессы перекисного окисления липидов, повышается протеолитическая активность крови и тканей организма, что играет определенную роль в развитии катаболической фазы стресса [1, 2, 3, 4, 5]. В этой связи актуальной проблемой медицины является поиск лекарственных средств для преодоления негативных последствий стрессорных воздействий, обусловленных иммобилизацией целого организма.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка эффективности использования селенометионина (СМ), пантенола (ПЛ), и комплекса СМ+ПЛ для коррекции антиоксидантного статуса у крыс, подвергшихся воздействию иммобилизационного стресса (ИС).

Материалы и методы. Работа выполнена на 50 крысах-самцах массой 190-210 г. Экспериментальная модель включала 5 групп животных (по 10 особей в каждой): 1 - контроль (интактные крысы); 2 – контроль ИС; 3 – введение ПЛ; 4 – введение СМ; 5- введение комплекса СМ+ПЛ. Указанные выше биологически активные субстанции вводили внутривенно на протяжении 3-х дней в следующих дозах: ПЛ - 10 мг/кг; СМ - 200 мг/кг. Контрольным животным (2-я группа) вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентном количестве. Через 24 часа после последнего введения препаратов животных 2-5 групп подвергали воздействию ИС путем помещения на 3 часа в перфорированные пластиковые пеналы в положении на спине, после чего животных выводили из эксперимента путем декапитации. Для исследований забирали кровь, печень, слизистую оболочку желудка. В плазме крови и гомогенатах тканей определяли показатели антиоксидантного статуса и обмена глутамин общепринятыми методами.

Результаты исследования. Анализ полученных результатов показал, что в плазме и гемолизате крови подопытных животных, подвергшихся ИС, наблюдались достоверные изменения показателей окислительного стресса: увеличение концентрации тиобарбитурат-реагирующих продуктов (ТБРП), диметил-пара-фенилендиамин-реагирующих продуктов (ДФА-РП), снижение показателей содержания сульфгидрильных соединений. Введение ПЛ сопровождалось аналогичными изменениями. При введении СМ наблюдалась нормализация исследуемых показателей. Совместное профилактическое использование композиции СМ+ПЛ сопровождалось более выраженным протекторным действием на развитие окислительного стресса.

В гомогенатах печени и слизистой оболочки желудка ИС сопровождался достоверным повышением уровня содержания ТБРП и тиоловых групп. Раздельное введение ПЛ и СМ не оказало эффекта на показатели тиолового обмена. Сочетанное же применение этих препаратов (СМ+ПЛ) привело к снижению исследуемых показателей до нормальных величин. Содержание ТБРП в гомогенатах этих тканей снижалось при введении как ПЛ, так и СМ и достигало контрольных величин при их совместном введении.

Достоверное снижение содержания ТБРП в гомогенатах слизистой оболочки желудка по сравнению с группой ИС было отмечено только после введения комплекса СМ+ПЛ.

При моделировании ИС выявлено более интенсивное накопление нильского голубого эритроцитами крыс, что является индикатором их окислительного повреждения. Предварительное введение как ПЛ, так и СМ приводило к нормализации данного показателя. Однако наибольший эффект снижения абсорбции нильского голубого эритроцитами оказало сочетанное введение обеих субстанций (СМ+ПЛ), что свидетельствует о высоком антиоксидантном потенциале избранной композиции.

В печени крыс после иммобилизации животных наблюдались нарушения системы глутатиона, которые выразились в падении уровня восстановленного глутатиона, снижении активности глутатионредуктазы и повышении активности глутатион-S-трансферазы. Предварительное введение СМ сопровождалось повышением глутатионредуктазной

активности, однако это не компенсировало падения редокс-статуса клетки (GSH/GSSG) на фоне повышенной активности глутатион-S-трансферазы. Сочетанное введение СМ и ПЛ нормализовало активность данных ферментов до уровня, характерного для контрольных животных.

При изучении активности изоферментов глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах белых крыс не выявлено достоверных изменений показателя при введении протекторов по сравнению с контролем и группой ИС. Активность H_2O_2 -метаболизирующей ГПО в гомогенатах печени достоверно уменьшалась при введении СМ и комплекса СМ+ПЛ по сравнению с группой ИС.

Моделирование 3-часового иммобилизационного стресса (ИС) сопровождалось падением активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфатнезависимой глутаминазы (ФНГ), глутаматдегидрогеназы (ГлДг) в реакции с глутаматом при одновременной компенсаторной активации последнего в реакции с 2-оксоглутаратом в печени.

Предварительное введение СМ сопровождалось активацией фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), падением активности ГлДг в реакции с 2-оксоглутаратом, активность ГС и ГлДг в прямой реакции оставались выше контрольных значений.

Сочетанное применение СМ и ПЛ способствовало активации ФЗГ и ГлДг в обратной реакции. Активность ГС, ФНГ и ГлДг в реакции с 2-оксоглутаратом оставалась на уровне контрольных значений. В слизистой оболочке желудка ИС вызывал падение глутаминазной и глутаматдегидрогеназной активности. Введение СМ сопровождалось снижением активности ГС, ФЗГ, ГлДг в прямой и обратной реакциях. Введение композиции СМ+ПЛ также вело к снижению активности ГС, глутаминаз и ГлДг в прямой и обратной реакциях.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что моделирование ИС у животных сопровождается нарушениями в обмене глутамин, ведущими к усилению катаболических процессов и накоплению токсических продуктов. Предварительное назначение СМ и композиции СМ+ПЛ предотвращает накопление токсических продуктов в печени, усиливая их детоксикацию, но не в слизистой оболочке желудка.

Заключение. Таким образом, анализ приведенных выше результатов дает основание считать, что использование композиции СМ+ПЛ для коррекции антиоксидантного статуса при ИС является целесообразным и позволяет повысить резистентность животных к стрессорным воздействиям за счет снижения накопления продуктов оксидативного стресса в крови и печени, а также активации процессов детоксикации. На основе указанной композиции может быть создана рецептура биопротектора.

Литература:

1. Агаджанян Н.А. Адаптация и резервы организма. – М.: ФиС, 1983. – 175 с.
2. Анохин П.К. Очерки по физиологии функциональных систем. – М.: Медицина, 1975. – 447 с.
3. Ведяев Ф.П., Воробьева Т.М. Модели и механизмы эмоциональных стрессов. – Киев, Здоровья, 1983. – 135 с.
4. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и стресс-лимитирующие системы организма // Физиология адаптационных процессов. – М.: Медицина, 1986. – С. 421-422.
5. Селье Г. Стресс и сердечные инфаркты.// Клиническая медицина. – 1961. – Т. 39. - №11. – С. 38-43.

CORRECTION OF THE ANTIOXIDANT STATUS IN EXPERIMENTAL ANIMALS DURING IMMOBILIZATION STRESS CONCOMITANT WITH INDIVIDUAL AND COMBINED SELENOMETHIONINE AND PANTHENOL ADMINISTRATION

Lukienko Ye.P., Korolev P.M., Grokhovskaya T.Ch., Pekhovskaya T.A., Kovalenchik I.L.

The experiments on 50 male rats were used to study the preventive efficiency of intragastric administration of selenomethionine (200 µg/kg) and panthenol (10 mg/kg), as well as the selenomethionine + panthenol complex to correct the antioxidant status in rats subjected to immobilization stress (placing the animals in a spinal position in plastic boxes for 3 h). It was found that the selenomethionine + panthenol complex has the most pronounced antioxidant and detoxication effects.

VACCINIUM CORYMBOSUM L. КАК ИСТОЧНИК АНТОЦИАНОВЫХ ПИГМЕНТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Макаревич А.М., Спиридович Е.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Республика Беларусь, Минск, ул. Сурганова 2 в, E-mail: a_makarevich@tut.by

Антоцианы – класс окрашенных флавоноидов, обеспечивающих оранжевую, красную, фиолетовую и пурпурную окраски различных вегетативных органов растений. Антоцианы синтезируются из своих агликонов, антоцианидинов (пеларгонидин, цианидин и дельфинидин) после объединения с гликозильной, ацильной и метильной группами в различных комбинациях. Гликозиды из состава антоцианов не проходят через клеточную мембрану, поэтому основу активности экстрактов составляют именно антоцианидины. Исследования последних лет показали, что антоцианы проявляют широкий спектр биологической активности, включая антиоксидантное, противовоспалительное, противомикробное, антиканцерогенное действия. Известно, что антоцианы обладают фармакологическими свойствами и используются человеком для терапевтических целей. Исследования показали, что экстракты пигментов являются более эффективными, чем О-(β-гидроксиэтил) рутин при снижении проницаемости капилляров, повышении их ломкости, и обладают более сильными противовоспалительным и противоотечным действиями. Поэтому предполагается, что антоцианы могут заменять рутин и его производные во время лечения данных заболеваний. Антоцианы оказывают благотворное влияние на вены и артерии благодаря стабилизации фосфолипидов эндотелиальных клеток и стимулированию синтеза коллагена и мукополисахаридов, которые придают структурную целостность стенкам артерий. Данные соединения предупреждают агрегацию и прилипание тромбоцитов к эндотелиальным поверхностям [1].

Антоцианы и их агликоны по данным исследований проявляют сильную антирадикальную активность в системе генерирующей супероксид анион и выступают как ингибиторы перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс [2]. Цианидин и дельфинидин хлориды при оценке их антиокислительной активности более эффективно дезактивируют свободный радикал DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) в сравнении с кверцетином.

Антоциановые пигменты, извлекаемые из плодов рода *Vaccinium* L., способствуют улучшению зрения вследствие того, что оказывают влияние на синтез светочувствительного пигмента родопсина в фоторецепторах тканей глаза, предупреждают развитие катаракты благодаря подавлению патологической альдозно-редуктазной активности в тканях хрусталика [1]. Было продемонстрировано, что богатые антоцианами экстракты могут предотвратить вызванное светом фотоокисление избыточного ретиналя, который взаимодействует с одним из трех основных фосфолипидов в фоторецепторной мембране

диска – фосфатидилэтаноломином. В результате в мембране образуется т.н. бис-ретиналиден-фосфатидилэтанолламин (A2E-PE), который служит предшественником крайне фототоксичного соединения – бис-ретинилиден-этанолламина (A2E) [3]. На основании этих свойств антоцианов разработаны биологически активные добавки антоциан форте, живая клетка VII, фокус, стрикс, окулист, черника–форте и др.

Количественный анализ антоцианов в растительном сырье весьма сложен, так как они легко подвергаются структурным деформациям и вступают в реакции комплексообразования с ионами K, Mg и Ca, изменяя при этом окраску, окислительной конденсации (может проходить самопроизвольно, ферментативным, микробиологическим или др. путем) с образованием хинонов и полимеризации. Кроме того, затруднено их определение в связи с присутствием других флавоноидов похожей структуры.

Основная цель данного исследования – изучить возможность применения метода рН-дифференциальной спектрофотометрии для установления содержания антоциановых пигментов в плодах голубики высокорослой и выявить наиболее богатый антоцианами сорт *Vaccinium corymbosum* L. при выращивании в условиях Республики Беларусь для дальнейшего использования полученных результатов в производстве фармацевтической продукции.

В двадцати двух сортах *Vaccinium corymbosum* L. было проведено изучение количественного содержания антоциановых пигментов. Замороженные плоды в количестве около 3-3,5г. *Vaccinium corymbosum* L. измельчали в ступке. Для экстракции соответствующую навеску плодов помещали в пробирку и добавляли рассчитанный объем экстракционной смеси этанол – 3М HCl – вода. Экстракцию проводили в течение 30 минут под воздействием ультразвукового излучения, после чего оставляли на 16 часов при температуре 4°C. Полученные экстракты центрифугировали при 10000 об/мин и сохраняли при температуре 4°C до проведения измерений.

Количественное определение суммарного содержания антоциановых пигментов было проведено методом рН-дифференциальной спектрофотометрии. Оптическую плотность растворов определяли при 510 нм и 700 нм с соответствующим буфером в качестве раствора сравнения [4].

В результате измерения было рассчитано суммарное содержание антоциановых пигментов в 22 сортах плодов *Vaccinium corymbosum* L. Количественное содержание данных соединений в ягодах голубики высокорослой, варьировалось в диапазоне от 157,43±0,91 мг% до 659,83 ±1,02 мг%. На основании проведенных исследований было выяснено, что наибольшее количество антоциановых пигментов содержит сорт Northland (659,83 ±1,02 мг%).

Как результат исследований, показана эффективность и доступность использования методики рН-дифференциальной спектрофотометрии для количественной характеристики содержания антоциановых пигментов в плодах голубики крупноплодной, в том числе контроля качества при переработке данного растительного сырья в промышленных условиях для получения различной фармацевтической продукции.

Литература:

1. Head, K.A. Natural therapies for ocular disorders, part two: cataracts and glaucoma / K.A. Head // *Alternative Medicine Review*.- 2001.- Vol. 6, № 2.- P. 141-66.
2. Martín-Aragón, S. In vitro and In vivo Antioxidant Properties of *Vaccinium myrtillus* / S. Martín-Aragón, B. Basabe [et al.] // *Pharmaceutical Biology*.- 1999.- Vol. 37, No. 2. – P. 109-113.
3. Sparrow, J.R., A2E-epoxides Damage DNA in Retinal Pigment Epithelial cells: Vitamin E and Other Antioxidants Inhibit A2E-epoxide Formation / J.R. Sparrow, H.R. Vollmer-Snarr [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2003. - Vol. 278, № 20. – P. 18207-18213.

4. Jakobek, L. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juice / L. Jakobek, M. Seruga [et al.] // Deutsche Lebensmittel-Rundschau. - 2007. - Vol.103, № 2. - P. 58-64.

VACCINIUM CORYMBOSUM L. AS SOURCE OF THE ANTHOCYANIN PIGMENTS IN PRODUCE OF PHARMACEUTICAL PRODUCTION

Makarevich A.M., Spirydovich E.V.
The Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

Anthocyanins are coloured class of flavonoids. They are responsible for the orange, red, violet and purple colours of plants. Berries of *Vaccinium corymbosum* L. are rich in this biopigments. A simple, rapid and cost-saving method for the determination of total anthocyanins in *Vaccinium corymbosum* L. has been used. The method was based on pH-differential spectrophotometry. Perspectives of use berries of *Vaccinium corymbosum* L. as a source of anthocyanins for production of modern pharmaceuticals has been discussed.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАРМСУБСТАНЦИИ И ГОТОВОЙ ФОРМЫ ОСЕЛЬТАМИВИРА ФОСФАТА

Марьянкова Р.Ф., Казючиц О.А., Добыш И.И.

*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141 г. Минск, ул. академика
В.Ф. Купревича, 5/3, E-mail ifb@academpharm.by*

Микробиологический анализ фармсустанции и лекарственного средства может быть затруднен в случае, если исследуемое вещество в условиях проведения стандартных микробиологических испытаний обладает антимикробной активностью.

При создании отечественного противовирусного лекарственного средства на основе осельтамивира необходимость проведения микробиологических исследований потребовала осуществления разработки конкретных методик анализа с целью внесения в нормативную документацию по контролю качества субстанции и пероральной готовой лекарственной формы.

Действующее вещество - осельтамивира фосфат - при пероральном приеме подвергается гидролизу и превращается в активную форму — осельтамивира карбоксилат, который конкурентно и избирательно ингибирует нейраминидазу вирусов гриппа типа А и В. При ингибировании нейраминидазы нарушается способность вирусных частиц проникать внутрь клетки, а также выход вирионов из инфицированной клетки, что приводит к ограничению распространения инфекции в организме. Концентрации осельтамивира карбоксилата, необходимые для подавления активности нейраминидазы на 50%, находятся у нижней границы наномолярного диапазона.

По данным литературы осельтамивир (в форме, как фосфата, так и карбоксилата) *in vivo* не проявляет специфического антимикробного действия, однако концентрационные пределы при микробиологическом анализе *in vitro* существенно выше, что само по себе требует исключения проявления неспецифического (побочного) бактериостатического эффекта.

Дизайн проведенного исследования включал:

- первичный скрининг антибактериальной и противогрибковой активности фармсубстанции осельтамивира фосфата с использованием тест-культур бактерий и грибов *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) и *Candida albicans* (ATCC 885-653);
- подбор агентов и условий для ингибирования антибактериальной активности;
- установление условий проведения испытаний микробиологической чистоты фильтрационным методом, при котором исключается влияние продукта на рост контаминирующей микрофлоры.

Отбор проб производили асептическим способом, исключая микробное загрязнение из окружающей среды. Все лабораторные исследования были выполнены в условиях ламинарного бокса, что позволяло избежать случайной контаминации испытуемого продукта.

Для оценки выраженности антибактериального действия на тестовые микроорганизмы использовали ряд серийных разведений исследуемого продукта.

Было установлено, что фармсубстанция осельтамивира фосфата обладает выраженной антимикробной активностью в рабочем разведении 1:10 (конечная концентрация осельтамивира 0,25 М) и подавляет рост *Bacillus cereus*, более чем в 5 раз. В разведении 1:20 подавление роста тест-культуры было менее чем в 2 раза. При разведении 1:50 антимикробное действие не выявлялось.

Антимикробное действие фармсубстанции в отношении *Candida albicans* и *Escherichia coli* не выявлено.

При добавлении инактиватора антибактериальных агентов полисорбата 80 к буферизированному раствору хлорида натрия и пептона рН 7,0 в концентрации 50 г/л полностью снималось антимикробное действие фармсубстанции.

Подобраны условия и адекватные методические подходы для проведения мембранной фильтрации осельтамивира фосфата. Для этих целей использовали фильтрационную установку открытого типа со стерильными мембранными фильтрами с размером пор 0,45µm производства фирмы Millipore.

На каждый вид испытаний использовали навески субстанции и готовой лекарственной формы по 1,0 г. После растворения в буферизированном растворе хлорида натрия и пептона (рН 7,0), испытуемые пробы наносили на мембранные фильтры. Фильтр промывали тремя порциями по 100 мл буферизированного раствора хлорида натрия и пептона (рН 7,0).

Мембранные фильтры с осевшими микроорганизмами переносили на поверхность чашек Петри с мясопептонным агаром и агаром Сабуро, а для выявления контаминации энтеробактериями помещали в питательный лактозный бульон для обогащения, а через 2 часа - в среду обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. При каждом исследовании проводили контроль буфера и контроль используемых сред на стерильность. Температура и время инкубации для каждого вида микроорганизмов были определены эмпирически и, в основном, соответствовали фармакопейным требованиям.

В результате проведенных исследований разработана методика определения микробиологической чистоты фармсубстанции осельтамивира фосфата, которая внесена в нормативную документацию по контролю качества.

Ввиду того, что капсульная лекарственная форма противовирусного препарата содержит в своем составе нерастворимые вспомогательные компоненты, имеются ограничения для применения разработанной фильтрационной методики при микробиологическом анализе.

На основе результатов исследования способов инактивации неспецифического бактериостатического действия осельтамивира предложена методика определения микробиологической чистоты лекарственного средства, которая внесена в фармакопейную статью.

Анализ микробиологической чистоты субстанции и лекарственной формы осельтамивира специалистами референс-лаборатории подтвердил, что разработанные и описанные в нормативной документации по контролю методики воспроизводимы.

MICROBIOLOGIC ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCE AND ORAL DOSAGE FORM OF OSELTAMIVIR PHOSPHATE

Mar`yankova R. F., Kazyuchits O.A., Dobysh I.I.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 5/3, 220141, Minsk, Republic of Belarus

As a result of study of nonspecific bacteriostatic activity of oseltamivir phosphate, the methods of determining the microbiologic purity of its substance and oral dosage form have been developed and introduced into the regulations concerning the microbiologic analysis control.

ТРИАЗОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРИРОДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ - НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P-450

¹Михальчук А.Л., ¹Кисель М.А., ²Курман П.В.

¹*ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь, E-mail: lipmal@iboch.bas-net.by;*

²*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by*

Одним из наиболее прогрессирующих онкологических заболеваний женщин является рак молочной железы. Фармакологическими средствами профилактики и лечения этого заболевания помимо оперативного вмешательства и применения общих противоопухолевых (цитостатических) средств служат антиэстрогены (аминоглютетимид, тамоксифен, фарестон) [1, 2] и ингибиторы ароматазы (экземестан, форместан, фулвестрант, ворозол, анастрозол, летрозол) [3, 4] как ключевого фермента конверсии C¹⁹-андрогенов в ароматические C¹⁸-эстрогены в периферических тканях и, что важно, тканях опухоли. Ароматаза - комплекс цитохрома P450-гемо- и флавопротеинов, превращающий андростендион в эстрон. В физиологических условиях в периферических тканях посредством этого фермента образуется около 100 нг эстрогена за сутки. Принципиально важно отметить, что ароматаза не участвует в продукции глюкокортикоидов, андрогенов и минералокортикоидов, что исключает возможность нежелательного многостороннего гормонального дисбаланса. В настоящее время известно два типа ингибиторов ароматазы. Один – это стероидные аналоги андрогенов (экземестан, форместан, фулвестрант), отличающиеся необратимостью действия и вызывающие нежелательные последствия гормонального дисбаланса (суицидные). Другой - нестероидные противоопухолевые гормональные средства и антагонисты гормонов, производные имидазола и триазола (ворозол, анастрозол, летрозол), имеющие обратимый характер ингибирования, что делает их предпочтительными для применения в клинике. При этом средство гетероциклических азотистых оснований к ароматазе существенно уступает средству андрогенов, прогестинов или кортикоидов, что открывает возможность создания более эффективных ингибиторов ароматазы.

Современный органический синтез позволяет, с одной стороны, осуществить сочленение уже имеющихся молекул азолов с молекулами карбо- и гетероциклических соединений посредством либо ковалентных связей, либо алкильных, арильных, аралкильных или гетероатомных молекулярных фрагментов - спейсеров (spacers), а, с другой, - ввести азольный цикл в молекулы уже имеющихся карбо- или гетероциклических молекул аннелированием (наращиванием). Литературные данные позволяют утверждать, что более высокой активностью угнетения ароматазы обладают именно производные имидазолов и триазолов, присоединенные к гидрофобным сильнополярным молекулам посредством спейсеров. Следовательно, наиболее перспективными представляются имидазолильные или триазилильные производные низкомолекулярных биорегуляторов, например стероидов (кортикоидов, прогестин, андрогенов, холестанов или их гетероциклических аналогов), характеризующихся высоким сродством к белкам и белковым комплексам. Подход к получению таких производных заключается в нуклеофильном замещении атомов галогенов или остатков сульфоновых эфиров в соответствующих галогенидах или сульфонатах (мезилаты, тозилаты) [5] стероидов.

В качестве примеров такого подхода можно привести синтезы триазилильных производных прегнанового ряда. Так, при взаимодействии 17 α -гидрокси-21-йодпрегн-4-ен-3,20-диона с 4-амино-4H-1,2,4-триазолом образуется иодид 17 α -гидрокси-21-(1-(4-аминотриазилиль)прегн-4-ен-3,20-диона. Диазотирование последнего действием генерируемой *in situ* азотистой кислоты приводит к желаемому 17 α -гидрокси-21-(1-(1,2,4-триазилиль)прегн-4-ен-3,20-диону с общим выходом 78%. Применение аналогичного подхода к галогенидам или сульфонатам кортикостероидов, андрогенов или гетероциклических аналогов стероидов приведет к соответствующим триазилильным производным, представляющим интерес в качестве ингибиторов ароматазы периферических тканей и опухолевых клеток.

Очевидно, что идеальное фармацевтическое средство должно обратимо воздействовать только на один фермент из всего многообразия ферментов, присутствующих в организме, не вмешиваясь в функционирование других управляющих гомеостазом отдельной клетки и организма в целом. Именно на решение этой сверхзадачи современной фармакологии направлены разработки по созданию новых более эффективных и безопасных лекарственных средств, включая и разрабатываемые ингибиторы ароматазы.

Литература:

1. Моисеенко В.М., Семиглазов В.Ф., Тюляндин С.А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. Санкт-Петербург, 1997.
2. Горбунова В.А., Гарин А.М., Одинцов С.В., Козлов Д.В., Бычков М.Б., Добровольская Н.Ю., Базин И.Г., Мещеряков А.А. Аримидекс - новый нестероидный селективный ингибитор ароматазы // Современная онкология.- 2000.- Т. 2, №1.- С.13-20.
3. Plourde P.V., Yates R.A., Dukes M. Arimidex registered: A potent selective fourth-generation aromatase inhibitor // Breast Cancer Res. Treat.- 1994.- Vol. 30.- P.103-11.
4. Гершанович М.Л. Фемара (летрозол) — Новые возможности гормонотерапии больных местнораспространенным и диссеминированным раком молочной железы в менопаузе при исчерпанном эффекте тамоксифена или устойчивости к антиэстрогенам. НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Минздрава РФ, С-Пб. Интернет ресурсы: <http://www.med.by/methods/pdf/36-0002.pdf>; <http://www.consilium-medicum.com/magazines/cm/medicum/article/8748>
5. Ахрем А.А., Пшеничный В.Н., Михальчук А.Л., Хрипач В.А. Синтез 21-сульфоэфиров кортикостероидов // Весці АН БССР. Сер. хім. навук.- 1985.- №6. -С. 53-58.

**TRIAZOLE DERIVATIVES OF LOW-MOLECULAR NATURAL
BIOREGULATORS THE NEW DIRECTION OF SEARCH OF POTENTIAL
MODULATORS OF CYTOCHROME P-450 ACTIVITY**

¹Mikhal'chuk A.L., ¹Kisel M.A., ²Kurman P.V.

¹*PSI «Institute of Bioorganic Chemistry of the NAS of Belarus», Minsk, Belarus
E-mail: lipmal@iboch.bas-net.by;*

²*State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and
Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk,
Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by*

Approaches to synthesis of steroid triazole derivatives and their heterocyclic analogues as potential more effective aromatase inhibitors are discussed. Synthesis of steroid triazole derivatives by the nucleophilic replacement of the halogen atoms or the sulfo acid rests in corresponding halogenides (iodides, bromides, chlorides) or sulfonates (mesylates, tosylates) of steroids by 1,2,4-triazole and its derivatives is tested. Perspectivity of such approach is shown. Physical and chemical characteristics of again received compounds are investigated.

**ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА – ДОСТИЖЕНИЯ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ
ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**

Мойсеёнок А.Г.

*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК
50, E-mail: val@biochem.unibel.by*

Пантотеновая кислота (витамин В₃, В₅) – предшественник биосинтеза универсального кофактора ферментативных реакций – кофермента ацетилирования, широко используется внутрицевтиках (поливитаминных препаратах), биокорректорах как эссенциальный фактор с суточной потребностью взрослого человека 10-12 мг. Значительно уже спектр использования пантотената (преимущественно в форме кальциевой соли или спиртового производного - пантенола) в клинической медицине в качестве моносубстанции для энтерального и парентерального назначения. Наиболее известные показания применения препаратов пантотената – хирургия (паралитическая непроходимость кишечника, в качестве антидота миорелаксантов (декураризация), устранения побочных явлений при антибиотикотерапии). Широкий спектр показаний для пантотенотерапии сохраняется в дерматологии, гастроэнтерологии [1]. Получены убедительные данные о целесообразности назначения пантотенатов в кардиологии с учетом диуретического, гипокоагулирующего, потенцирующего и детоксицирующего сердечные гликозиды эффектов витаминной субстанции [2]. Существуют многочисленные фармакологические данные, доказывающие антигистаминное и противовоспалительное действие препаратов пантотеновой кислоты [1]. В нашей лаборатории получило развитие исследование детоксикационных, гепатотропных и антиоксидантных свойств пантотенатов и их производных, а также исследование их фармакокинетических особенностей, что позволило совместно с НПО «Витамины» (г. Москва) разработать новую лекарственную форму (кальций пантотенат стабилизированный, 10 % в ампулах) [3]. Параллельно проводились исследований субстанции D-пантенола

(препарат «Пантевитол»), однако, производство указанных лекарственных форм было прекращено в 1991-1992 гг. в связи с нарушением технологических цепей в СНГ.

В связи с отсутствием готовой лекарственной формы в 90-е годы нами проводились исследования с препаратом ПАНТЕНОЛ производства фирмы Иенафарм [4].

В подтверждение ранее полученных приоритетных данных [А. с. СССР № 902354] было показано, что пантенол как и пантотенат кальция обладает выраженным детоксикационным действием при алкогольном абстинентном синдроме [А. с. СССР № 1425904], оказывает благоприятный эффект в системе предоперационной подготовки больных с повышенным риском [А.с. СССР № 1666113], проявляет высокую эффективность в системе метаболической терапии реперфузионно-реоксигенационного синдрома в хирургии окклюзий артерий нижних конечностей [Патент РБ № 5439], оказывает выраженный защитный эффект на миокард при холодовой кардиоплегии и реперфузии [А. с. СССР № 1473132] и обладает нейропротекторными свойствами при хирургическом лечении артериальных аневризм головного мозга [Патент РБ № 7743].

Исследование механизмов действия пантотената предполагало, что внутриклеточное соотношение фракций кофермента А (уровень КоА-SH, дисульфидов, ацил-КоА) являются факторами регуляции биосинтеза КоА в целом и важнейшим метаболическим эффектором в реализации витаминной и фармакотерапевтической активности производных пантотеновой кислоты [4,5]. Идентифицирование труднометаболизируемых ксенобиотических ацил-КоА (вальпроат, салицилат, пивалат, бензоат и др.) квалифицированное как «секвестрирование» внутриклеточного фонда КоА, актуализировало поиск путей активизации биосинтеза КоА и механизмов деацилирования [4,5].

По нашему мнению, наиболее рационален путь совместного применения препаратов пантотеновой кислоты и L-карнитина, являющегося эффективным регулятором ключевого фермента биосинтеза КоА - пантотенаткиназы и участником митохондриального транспорта компонентов ацил-КоА. Доклинические исследования такого комплекса оказались успешными, в частности, при окислительном стрессе [4, 5]. Практически определен метаболомный путь повышения фармакотерапевтической активности как пантотената, так и препаратов карнитина.

Кроме того, в самое последнее время описан синдром CASTOR (Coenzyme A sequestration, toxicity or redistribution), включающий комплекс изменений в интегративной метаболической функции митохондрий и предполагающий, как уже упомянуто выше, секвестрацию свободного КоА, токсичность и перераспределение в системах КоА ↔ ацил КоА. Рабочая гипотеза возникновения синдрома CASTOR определяет роль L-карнитина и ацил-карнитина как своеобразных буферных систем в поддержании метаболического гомеостаза. Не трудно дополнить указанное положение причастностью системы КоА (через дисульфидообразование и модуляцию редокс-статуса глутатиона) к редокс-сигналированию и осуществлению таких функций как мембранопротекция и поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия [6]. Несмотря на то, что синдром CASTOR верифицирован по группе наследственных заболеваний, его возникновение достаточно очевидно при разнообразных осложнениях лекарственной терапии, пищевых интоксикациях и, вероятно, при окислительном стрессе различного происхождения.

Реализация концепции CASTOR особенно привлекательна при условно определяемой митохондриальной патологии и нейродегенеративных заболеваниях. Особое место здесь занимает «Пантотенаткиназа- ассоциированная нейродегенерация, РК – associated neurodegeneration» - первый генетически детерминированный патологический процесс, объединяющий аутосомально-рецессивный синдром поражения экстрапирамидной системы и симптоматику дефицита пантотеновой кислоты [1,3]. Отличительной особенностью синдрома (впервые описанных Hallervorden, Spatz, 1922) является дефект митохондриальной формы пантотенаткиназы. Метаболомный подход предполагает не менее значимое участие

конечных реакций биосинтеза КоА (т.н. КоА-синтазы), которым приписываются ключевые связующие эффекты между клеточным сигналированием и регуляцией КоА/ацил-КоА-зависимых метаболических процессов в клетке.

Очевидно, мы стоим на грани нового уровня представлений о взаимодействии систем биосинтеза КоА и карнитин-опосредованных эффектов транспорта ацилов и регуляторных эффектов, что повлечет за собой новые возможности разработки и применения фармакологических препаратов метаболического типа действия.

Литература:

1. Мойсеёнок А.Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина). Минск, 1980. 262 с.
2. Борец В.М. Витамины и сердечно-сосудистые заболевания. Минск, 1984. 112 с.
3. Мойсеёнок А.Г., Копелевич В.М., Шейбак В.М., Гуринович В.А. Производные пантотеновой кислоты. разработка новых витаминных и фармакотерапевтических средств. Минск, 1989. 216 с.
4. Мойсеёнок А.Г. (ред.) Пантонол и другие производные пантотеновой кислоты: биохимия, фармакология и медицинское применение. Гродно, 1998. 232 с.
5. Мойсеёнок А.Г. Пантотеновая кислота: от универсального распространения к универсальным функциям. В сб. Биохимия, фармакология и клиническое применение производных пантотеновой кислоты. Гродно, 2003. С. 107-114.
6. Мойсеёнок А.Г., Омелянчик С.Н., Гуринович В.А. и др. Взаимосвязь реакций S-ацилирования, нитрозилирования, дисульфидобразования и биосинтеза кофермента А в механизмах нейропротекции и нейродегенерации. В сб. Функциональные системы организма в норме и при патологии. Минск, 2008. С. 407-412.

PANTOTHENIC ACID: ACHIEVEMENTS AND NEW OPPORTUNITIES FOR APPLICATION OF THE PHARMACEUTICAL

Moiseenok A.G.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus

A wide range of indications to pharmacotherapeutic application of calcium pantothenate and panthenol preparations has been described, which has not been sufficiently accepted due to unclear pathways of biotransformation and metabolic activity realization. Prospects of combined application of pantothenic acid and carnitine derivatives in correction of mitochondrial and neurodegenerative pathologies have been indicated.

ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА И КАРНИТИНА ХЛОРИДА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ PPAR У КРЫС

Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by

В настоящее время в клинической практике широко применяются модуляторы метаболизма, в частности, корректоры энергетического обмена милдронат и карнитина хлорид. Основным механизмом их действия является снижение окисления жирных кислот в тканях, находящихся в условиях ишемии, и интенсификация окисления пирувата. Переключение энергетического обмена с окисления свободных жирных кислот как субстратов на окисление глюкозы в условиях ишемии под действием модуляторов энергетического метаболизма способствует экономии потребления кислорода в процессе синтеза АТФ.

Аза-аналог гамма-бутиробетаина (ГББ) милдронат препятствует превращению ГББ в карнитин [1]. В результате снижается транспорт жирных кислот, образование ацил-КоА и ацилкарнитина в митохондриях. Препарат обладает антиангинальным, антиишемическим, антиаритмическим, гиполипидемическим и гипогликемическим эффектами; применяется при сердечно-сосудистых заболеваниях, дисгормональной кардиопатии, острых и хронических нарушениях кровоснабжения головного мозга, сосудистых патологиях и дистрофических заболеваниях сетчатки, сниженной работоспособности, физическом перенапряжении, в том числе у спортсменов, хроническом алкоголизме. Схожие показания для применения имеет и карнитина хлорид. При гипоксии карнитин способствует усилению окисления глюкозы за счет повышения активности пируватдегидрогеназы, обусловленного опосредованным карнитином снижением величины отношения ацетил-КоА/КоА в митохондриях. Кроме того, поскольку транспорт жирных кислот регулируется в зависимости от величины отношения ацил-КоА к ацилкарнитину, повышение содержания карнитина в цитозоле приводит к обращению направления транспорта жирных кислот, снижению уровней ацил-КоА и ацилкарнитина в матриксе митохондрий [2].

В литературе встречаются единичные данные о влиянии корректоров энергетического метаболизма на экспрессию генов. Мы предположили, что в реализации эффектов милдроната и карнитина хлорида играют роль транскрипционные факторы PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), принадлежащие к суперсемейству ядерных рецепторов гормонов [3]. Все три изоформы PPAR (PPAR α , PPAR β и PPAR γ) участвуют в регуляции многих физиологических и патологических процессах сердечно-сосудистой системы, включая метаболизм липидов и углеводов. Эндогенными лигандами PPAR являются длинноцепочечные жирные кислоты и эйкозаноиды. Среди синтетических лигандов PPAR следует отметить гиполипидемические лекарственные препараты фибраты (активируют PPAR α), инсулиновые сенситайзеры тиазолидиндионы (агонисты PPAR γ) и нестероидные противовоспалительные средства (лиганды PPAR α и PPAR γ).

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии генов PPARA, PPARB и PPARG в печени, белой висцеральной жировой и скелетной мышечной ткани крыс после введения милдроната и карнитина хлорида.

Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar средней массой 300 г в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Животные содержались в условиях лабораторного вивария экспериментально-

биологической клиники ИФБ НАН Беларуси при свободном доступе к корму, воде и 12-ти часовом цикле освещения.

Милдронат и карнитина хлорид в виде водных растворов вводили внутривентрикулярно в дозах 200 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно, в течение двух недель. В работе использовали 10%-ные растворы для инъекций карнитина хлорида (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и милдроната (АО «Гриндекс», Латвия). Контрольным животным в течение 14-ти дней внутривентрикулярно вводили дистиллированную воду. Количество животных в группах составило по 6 крыс. После завершения эксперимента эвтаназию животных производили путем декапитации. Суммарную РНК из образцов белой висцеральной жировой ткани, печени, скелетной мускулатуры (*m. soleus*) экстрагировали с помощью наборов реагентов RNeasy MiniKit (QIAGEN, Germany). Для очистки РНК от примесей геномной ДНК использовали набор DNase I, RNase-free (Fermentas, Lithuania). Синтез кДНК на РНК-матрице со случайными гексамерными праймерами проводили с использованием набора реагентов RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania). Экспрессию генов *PPAR* оценивали методом количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). В качестве внутреннего контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*).

Статистическую обработку результатов производили с помощью программного обеспечения Statistica 7.0. Достоверности различий групповых средних оценивались на основе однофакторного дисперсионного анализа. Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследований показали, что в скелетной мышечной ткани экспрессия генов *PPARA* и *PPARB* незначительно снижается после введения милдроната (на 18% и 17%) и карнитина хлорида (на 29% и 26%) по сравнению с контролем. Активность *PPARG* в камбаловидной мышце крыс, напротив, увеличивается на 22% и 39% соответственно по сравнению с контролем. Однако наблюдаемые различия статистически не достоверны.

В белой висцеральной жировой ткани крыс, которым внутривентрикулярно вводили метаболиты, показано снижение активности *PPARA* по сравнению с контрольным уровнем: после введения милдроната – на 32%, карнитина хлорида – на 52% ($P < 0,05$); изменение средних значений относительной экспрессии гена *PPARB* по сравнению с контролем не отмечено. У животных, получавших милдронат, экспрессия *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани не превышает контрольный уровень, а после введения карнитина хлорида – снижена на 34%.

Выявлено значительное повышение экспрессии генов *PPARA*, *PPARB* и *PPARG* в печени животных под действием карнитина хлорида и милдроната. В печени крыс после введения милдроната активность *PPARA* увеличивается в 2 раза ($P < 0,01$), *PPARB* – почти в 3 раза ($P < 0,05$), *PPARG* – в 3,4 раза ($P < 0,01$) по сравнению с контрольным уровнем. Внутривентрикулярное введение карнитина хлорида крысам привело к повышению экспрессии *PPARA* в 2,3 раза ($P < 0,05$), двукратному увеличению экспрессии *PPARB* ($P < 0,05$) и трехкратному – *PPARG* ($P < 0,001$) в печени по сравнению с контролем.

Заключение. Метаболические регуляторы милдронат и карнитина хлорид в печени крыс проявляют свойства активаторов всех трех изоформ PPAR. Поскольку печень является основным органом, в котором осуществляется регуляция метаболизма липидов и углеводов, активация генов *PPAR* в печени объясняет гиполипидемические и гипогликемические эффекты милдроната и карнитина хлорида. Известно, что активация *PPARα* и *PPARβ* индуцирует транскрипцию генов, вовлеченных во внутриклеточные поглощение и катаболизм липидов. Наблюдаемое снижение экспрессии *PPARA* в белой висцеральной жировой ткани крыс коррелирует с гипогликемическим действием милдроната и карнитина хлорида, поскольку для *PPARα*, в отличие от *PPARβ/δ* и *PPARγ*, показан гипергликемический эффект.

Полученные экспериментальные данные о взаимосвязи экспрессии генов *PPAR in vivo* и действием корректоров энергетического метаболизма милдроната и карнитина хлорида могут быть использованы для разработки фармакогеномных подходов в диагностике и лечении патологических состояний ишемической природы.

Литература:

1. Dambrova, M. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect / M. Dambrova, E. Liepinch, I. Kalvinch // Trends Cardiovasc. Med. – 2002. –Vol. 12, № 6. – P. 275–279.
2. Bremer, J. Carnitine – metabolism and functions / J. Bremer // Physiol. Rev. – 1983. –Vol. 63, № 4. – P. 1420–1480.
3. Desvergne, B. Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism / B. Desvergne, W. Wahli // Endocr.Rev. – 1999. –Vol. 20, № 5. – P. 649–688.

EFFECT OF MILDRONATE AND CARNITINE CHLORIDE ON *PPAR* GENES EXPRESSION IN RATS

Morozova E.V., Nikolaevich L.N.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The effect of correctors of energetic metabolism mildronate and carnitine chloride on *PPAR* genes expression in rat liver, skeletal musculature and white visceral adipose tissue has been studied. Significant increase of genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* expression in rat liver after mildronate and carnitine chloride administration has been revealed.

Obtained experimental data about correlation of *PPAR* genes expression *in vivo* and mildronate and carnitine chloride effect can be used for working out of pharmacogenomic approaches in diagnostics and treatment of pathological conditions of ischemic nature.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PPAR* У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СТАТИНОВ

Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by

Статины являются одним из самых эффективных классов гиполипидемических лекарственных препаратов. Механизм действия статинов обусловлен ингибированием 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (ГМК-КоА) редуктазы, ключевого фермента биосинтеза холестерина. Поскольку мевалонат, продукт реакции, катализируемой ГМК-КоА редуктазой, является предшественником не только холестерина, но и многих других изопреноидных соединений нестероидной природы, участвующих в контроле клеточного роста и дифференцировки, статины оказывают на организм многообразное действие [1]. Многие эффекты ингибиторов ГМК-КоА редуктазы опосредуются через ядерные рецепторы *PPAR*, несмотря на то что статины не являются их прямыми лигандами [2].

Цель данного исследования – изучение влияния аторвастатина и симвастатина на экспрессию генов *PPARA*, *PPARB*, *PPARG* в печени, белой висцеральной жировой и скелетной мышечной ткани крыс в норме и в условиях острой экспериментальной гиперлипидемии.

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar массой 220–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде, а также при 12-часовом световом режиме (экспериментально-биологическая клиника ИФБ НАН Беларуси). В эксперименте (10 групп, по 5 крыс в каждой группе) 1-ю группу составили контрольные животные; 2-ю – животные с твиновой гиперлипидемией; 3–10-я группы – животные, получавшие в течение 7-и дней статины в двух дозах: 3-я и 4-я – аторвастатин в дозе 10 мг/кг/сут; 5-я и 6-я – аторвастатин в дозе 80 мг/кг/сут; 7-я и 8-я – симвастатин в дозе 10 мг/кг/сут; 9-я и 10-я – симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут. У животных из групп 4, 6, 8, 10 в конце 7-го дня эксперимента индуцировали острую гиперлипидемию.

Таблетки аторвастатина («Липимакс», ЗАО «Максфарма Балтия», Литва) и симвастатина («Симвастерол», «Польфарма», Польша) животным вводили в растворе 0,1%-ного крахмала внутривентриально. Животным 1-й и 2-й групп в течение 7-и дней вводили внутривентриально 0,1%-ный раствор крахмала. Острую гиперлипидемию вызывали путем однократного внутривентриального введения детергента Твина-80 в дозе 70 мг/100 г веса животного. Через 10 ч проводили эвтаназию животных путем декапитации.

В сыворотке крови крыс определяли содержание триглицеридов, общего холестерина и холестерина ЛПВП с помощью наборов реагентов «Триглицериды ФС "ДДС"», «Холестерин ФС "ДДС"», «Холестерин ЛПВП ФС» (ЗАО «ДИАКОН-ДС», Россия) на спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Суммарную РНК из тканей крыс выделяли с использованием набора реагентов NucleoSpin^R RNA II (MACHEREY-NAGEL, Germany), обратную транскрипцию РНК проводили с использованием набора реагентов RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania). Экспрессию генов *PPAR* оценивали методом относительного количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием Tornado *Taq*TM полимеразы и интеркалирующего красителя Зубр I (ОДО «Праймтех», Минск, Беларусь) на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). Нормализацию относительных количеств кДНК осуществляли по отношению к гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*).

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы Statistica 7.0. Достоверности различий групповых средних оценивались на основе однофакторного дисперсионного анализа. Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

При твиновой гиперлипидемии содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс повысилось на 59% по сравнению с контрольными животными ($P < 0,05$), а содержание ЛПВП достоверно снизилось ($P < 0,001$). Внутривентриальное введение статинов в течение 1 недели приводило к существенному снижению концентрации сывороточных триглицеридов: при введении аторвастатина содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс уменьшилось почти в 2 раза ($P < 0,001$), симвастатина – почти в 3 раза ($P < 0,001$) (существенных различий между дозами статинов 10 и 80 мг/кг/сут не выявлено). Средние значения концентрации триглицеридов в крови крыс, получавших внутривентриально симвастатин и аторвастатин, достоверно отличаются ($P < 0,05$), в частности, симвастатин снижает сывороточную концентрацию триглицеридов эффективнее по сравнению с аторвастатином. Введение аторвастатина и симвастатина до индукции твиновой гиперлипидемии приводило к снижению сывороточной концентрации триглицеридов до контрольного уровня, за исключением животных, получавших симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут, где концентрация триглицеридов в сыворотке крови оказалась на 74% ниже по сравнению с контрольным уровнем ($P < 0,01$). Предварительное введение аторвастатина и симвастатина животным, у

которых не индуцировали острую гиперлипидемию, не наблюдалось изменений концентрации ЛПВП. У крыс, получавших внутрижелудочно статины в течение 7-и дней до индукции гиперлипидемии, показано статистически достоверное снижение уровня ЛПВП в сыворотке крови ($P < 0,001$).

В печени крыс при индукции твиновой гиперлипидемии показано статистически достоверное снижение экспрессии гена *PPARA* ($P < 0,05$), в то время как предварительное введение статинов не приводило к его активации. Экспрессия *PPARA* в печени крыс, получавших внутрижелудочно ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы в течение 1 недели, не изменилась по сравнению с контролем. Установлено отсутствие влияния острой твиновой гиперлипидемии на экспрессию *PPARB* в печени крыс. У крыс, получавших статины в дозе 80 мг/кг/сут, активность *PPARB* статистически достоверно снижается по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Активность *PPARG* в печени крыс, у которых вызывали острую гиперлипидемию, снижается в 2 раза по сравнению с контрольными животными ($P < 0,05$). Применение статинов не вызывало значительного изменения экспрессии *PPARG* в печени крыс. Предварительное введение статинов в дозе 10 мг/кг/сут в течение 1 недели до индукции гиперлипидемии существенно не повлияло на экспрессию *PPARG* в печени крыс по сравнению с гиперлипидемическими животными. Лишь при повышении дозы препаратов до 80 мг/кг/сут экспрессия *PPARG* в печени животных с гиперлипидемией статистически значимо не отличалась от контрольного уровня.

В белой висцеральной жировой ткани крыс с твиновой гиперлипидемией также наблюдается статистически значимое снижение активности генов *PPARA* и *PPARG* по сравнению с контрольными животными ($P < 0,05$). Аторвастатин вызывает повышение экспрессии генов *PPARA* и *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани крыс при пероральном введении в течении 1 недели по отношению к контрольному уровню ($P < 0,05$). Аторвастатин в дозе 80 мг/кг/сут также существенно активизирует *PPARB* в белой жировой ткани крыс ($P < 0,05$). Других значимых изменений экспрессии гена *PPARB* в белой жировой ткани крыс при индукции твиновой гиперлипидемии и введении статинов не выявлено. Симвастатин в норме не влияет на экспрессию генов *PPARA* и *PPARG* в жировой ткани крыс. Однако при введении симвастатина до индукции гиперлипидемии экспрессия *PPARA* и *PPARG* существенно не отличается от контрольного уровня. При предварительном введении аторвастатина в дозе 80 мг/кг/сут средние значения относительной экспрессии *PPARG* в жировой ткани статистически достоверно выше контрольного уровня ($P < 0,05$).

Индукция твиновой гиперлипидемии и применение статинов не приводит к существенному изменению активности гена *PPARA* в скелетной мышечной ткани крыс. У крыс, получавших статины до индукции острой гиперлипидемии, наблюдается снижение активности *PPARB* в скелетной мышечной ткани крыс по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Значимых изменений экспрессии *PPARB* в скелетной мышечной ткани крыс при индукции острой гиперлипидемии и применении статинов у контрольных животных не выявлено. При острой гиперлипидемии у крыс в скелетной мускулатуре наблюдается повышение активности *PPARG* по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Статины в дозе 10 мг/кг/сут в течение 7-и дней существенно не влияют на активность *PPARG* в скелетной мышечной ткани, однако твиновая гиперлипидемия на фоне применения статинов не приводит к достоверному повышению экспрессии *PPARG* в скелетной мускулатуре крыс. Симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут вызывает статистически достоверное снижение экспрессии *PPARG* в скелетной мышечной ткани крыс ($P < 0,01$).

В результате исследования, выявлены различия в действии симвастатина и аторвастатина на экспрессию генов *PPAR in vivo*. В отличие от симвастатина, аторвастатин существенно активизирует гены *PPARA*, *PPARB* и *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани крыс. Высокая доза симвастатина вызывает статистически достоверное снижение экспрессии *PPARG* в скелетной мышечной ткани крыс. Полученные данные позволяют

расширить представление о молекулярных механизмах плейотропного действия статинов на организм.

Литература:

1. Stancu, C. Statins: mechanism of action and effects / C. Stancu, A. Sima // *J. Cell. Mol. Med.* – 2001. – Vol. 5, № 4. – P. 378–387.

2. Paumelle, R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Mediate Pleiotropic Actions of Statins / R. Paumelle, B. Staels // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100, № 10. – P. 1442–1451.

EVALUATION OF PPAR GENES EXPRESSION IN RATS UNDER STATINS ADMINISTRATION

Morozova E.V., Nikolaevich L.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The effects of atorvastatin and simvastatin on genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* expression in liver, white visceral adipose tissue and skeletal musculature and also blood lipid composition of rats in norm and under tween hyperlipidemia have been studied. Difference of their effects on *PPAR* genes expression *in vivo* have been observed. Unlike simvastatin, atorvastatin essentially activates genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* in rat white visceral adipose tissue. The high dose of simvastatin causes statistically significant decrease in *PPARG* expression in rat skeletal musculature. The obtained data can promote the insight into molecular mechanisms of pleiotropic effects of statins.

ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ PPAR, ПРОЛИФЕРАЦИИ, АПОПТОЗА И КЛЕТОК С МИКРОЯДРАМИ У КРЫС С ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИКОПИНА

Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by

Известно, что некоторые изопреноиды, содержащиеся в лекарственных и пищевых растениях, могут влиять на активность транскрипционных факторов PPAR, которые являются сенсорами пищевых липидов, контролирующими энергетический гомеостаз [1, 2]. Также для биоактивных изопреноидов показано подавление опухолевой пролиферации и апоптоз-индуцирующая активность [3]. Поэтому включение в ежедневный рацион таких соединений может быть использовано для терапии заболеваний, связанных с нарушением метаболизма липидов (сахарный диабет 2-го типа, гиперлипидемия, инсулинорезистентность, сердечно-сосудистые заболевания), а также при лечении рака.

Целью исследования явилось изучение влияния каротиноида ликопина, имеющего изопреноидную структуру, на экспрессию генов *PPARA*, *PPARB* и *PPARG* в печени, белой висцеральной жировой и скелетной мышечной ткани, а также на плоидность клеток крови (лейкоцитов) крыс в норме и острой экспериментальной гиперлипидемии.

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar массой 220–250 г, которых содержали при 12-часовом световом режиме на стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде (экспериментально-биологическая клиника ИФБ НАН Беларуси). В

эксперименте участвовали 5 групп животных (по 5 крыс): 1-я группа – животные, получавшие в течение 7-ми дней 0,9%-ный раствор NaCl внутривентрикулярно (контроль); 2-я – животные, получавшие до индукции твиновой гиперлипидемии в течение 7-ми дней 0,9%-ный раствор NaCl внутривентрикулярно; 3-я – животные, получавшие ликопин в дозе 50 мг/кг/сут внутривентрикулярно в течение 7-ми дней; 4-я – животные с твиновой гиперлипидемией, получавшие предварительно в течение 7-ми дней ликопин в дозе 50 мг/кг/сут внутривентрикулярно; 5-я – животные, получавшие до индукции твиновой гиперлипидемии в течение 7-ми дней ликопин в дозе 250 мг/кг/сут внутривентрикулярно.

В работе использована водорастворимая субстанция ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG (DSM Nutritional Products, Швейцария). Субстанцию ликопина растворяли в 0,9%-ном растворе NaCl. Острую гиперлипидемию у крыс вызывали однократным внутривентрикулярным введением детергента Твин-80 в дозе 70 мг/100 г веса животного. Голодавших в течение 18 ч животных декапитировали через 10 ч после введения детергента. Содержание триглицеридов, общего холестерина и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови определяли с помощью наборов реагентов «Триглицериды ФС "ДДС"», «Холестерин ФС "ДДС"», «Холестерин ЛПВП ФС» (ЗАО «ДИАКОН-ДС», Россия) на спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, США).

Суммарную РНК из тканей крыс экстрагировали с использованием набора реагентов RNAeasy MiniKit (QIAGEN, Германия), синтез кДНК проводили в реакции обратной транскрипции с буферами и ферментами набора реагентов RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Латвия). Уровни экспрессии генов *PPAR* оценивали с помощью технологии SYBR Green на приборе Chromo4 (Bio-Rad, США). Молекулярно-генетические показатели плоидности клеток крови анализировали по стандартным методикам на проточном цитофлуориметре FAX Vantage (Becton Dickinson, США). Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа программного пакета Statistica 7.0.

В ходе эксперимента показано увеличение концентрации триглицеридов на 74% ($P<0,05$) и снижение концентрации ЛПВП на 50% ($P<0,001$) в сыворотке крови крыс при острой экспериментальной гиперлипидемии по сравнению с контрольными животными. У крыс, получавших ликопин в дозе 50 мг/кг/сут на протяжении одной недели, выявлено снижение концентрации сывороточных триглицеридов на 26% и повышение уровня ЛПВП на 20 % по сравнению с контролем. Ликопин на фоне твиновой модели гиперлипидемии вызывает снижение содержания триглицеридов до контрольного уровня. При предварительном введении ликопина в дозе 50 мг/кг/сут индукция твиновой гиперлипидемии не приводила к существенному снижению сывороточной концентрации ЛПВП по сравнению с контролем. Следует отметить, что у крыс, получавших ликопин в дозе 250 мг/кг/сут до индукции твиновой гиперлипидемии, содержание ЛПВП в сыворотке крови существенно снижено по сравнению с контрольными животными ($P<0,001$).

В белой висцеральной жировой ткани крыс при острой гиперлипидемии наблюдается существенное снижение экспрессии генов *PPARA* ($P<0,05$) и *PPARG* ($P<0,05$) по сравнению с контрольными животными. При предварительном введении ликопина в дозе 50 мг/кг/сут в течение 7 дней перед индукцией гиперлипидемии активность *PPARA* не изменяется по сравнению с гиперлипидемическими животными, а при дозе ликопина 250 мг/кг/сут – статистически значимо не отличается от контрольного уровня. Экспрессия *PPARG* в белой жировой ткани животных с гиперлипидемией, получавших предварительно ликопин, повышается до контрольных значений. Показано стимулирующее действие ликопина в дозе 50 мг/кг/сут в течение 7-ми дней на экспрессию *PPARG* по сравнению с контрольным уровнем ($P<0,05$). У животных с гиперлипидемией активность гена *PPARB* в белой жировой ткани по сравнению с контрольными животными значимо не изменялась. Экспрессия гена

PPARB в белой жировой ткани животных, которым вводили ликопин в дозе 50 мг/кг/сут, снижается по сравнению с контролем ($P<0,05$).

Активность генов *PPARA* и *PPARB* в скелетной мышечной ткани статистически значимо не изменялась при индукции твиновой гиперлипидемии и применении ликопина. При индукции твиновой гиперлипидемии в скелетной мускулатуре крыс наблюдается статистически значимое повышение экспрессии *PPARG* ($P<0,05$) по сравнению с контрольным уровнем. При введении ликопина в дозе 50 мг/кг/сут в течение одной недели активность *PPARG* в скелетной мышечной ткани крыс статистически достоверно снижается по сравнению с контролем ($P<0,001$). При введении ликопина в дозе 50 мг/кг/сут до индукции гиперлипидемии экспрессия *PPARG* в скелетной мышечной ткани статистически значимо не отличается от контрольного уровня, а в дозе 250 мг/кг/сут – существенно снижена по сравнению с контролем ($P<0,001$). Индукция острой гиперлипидемии также приводит к статистически значимому подавлению активности *PPARA* и *PPARG* в печени экспериментальных животных ($P<0,05$). Ликопин в дозе 50 мг/кг/сут на протяжении недели существенно активирует *PPARA* ($P<0,05$) и *PPARG* ($P<0,01$) в печени крыс. При введении ликопина до индукции твиновой гиперлипидемии экспрессия *PPARA* в печени крыс значимо не отличается от контрольного уровня, а экспрессия *PPARG* повышается по сравнению с контролем, при введении ликопина в дозе 250 мг/кг/сут различие имеет статистическую достоверность ($P<0,05$). Экспрессия *PPARB* в печени экспериментальных животных при индукции гиперлипидемии и введении ликопина существенно не изменяется.

При индукции твиновой гиперлипидемии наблюдается снижение частоты апоптоза ($P<0,05$) и клеток с микроядрами в крови крыс; пролиферативная активность клеток крови, напротив, повышается на 80% по сравнению с контролем. Введение ликопина в дозе 50 мг/кг/сут в течение 7-ми дней приводит к повышению частоты апоптоза в крови животных, при его предварительном введении снижение апоптотической гибели клеток крови при острой гиперлипидемии статистически незначимо. У крыс, получавших ликопин в дозе 50 мг/кг/сут до индукции гиперлипидемии, снижение частоты апоптоза более выражено. Ликопин в дозе 50 мг/кг/сут в течение 7-ми дней снижает пролиферативную активность клеток крови, однако при его введении в указанной дозе до индукции гиперлипидемии пролиферация клеток крови статистически значимо выше контрольного уровня ($P<0,05$). При введении ликопина в дозе 250 мг/кг/сут до индукции гиперлипидемии пролиферативная активность клеток крови находится на уровне контроля. У крыс, получавших ликопин в дозе 50 мг/кг/сут, как и у животных с твиновой гиперлипидемией, снижается частота клеток крови с микроядрами. Предварительное введение ликопина до индукции гиперлипидемии приводит к суммации эффектов ликопина и острой гиперлипидемии – частота клеток с микроядрами статистически значимо ниже контрольного уровня ($P<0,01$).

Заключение. Выявленная активация экспрессии генов *PPARA* и *PPARG* в печени и гена *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани крыс при введении ликопина подтверждает, что каротиноид ликопин может быть использован как средство для терапии гиперлипидемических состояний, поскольку активация *PPAR γ* в жировой ткани приводит к увеличению чувствительности к инсулину, а активация *PPAR α* и *PPAR γ* в печени вызывает снижение уровня циркулирующих липидов. Подавление экспрессии гена *PPARG* под действием ликопина в скелетной мышечной ткани препятствует накоплению липидов в мышцах, поскольку *PPAR γ* снижает уровни жирных кислот в крови за счет усиления транскрипции генов, вовлеченных в процессы липогенеза, дифференцировки адипоцитов и накопления липидов. Следует также отметить, что профилактические дозы ликопина 50 и 250 мг/кг/сут снижали концентрацию сывороточных триглицеридов в одинаковой степени, а увеличение дозы до 250 мг/кг/сут приводило к снижению содержания ЛПВП. Следовательно, в качестве гиполипидемического средства наиболее эффективны средние дозы ликопина.

Литература:

1. Huang, T.H. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome / T.H. Huang [et al.] // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol. 96, № 1. – P. 3–14.
2. Goto, T. Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism / T. Goto [et al.] // *PPAR Res.* [Electronic resource]. – 2010. – 2010:483958. – Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2010/483958.html>. – Date of access: 04.08.2010.
3. Mo, H. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids / H. Mo, C.E. Elson // *J. Nutr.* – 1999. – Vol. 129, № 4. – P. 804–813.

CHARACTERISTIC OF LEVEL OF PPAR GENES EXPRESSION, PROLIFERATION, APOPTOSIS AND MICRONUCLEATED CELLS IN HYPERLIPIDEMIC RATS UNDER LYCOPENE ADMINISTRATION

Morozova E.V., Nikolaevich L.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The influence of lycopene on *PPAR* genes expression in rat liver, white visceral adipose tissue, skeletal musculature and blood cell ploidy has been studied. Significant decrease of *PPARA* and *PPARG* activity in white visceral adipose tissue and liver, and also increase of *PPARG* activity in skeletal musculature of rats has been observed under tween hyperlipidemia. Lycopene was established to up-regulate *PPARG* expression in rat white visceral adipose tissue, *PPARA* and *PPARG* expression – in the liver. *PPARG* activity decreases in animal skeletal muscles after lycopene administration. Decrease of serum triglycerides level and increase of HDL have been shown in animals gavaged with lycopene. Lycopene downregulates proliferative activity and upregulates apoptosis of rat blood cell. Thus, lycopene possesses hypolipidemic and cytoprotective properties.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Мушкина О.В., Гурина Н.С.

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Фрунзе, 27, E-mail: Olga7081@tut.by

Одним из широко распространенных лесообразующих растений флоры Республики Беларусь является ольха черная (*Alnus glutinosa* (L) Gaertn) и ольха серая (*Alnus incana* (L) Moench) сем. Березовые (*Betulaceae*). В Государственную Фармакопею Республики Беларусь включены два новых вида лекарственного растительного сырья - листья ольхи черной и листья ольхи серой. В народной медицине листья ольхи используются при простудных заболеваниях, кашле, болезнях горла, при ревматизме и подагре, а также как ранозаживляющее и кровоостанавливающее средство [1]. Имеющиеся сведения об их фармакологической активности фрагментарны и недостаточны, поэтому изучение

фармакологической активности листьев ольхи как нового вида лекарственного растительного сырья, перспективного для применения в Республике Беларусь, является актуальной задачей.

Цель исследования. Изучение антиоксидантной и противовоспалительной активности новых видов лекарственного растительного сырья – листьев ольхи черной и листьев ольхи серой.

Методы исследования. Антиоксидантную активность суммы биологически активных веществ из листьев ольхи изучали спектрофотометрическим методом с реактивом DPPH (2,2 – дифенил – 1 пикрил- гидразил) [2,3]. Метод основан на реакции DPPH, растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме: $DPPH^* + AN \rightarrow DPPH-H + A^*$.

Предварительно готовили серию извлечений из листьев ольхи: 0,5г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, заливали 30 мл различных экстрагентов (H₂O, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96% спирт этиловый) и кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 40 мин при периодическом перемешивании. Полученные экстракты центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 3000 об/мин, затем к 0,6 мл извлечения добавляли 4,2 мл 0,01% раствора DPPH. Через 30 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 517 нм. В качестве раствора сравнения использовали метанол. Антиоксидантную активность извлечения из листьев ольхи рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A_i) \cdot 100}{A_0}$$

где A_0 – оптическая плотность раствора DPPH;

A_i – оптическая плотность раствора DPPH, после добавления извлечения.

Противовоспалительную активность водных настоев листьев ольхи черной и листьев ольхи серой изучали на модели каррагенинового воспаления [4,5].

Воспаление индуцировали внутрибрюшинным введением 1 мл 1% раствора каррагенина на изотоническом растворе хлорида натрия. Через 2 часа вводили полученные водные извлечения из листьев ольхи в дозе 200 мг/кг. Препараты вводили ежедневно. На 4-е и 7-е сутки животных выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков.

При изучении противовоспалительной активности листьев ольхи черной и ольхи серой оценивали ряд специфических и неспецифических биохимических показателей, которые изменяются при воспалительном процессе: СРБ (С-реактивный белок), γ -глутамилтрансфераза (ГГТ), аланинаминотрансфераза (АлАт), аспартатаминотрансфераза (АсАт), , диеновые конъюгаты (ДК) печени и крови, малоновый диальдегид (МДА) печени и крови, антиоксидантная активность (АОА) печени и крови.

Результаты. Результаты изучения антиоксидантной активности извлечений из листьев ольхи черной и листьев ольхи серой приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Степень ингибирования свободных радикалов извлечениями из листьев ольхи

Тип экстрагента	Ингибирование свободных радикалов, % извлечениями из листьев ольхи черной (n=6)	Ингибирование свободных радикалов, % извлечениями из листьев ольхи серой (n=6)
Вода	47,3 ± 1,15	40,09 ± 0,65
10% спирт этиловый	47,13 ± 1,17	39,77 ± 0,83
20% спирт этиловый	47,37 ± 1,61	40,89 ± 1,07
30% спирт этиловый	49,42 ± 1,46	41,28 ± 0,49
40% спирт этиловый	49,50 ± 1,61	41,37 ± 0,73
50% спирт этиловый	49,80 ± 1,26	40,84 ± 1,34
60% спирт этиловый	49,86 ± 1,19	41,21 ± 1,24

70% спирт этиловый	49,21 ± 1,56	41,67 ± 0,8
80% спирт этиловый	46,97 ± 1,69	39,36 ± 0,98
96% спирт этиловый	40,70 ± 1,77	38,55 ± 0,99

Из таблицы 1 видно, что степень ингибирования свободных катионных радикалов водными и спиртовыми извлечениями из листьев ольхи черной варьирует от 40,70 ± 1,77% до 49,86 ± 1,19%, из листьев ольхи серой – от 38,55 ± 0,98% до 41,67 ± 0,80%. В качестве стандарта для сравнения антиоксидантной активности был использован 1% спиртовой раствор кверцетина, вызывающий снижение количества свободных катионных радикалов на 52,47 ± 0,65%, что указывает на высокую степень антиоксидантной активности листьев ольхи черной и ольхи серой.

Результаты определения специфических показателей воспаления (СРБ, ГГТ) представлены в таблицах 2,3.

Таблица 2 – Показатели воспаления при лечении настоями листьев ольхи черной (n=8)

Показатель	Интактная группа	Контроль (воспаление) 4 сутки	Ольха черная 4 сутки	Контроль (воспаление) 7 сутки	Ольха черная 7 сутки
СРБ мг/мл	1,19 ± 0,11*#	21,57 ± 5,45	9,89 ± 1,94*	36,11 ± 3,16	11,28 ± 2,44#
ГГТ Е/л	1,22 ± 0,08*#	7,3 ± 2,09	3,56 ± 1,44*	2,79 ± 0,73	1,05 ± 0,04#

Таблица 3 – Показатели воспаления при лечении настоями листьев ольхи серой (n=8)

Показатель	Интактная группа	Контроль (воспаление) 4 сутки	Ольха серая 4 сутки	Контроль (воспаление) 7 сутки	Ольха серая 7 сутки
СРБ мг/мл	1,19 ± 0,11*#	21,57 ± 5,45	13,70 ± 1,89*	36,11 ± 3,16	10,98 ± 1,70#
ГГТ Е/л	1,22 ± 0,08*#	7,3 ± 2,09	3,45 ± 1,01*	2,79 ± 0,73	1,3 ± 0,69#

* - p < 0,05 по сравнению с контрольным воспалением на 4 сутки

- p < 0,05 по сравнению с контрольным воспалением на 7 сутки

Из таблиц 3, 4 видно, что под действием настоев листьев ольхи черной и ольхи серой происходит достоверное снижение специфических показателей воспаления СРБ и ГГТ. Аналогичная зависимость наблюдается и для других показателей. Это указывает на выраженную противовоспалительную активность листьев ольхи черной и ольхи серой

Заключение. Листья ольхи черной и ольхи серой обладают антиоксидантной и противовоспалительной активностью.

Литература:

1. Хворост, О.П. Химический состав, лекарственное и хозяйственное значение видов ALNUS MILL. S. L. / О.П. Хворост, А.Г. Сербин, Н.Ф. Комисаренко // Растительные ресурсы. – 1984. – Вып. 3. – С. 430-442.
2. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63-75.
3. Ellnain-Wojtaszek, M. Investigation of the free radical scavenging activity of Ginkgo biloba L. leaves / M. Ellnain-Wojtaszek, Z. Kruczynski, J. Kasprzak // Fitoterapia. – 2003. – Vol. 74. – P. 1-6.
4. Противовоспалительные свойства ряда препаратов растительного происхождения / А.В. Горбачева [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2003. – № 1. – С. 12-14.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакол. в-в / под ред. Р.Х. Хабриева. – 2-е изд. – М., 2005. – 399 с.

DETERMINATION ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF MEDICINAL VEGETATIVE RAW MATERIALS

Mushkina O.V., Gurina N.S.
Vitebsk state Medical University

The anti-inflammatory activity of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* leaves in general inflammatory process on laboratory animals and antioxidant activity by method in vitro established.

ТИРЕОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА АНТИОКСИДАНТНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Надольник Л.И., Чумаченко С.С., Горева Д.А., Валентюкевич О.И., Яськевич С.С.,
Климович П.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: lnadolnik@tut.by

Специфический метаболизм клеток щитовидной железы (ЩЖ) характеризуется постоянным образованием активных форм кислорода, необходимых для окисления йода. Нарушение процессов органификации йода является предпосылкой развития в ЩЖ окислительного и йодного стресса, что сопровождается избыточной продукцией активных форм кислорода и йода. Нарушение метаболизма тироцитов связано с активацией процессов свободнорадикального окисления. Индукция ПОЛ в ЩЖ обнаружена при развитии гипотиреоза, воздействии на организм хронического психоэмоционального и радиационного стресса. Важнейшим условием нормального функционирования клеток ЩЖ является активность антиоксидантной системы, включая обеспеченность низкомолекулярными антиоксидантами. Цель работы: провести исследование эффектов антиоксидантных комплексных препаратов на функциональную активность ЩЖ при стрессорных воздействиях, гипотиреозе, нарушении йодной обеспеченности.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на самках крыс «Вистар», массой 160-180 г. Хронический психоэмоциональный стресс моделировали с использованием модифицированных методик Desiderato О. и Толмачева Д.А. Радиационный стресс моделировали, облучая животных на установке для дистанционной γ -терапии "Агат-С" (^{60}Co) в условиях, исключающих взаимную экранизацию животных, при мощности дозы 0,01017 Гр/сек, фокусное расстояние 70 см (поглощенные дозы 0,25; 1,0; 5,0 Гр). Препарат «Антиоксикапс–селен» вводился интрагастрально, суточные дозы составили: витамин С – 6,66 мг/100 г, витамин Е – 2,0 мг/100 г, витамин А – 0,40 мг/100 г, селен (селенит натрия) – 2,0 мкг/ 100 г массы животного. Препарат «Вита селен Е» вводился крысам при моделировании йодного дефицита на протяжении месяца на фоне содержания на низкоййодной диете. Препараты «ЭКДШ-Йод» и «Фукус-Йод» использовались для коррекции нарушений йодного и тиреоидного статуса при йодном дефиците. В крови крыс определялась концентрация тироксина и трийодтиронина радиоиммунологическим методом, метаболизм йода в ЩЖ исследовался кинетическим церий-арсенитным методом в авторской

модификации: определялась концентрация общего йода (Юбщ), его белковосвязанной (Ибсвяз) и свободной (Исв) фракции. Активность тиреопероксидазы (ТПО), антиоксидантных ферментов, активность ПОЛ в ЩЖ оценивалась спектрофотометрически.

Результаты исследования. Воздействие многократного кратковременного стресса вызывало нарушение процессов органификации йода в ЩЖ на фоне активации его поглощения.

Таблица 1. – Влияние АОК на соотношение Ибс/Юбщ, Исв/Ибс в ЩЖ крыс при воздействии ежедневного 20-минутного стресса в течение 4 недель

Показатель	Контроль	АОК	Стресс	АОК+стресс
	К	А	Б	В
Юбщий	248,89±16,35	244,39±23,16	491,80±15,53 ^К	332,58±22,09 ^{Б,К}
Ибелковосвязанный	197,63±11,21	186,31±16,22	329,93±8,30 ^К	238,11±13,38 ^{Б,К}
Исвободный	52,25±7,83	58,07±7,89	163,87±18,46 ^К	94,47±12,63 ^{Б,К}
Ибсвяз/Юбщ	0,798±0,021	0,768±0,016	0,677±0,028 ^К	0,724±0,025 ^К
Исв/Ибс	0,261±0,034	0,306±0,027	0,501±0,066 ^К	0,396±0,049 ^К

Примечание: А, Б, К, – достоверное изменение показателя ($p < 0.05$) по сравнению с соответствующей группой (К-контроль, А-антиоксикапс-селен, Б-стресс).

Как видно из таблицы 1, концентрация Юбщ, Ибсвяз и Исв в ткани ЩЖ группы стресс повысилась, соответственно, на 97,59%, 66,94 и 213,63%. О нарушении органификации йода свидетельствует повышение соотношения Исв/Ибс в 1,91 раза.

Введение АОК-селен на фоне стресса снижало содержание Юбщ на 32,37%, Ибсв – на 27,83%, Исв – на 41,64% по сравнению с группой стрессированных животных, не получавших АОК. У контрольных крыс введение АОК не изменяло концентрацию йодида в ЩЖ. Антистрессорный эффект АОК-селен проявлялся и в значительной нормализации соотношений Ибс/Юбщ и Исв/Ибс в ткани ЩЖ (табл. 1). Введение АОК-селен наиболее значительно снижало концентрацию свободной фракции йодида, – что, по-видимому, является следствием оптимизации функционирования ТПО, активность которой на фоне введения препарата повысилась на 47,27% по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что на фоне введения АОК нормализовалась масса ЩЖ, которая была снижена у крыс на 15,12% по сравнению с контролем. В постстрессорный период концентрации T_4 и T_3 в сыворотке крови крыс (группа стресс+АОК-селен) соответствовали контрольным значениям; введение АОК оптимизировало тиреоидный статус, приводя к повышению уровней T_4 и T_3 в крови – соответственно на 27,22% и 19,33% (табл. 2).

Таблица 2. – Влияние АОК на состояние тиреоидного статуса крыс при воздействии 20-минутного ежедневного стресса в течение 4 недель

Показатель	Контроль	Стресс	АОК	Стресс+АОК
	А	Б	В	Г
T_4 , нмоль/л	49,23±2,82	51,70±3,34	62,63±6,25 ^А	49,07±4,74 ^Б
T_3 , нмоль/л	1,19±0,066	1,29±0,077	1,42±0,102 ^А	1,17±0,071 ^Б
$T_3/T_4 \times 100$	2,44±0,142	2,57±0,214	2,404±0,306	2,56±0,306
Концентрация белка в ЩЖ, мг/г ткани	217,45±5,16	186,81±5,13 ^А	201,09±2,78 ^{АБ}	208,76±5,33 ^Б

Характеризуя эффекты АОК-селен на тиреоидный статус крыс при стрессе, необходимо отметить очень важный факт: – повышение концентрации общего белка в ЩЖ в группе стресс+АОК – по сравнению с группой стресс до контрольных значений (табл. 2). В исследованиях, представленных ранее, было высказано предположение, что негативные эффекты стресса характеризуются нарушением синтеза тиреоглобулина в ЩЖ, что может быть обусловлено стресс-индуцированным ингибированием его синтеза и нарушением восстановления его уровня в постстрессорный период (75-80% от общего содержания белка в

ЩЖ составляет тиреоглобулин). Защитные эффекты низкомолекулярных антиоксидантов на синтез белка в ЩЖ обусловлены, по-видимому, более низким уровнем окислительных повреждений различных клеточных органелл при стрессе. В этих условиях сохраняется возможность для нормальной регуляции и функционирования тироцитов в условиях стресса.

В таблице 3 представлены данные по влиянию препарата АОК-Se на показатели метаболизма ЩЖ крыс через 24 часа после облучения в дозах 0,25, 1,0 и 5,0 Гр. Препарат вводился в течение недели до облучения. Однократное воздействие γ -излучения вызывало снижение активности ТПО (на 31,5 и 54,0%), концентрации тироксина в крови при дозе облучения 0,25, 1,0 и 5,0 Гр – соответственно на 43,33%, 33,96% и 48,29%. На фоне введения препарата АОК-Se ингибирования ТПО, а также снижения концентрации T_4 и T_3 при воздействии γ -излучения, не наблюдалось, что свидетельствует о выраженном тиреопротекторном эффекте.

Введение антиоксидантного комплекса (Вита селен Е) в условиях дефицита йода способствовало оптимизации йодного метаболизма ЩЖ, повышению содержания йода в 2,44 раза и стабилизации йодного гомеостаза организма. Это обусловлено оптимальным функционированием селензависимых дейодиназ, а также системы ферментов метаболизма глутатиона (селензависимая ГПО). Проведенные исследования позволили разработать алгоритм для конструирования тиреопротекторных йодсодержащих препаратов, основными векторами которого являются: неорганические и органические формы йода, минеральный комплекс, препараты селена, биологически активные препараты с регенерационными и адаптагенными свойствами. Получены 2 йодсодержащих препарата – «ЭКДШ-Йод» и «Фукус-Йод», при использовании которых для коррекции йодного дефицита у крыс установлена их более высокая эффективность в восстановлении йодного и тиреоидного статуса, структурных нарушений ткани ЩЖ, снижении ее массы, оптимизации углеводного и липидного обмена, по сравнению с широко используемым препаратом KI.

Таблица 3. – Влияние препарата АОК-селен на показатели метаболизма ЩЖ при однократном воздействии внешнего γ -излучения

Показатель	Введение АОК-селен	Контроль	0,25 Гр	1,0 Гр	5,0 Гр
Активность ТПО, мкмоль×мин/г. белка	Не вводился	48,40±4,99	40,76±2,30	33,16±3,44 ^К	22,25±4,33 ^К
	АОК-селен	43,1±11,17	64,9±11,67	85,0±16,57	78,55±15,88
Концентрация общего йода в ЩЖ, мкг/г ткани	Не вводился	193,8±16,19	144,6±9,21	257,1±16,6 ^К	236,9±14,7 ^К
	АОК-селен	288,3±17,2	250,0±29,2	288,8±18,5	272,2±20,7
Концентрация T_4 в крови, нмоль/л	Не вводился	64,2±6,0	35,1±4,0 ^К	42,4±6,5 ^К	33,2±4,6 ^К
	АОК-селен	44,19±4,9	38,74±4,78	51,9±5,2	35,18±3,9
Концентрация T_3 в крови, нмоль/л	Не вводился	1,34±0,41	1,11±0,39	1,0±0,19	0,92±0,06 ^К
	АОК-селен	0,85±0,11	1,19±0,23	1,12±0,13	0,82±0,11

Заключение. Введение антиоксидантных препаратов значительно нормализует метаболические изменения в ЩЖ, индуцированные стрессорным воздействием. Эти данные подтверждают роль окислительного стресса как ключевого механизма нарушения функции ЩЖ при стрессорных воздействиях различного характера. Полученные результаты доказывают высокую эффективность и целесообразность использования антиоксидантных комплексов как тиреопротекторного средства в условиях хронического воздействия психоэмоционального и радиационного стресса. Эффекты АОК – следствие оптимизации метаболизма на фоне адекватной регуляции биосинтеза гормонов в ЩЖ; представляет

интерес исследование эффектов других антиоксидантных препаратов для регуляции антиоксидантно/прооксидантного баланса ЩЖ.

THYROID PROTECTIVE PROPERTIES OF COMBINED ANTIOXIDANT PREPARATIONS

Nadolnik L.I., Chumachenko S.S., Goreva D.A., Valentsyukevich O.I., Yas'kevich S.S., Klimovich P.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus

It was established that the administration of the combined antioxidant preparations "Antioksidaps-Selen" and "Vita Selen E" corrected thyroid metabolism in rats with chronic stress, methymazol-induced hypothyroiditis and under exposure to external gamma-radiation, optimizing the iodine metabolism and the function of key enzymes. The novel iodine-containing preparations "EKDSH –Iod" (extract from oak silkworm pupae) and "Fucus-Iod" were obtained and their high efficiency in correction of the rat thyroid status under iodine deficiency was shown.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ С ПОМОЩЬЮ ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

¹Назаров В.А., ²Астапович Р.И., ^{1,3}Здрачек Е.А., ^{1,3}Егоров В.В.

¹Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета
220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14;

²Белорусский государственный университет, биологический факультет
220064, г. Минск, ул. Курчатова, 10;

³Белорусский государственный университет, химический факультет
220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 14

Физиологически активные амины (ФАА) синтетического и природного происхождения находят широкое применение в современной фармации (анальгетики и анестетики, антибиотики, витамины, нейролептики, миорелаксанты и др.). В настоящее время основным методом определения ФАА в лекформах является ВЭЖХ [1]. К недостаткам метода можно отнести сложность пробоподготовки и высокую стоимость оборудования. Достаточно широко используются также экстракционная фотометрия и кислотно-основное титрование в неводных средах [2]. Недостатком этих методов является использование летучих и токсичных органических растворителей. В этом плане весьма перспективным представляется потенциометрический метод анализа с использованием ионоселективных электродов (ИСЭ) с пластифицированными полимерными мембранами [3]. Объективными достоинствами метода являются простота пробоподготовки, возможность проведения измерений в мутных и окрашенных средах, экспрессность, широкий диапазон определяемых концентраций (обычно – несколько десятичных порядков), низкая стоимость оборудования. Также немаловажным обстоятельством является простота изготовления ИСЭ, которые легко могут быть получены в любой лаборатории. Необходимо отметить, что при анализе лекформ с помощью ИСЭ от последних не требуется абсолютной селективности, т.к. объект обладает жестко регламентированным составом, а селективность ИСЭ в значительной степени обусловлена

липофильностью определяемых ФАА и, как правило, достаточна для определения целевого компонента в присутствии вспомогательных веществ лекформы [3].

Ранее нами были установлены основные закономерности влияния состава мембраны (природы пластификатора, ионообменника, наличия нейтрального переносчика и липофильной ионной добавки) на селективность ИСЭ к катионам ФАА различного строения и сформулированы принципы выбора состава мембраны с оптимальной селективностью, исходя из особенностей строения определяемого и посторонних ионов [4]. Предложены составы мембран ионоселективных электродов для определения амброксола, амиодарона, анаприлина, бромгексина, верапамила, винпоцетина, дротаверина, кетотифена, лоперамида, мидантана, тербинафина и триметоприма и определены важнейшие характеристики соответствующих электродов: селективность, нижний предел обнаружения, наклон и линейная область электродной функции, рабочий диапазон рН, воспроизводимость потенциала, время отклика. Разработанные электроды были использованы для определения указанных ФАА в лекформах (таблетках, капсулах, сиропе, ампулах для инъекций и т.д.) методами прямой потенциометрии (ПП) и потенциометрического титрования (ПТ).

Методы исследования. Мембраны ИСЭ готовились по стандартной методике [5] и содержали следующие компоненты: поливинилхлорид – 33%, ионообменник – $1 \cdot 10^{-2}$ М, пластификатор – остальное. В качестве ионообменника использовали *тетраakis(4-хлорфенил)борат* натрия, в качестве пластификаторов – *о*-нитрофенилоктиловый эфир, динониладипинат и *трис(2-этилгексил)фосфат*.

В качестве внутреннего раствора сравнения использовали смесь гидрохлорида соответствующего ФАА (как правило, $1 \cdot 10^{-3}$ М) и хлорида калия ($1 \cdot 10^{-2}$ М). Внутренним электродом сравнения служила серебряная проволока, покрытая электроосажденным хлоридом серебра. Перед проведением измерений электроды вымачивали в растворе соответствующего ФАА ($1 \cdot 10^{-3}$ М) в течение суток.

Определение содержания ФАА в модельных растворах и лекформах проводили методом ПП (в вариантах стандартного раствора и ограничивающих растворов) и методом ПТ с тетрафенилборатом натрия (NaТФБ). Метод стандартного раствора (градуировка по одной точке) основан на последовательном измерении потенциала ИСЭ в стандартном и анализируемом растворах. Метод ограничивающих растворов основан на последовательном измерении потенциалов ИСЭ в трех растворах: в стандартном растворе с меньшей концентрацией, анализируемом растворе и стандартном растворе с большей концентрацией. При анализе методом потенциометрического титрования предварительно устанавливали титр NaТФБ по стандартному раствору соответствующего ФАА. Для предотвращения попадания в исследуемый раствор из электрода сравнения ионов калия, также титрующихся тетрафенилборатом, использовали солевой мост на основе ацетата лития. Было установлено, что триметоприм и амброксол не титруются в указанных условиях.

Результаты. При пробоподготовке таблеток всех исследованных лекформ придерживались некоторых общих правил. Отбирали десять таблеток исследуемой лекформы, растирали их в ступке, затем отбирали навеску, эквивалентную тому или иному количеству таблеток, в зависимости от содержания ФАА так, чтобы при их растворении концентрация ФАА составляла $n \cdot 10^{-4}$ – $n \cdot 10^{-3}$ моль/л, что является наиболее приемлемым диапазоном для анализа как методом ПП, так и ПТ. Навеску препарата в случае плохо растворимых ФАА (амиодарон, бромгексин, винпоцетин) – растворяли в $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоте. В случае кетотифена навеску предварительно экстрагировали смесью ацетонитрил : $2 \cdot 10^{-3}$ М фосфорная кислота = 50 : 50, а вытяжку затем растворяли в дистиллированной воде. В остальных случаях навеску растворяли в дистиллированной воде.

Полученный раствор не фильтровали, т.к. в специальных опытах на модельных растворах и лекформах анаприлина и лоперамида было установлено, что фильтрование пробы на бумажном фильтре «синяя лента» приводит к систематическому (до 25%)

занижению результатов определения. Кроме того, отказ от фильтрования позволил значительно ускорить пробоподготовку и уменьшить общее время анализа.

При растворении содержимого ампул для инъекций отбирали фиксированный объем их раствора вместо количественного переноса всего содержимого ампулы. Это обусловлено тем, что в случае определения винпоцетина было установлено, что все ампулы препарата содержали несколько больший, по сравнению с заявленным, объем раствора.

При определении *амброксола* в таблетках (30 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $29,54 \pm 0,08$ мг/табл. При определении *амброксола* в сиропе (6 мг/мл) отбирали 5 мл препарата и растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $6,02 \pm 0,04$ мг/мл.

При определении *амиодарона* в таблетках (200 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 1000 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоты. Содержание, найденное методом ПТ, составило 197 ± 3 мг/табл.

При определении *анаприлина* в таблетках (10 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $9,64 \pm 0,04$ мг/табл., методом ПТ – $9,83 \pm 0,03$ мг/табл.

При определении *бромгексина* в таблетках (8 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 100 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоты. Содержание, найденное методом ПП, составило $7,78 \pm 0,08$ мг/табл., методом ПТ – $7,85 \pm 0,09$ мг/табл. При определении *бромгексина* в сиропе (0,8 мг/мл) отбирали 10 мл препарата и растворяли в 100 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоты. Содержание, найденное методом ПП, составило $0,791 \pm 0,004$ мг/мл, методом ПТ – $0,793 \pm 0,006$ мг/мл.

При определении *верапамила* в таблетках (80 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $79,6 \pm 0,7$ мг/табл., методом ПТ – 78 ± 1 мг/табл.

При определении *винпоцетина* в таблетках (5 мг/табл.) навеску эквивалентную 4 таблеткам растворяли в 100 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоты. Содержание, найденное методом ПП, составило $4,92 \pm 0,02$ мг/табл., методом ПТ – $4,98 \pm 0,06$ мг/табл. При определении *винпоцетина* в ампулах (0,8 мг/мл) отбирали 4 мл препарата и растворяли в 100 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М фосфорной кислоты. Содержание, найденное методом ПП, составило $4,94 \pm 0,08$ мг/мл, методом ПТ – $5,07 \pm 0,08$ мг/мл.

При определении *дротаверина* в таблетках (40 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 250 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $39,9 \pm 0,6$ мг/табл., методом ПТ – $39,7 \pm 0,5$ мг/табл.

При определении *кетотифена* в таблетках (1 мг/табл.) навеску эквивалентную 8 таблеткам экстрагировали смесью ацетонитрил : фосфорная кислота, вытяжку затем растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $1,00 \pm 0,03$ мг/табл., методом ПТ – $1,03 \pm 0,01$ мг/табл.

При определении *лоперамида* в капсулах (2 мг/капс.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $1,00 \pm 0,03$ мг/табл., методом ПТ – $1,03 \pm 0,01$ мг/табл.

При определении *мидантана* в таблетках (100 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 250 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило $98,6 \pm 1,0$ мг/табл., методом ПТ – $97,9 \pm 1,4$ мг/табл.

При определении *тербинафина* в спиртовом растворе (10 мг/мл) отбирали 16 мл препарата и растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПТ составило $10,05 \pm 0,06$ мг/мл.

При определении *триметоприма* в таблетках (80 мг/табл.) навеску эквивалентную 1 таблетке растворяли в 2000 мл дистиллированной воды. Содержание, найденное методом ПП, составило 77±3 мг/табл.

Время, необходимое на единичный анализ (при наличии оборудованного рабочего места и всех необходимых растворов, а также без учета пробоподготовки), для всех приведенных выше методик составляет ~5 – 10 мин. для ПП и ~ 10 – 15 мин. – для ПТ.

Заключение. Разработаны методики определения ФАА (амброксола, амиодарона, анаприлина, бромгексина, верапамила, винпоцетина, дротаверина, кетотифена, лоперамида, мидантана, тербинафина и триметоприма) методами ПП и ПТ. Методики отличаются экспрессностью, хорошей точностью и правильностью и не требуют дорогостоящего оборудования.

Литература:

1. United States Pharmacopeia National Formulary, USP 26, NF 21. Rockville, 2003.
2. Государственная фармакопея СССР XI издание, в 2 т. – М.: Медицина, 1990.
3. Stefan R.I., van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y. *Electrochemical Sensors in Bioanalysis*. New York.: Marcel Dekker Inc, 2001. – 311 p.
4. V.V. Egorov, A.A. Bolotin Ion-selective electrodes for determination of organic ammonium ions: ways for selectivity control // *Talanta*. 2006. Vol. 70. P. 1107-1116.
5. Никольский Б.П., Матерова Е.А. Ионоселективные электроды. Л.: Химия, 1980. – 240 с.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE AMINES IN DRUGS USING ION SELECTIVE ELECTRODES

¹Nazarov V.A., ²Astapovich R.I., ^{1,3}Zdrachek E.A., ^{1,3}Egorov V.V.

¹Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University
220030, Minsk, Leningradskaya str., 14;

²Belarusian State University, Biological department 220064, Minsk, Kurchatova str., 10;

³Belarusian State University, Chemical department 220030, Minsk, Leningradskaya str., 14

Direct potentiometry and potentiometric titration techniques for physiologically active amines (ambroxole, amiodaron, anaprilin, bromhexin, vinpocetine, drotaverine, ketotifen, loperamide, midantane, terbinafine and trimetoprim) determination were developed. Techniques are express, accurate and precise, and don't need expensive equipment.

АНТИАЛКОГОЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРЕПАРАТА В ТЕСТЕ ПРИПОДНЯТОГО КРЕСТООБРАЗНОГО ЛАБИРИНТА НА МЫШАХ С57BL/6

Насек В.М., Нехай А.С., Пронько П.С.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск,
ул. академика В.Ф. Купревича, 2; Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50,
E-mail: labtox@yandex.ru

В фармакотерапии алкоголизма в последние годы большой интерес вызывают перспективы применения производных аминокислот и янтарной кислоты – естественных метаболитов организма человека.

Целью данного исследования явилось изучение влияния разработанного в нашем институте нового антиалкогольного средства на основе янтарной кислоты на исследовательскую поведенческую активность мышей после хронической алкогольной интоксикации в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)[1].

Эксперимент выполнен на 24 мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 17 – 20 г, разделенных на 3 группы по 8 особей: I – контрольная, II и III – опытные, которым ежедневно внутривентрикулярно вводили 24% раствор этанола в дозе 2 г/кг (в пересчете на чистый этанол) в течение 7 суток. На восьмые сутки исследования III группе однократно (per os) вводили суспензию изучаемого препарата в дозе 1000 мг/кг, а II группе вводили эквивалентное количество растворителя (вода дистиллированная), через 2 часа обеим группам вводили раствор этанола в вышеуказанной дозе. Контрольная группа животных получала эквивалентное количество растворителя.

Регистрацию поведения животных в ПКЛ проводили на восьмые сутки через 0,5, 1,0 и 1,5 часа после введения раствора этанола. В данном тесте регистрировались: латентный период начала исследования лабиринта, время посещения 13 рукавов лабиринта, число посещений рукавов при первом полном обходе лабиринта, количество полных обходов лабиринта, количество возвратов в предыдущий рукав, поочередное посещение двух из четырех рукавов, количество правых и левых поворотов. Перечисленные параметры поведения позволяют провести комплексную оценку действия алкоголя на различные стороны поведения животных, их память, выявить появление патологических форм поведения.

Поведение животных II группы, получавших этанол, отличалось от контрольной группы по следующим параметрам: достоверно уменьшилось общее время, затраченное на посещение 13 рукавов, количество возвратов в рукава и увеличилось количество стереотипных визитов, кроме того, имела место выраженная тенденция к уменьшению латентного периода начала исследования лабиринта. Эти данные указывают на более низкий уровень ситуативной тревожности и усиление стереотипного поведения в тесте ПКЛ мышей II группы по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует о развитии алкогольной интоксикации. Кроме того, через 1,5 часа после введения этанола у животных отмечалось уменьшение числа полных обходов лабиринта, что указывает на угасание исследовательской активности на фоне выраженной алкогольной интоксикации.

У животных III группы введение изучаемого препарата за 2 часа до введения этанола на фоне 7-дневной предварительной алкоголизации вызывает достоверное уменьшение латентного периода начала исследования лабиринта, уменьшение числа возвратов, увеличение количества поворотов направо, тенденцию к уменьшению общего времени, затраченного на посещение 13 рукавов по сравнению с контролем. Кроме того, через 1,5 часа после введения этанола у мышей III группы число полных обходов лабиринта сохранялось на исходном уровне. Таким образом, у животных, получивших препарат в дозе 1000 мг/кг на фоне алкоголизации, отмечается нормализация уровня исследовательской активности, снижение числа ошибок краткосрочной памяти, при этом пониженный после введения этанола уровень тревожности не повышается до контрольных значений.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что однократное внутривентрикулярное введение нового препарата ослабляет выраженность алкогольной интоксикации. Полученные данные подтверждают обоснованность рекомендаций по применению данного лекарственного средства для профилактики и лечения отравлений этанолом, а также расстройств, наблюдаемых в постинтоксикационный период.

Литература:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // под общей ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С.342-356.

ANTI-ALCOHOL ACTIVITY OF A NOVEL DRUG IN MICE C57BL/6 IN ELEVATED PLUS MAZE TEST

Nasek V.M., Nekhai A.S., Pronko P.S.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk; Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus, E-mail: labtox@yandex.ru

The effect of a novel drug with anti-alcohol activity on the exploratory behavior of male mice was studied in the elevated plus maze test. The results demonstrate that oral administration of the drug decreased symptoms of alcohol intoxication and normalized the exploratory behavior of the animals, while having no significant effect on the anxiety level.

АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ФИТОПРЕПАРАТА «РАЦИУМ»

Насек В.М., Шоломицкая Е.Ю., Кравченко Е.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: labtox@yandex.ru

К возможным побочным эффектам, возникающим при применении лекарственных средств, относится формирование состояния гиперчувствительности (сенсibilизации) к какому-либо веществу, входящему в состав препарата. Выявление таких эффектов у разрабатываемых фармакологических средств является обязательным этапом их доклинической оценки [1].

Фитопрепарата «Рациум» предполагается использовать как лекарственное средство с седативными, анксиолитическими свойствами. Он состоит из порошка сухих корневищ с корнями валерианы, травы мелиссы, листьев мяты и разрешенных к медицинскому применению вспомогательных веществ, и предназначается для поддержания в физиологических границах функциональной активности нервной системы, для профилактики, экстренного или длительного лечения невротических и связанных со стрессом расстройств, повышенной тревожности, депрессии, нарушений сна.

Изучение местно-раздражающего и сенсibilизирующего действия готовой лекарственной формы (ГЛФ) «Рациум» позволяет оценить не только местную реакцию тканей, с которыми она соприкасается при интрагастральном введении, но и предотвратить последствия возможной аллергической реакции, связанной с сенсibilизацией иммунной системы всего организма.

Цель настоящего исследования - выявление возможных аллергизирующих и сенсibilизирующих свойств готовой лекарственной формы фитопрепарата «Рациум» на экспериментальных моделях *in vivo*.

В опытах по изучению сенсibilизирующей активности методом накожных аппликаций [2] использовали крыс линии Вистар обоего пола массой 200 - 220 г (8 групп по 5 животных). Суспензию ГЛФ «Рациум» втирали 1 раз в сутки в течение 28 дней на выстриженный от шерсти участок боковой поверхности туловища размером 2,0×2,0 см, двум группам – самцы и самки – в дозе 100 мг/кг, двум – 500 мг/кг, и двум – 1000 мг/кг. Наряду с опытными группами были сформированы контрольные группы самцов и самок, которым втирали в эквивалентных количествах растворитель, используемый для приготовления суспензии (дистиллированная вода). На 14 сутки на подобный участок противоположной стороны втирали ту же суспензию с целью разрешения сенсibilизирующей пробы.

Изучение алергизирующего, иммунотоксического действия в тесте опухания лапы [3] проводили на крысах линии Вистар (по 5 животных обоего пола в опытных и контрольных группах, массой 205-220 г). Животных сенсibilизировали 30 мкл экстракта ГЛФ «Рациум» однократно внутрикожно в основание хвоста. Экстракцию ГЛФ фитопрепарата «Рациум» проводили в стерильных условиях. Для этого в 450 мл дистиллированной воды для инъекций при температуре 37°С растворяли одну капсулу ГЛФ «Рациум» равную 0,4 г, и перемешивали на магнитной мешалке в течении 45 минут [4]. Затем в соотношении 1:1 готовили смесь с иммуностимулятором – полным адьювантом Фрейнда (далее – ПАФ) при их тщательном совместном эмульгировании (интенсивном перемешивании на магнитной мешалке). Подопытным животным вводили по 60 мкл сенсibilизирующей дозы в ПАФ, контрольным – по 60 мкл смеси ПАФ с растворителем (вода дистиллированная).

Для выявления сенсibilизации на 6-е сутки крысам в подушечку задней лапы вводили 40 мкл экстракта ГЛФ «Рациум» – тест опухания лапы крысы (ТОЛК). Контрольным животным вводили 40 мкл дистиллированной воды.

О величине отека (показатель ТОЛК), т.е. о развитии гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), судили по разнице в толщине левой и правой лап, измеряемой через 24 часа после перкутанного тестирования цифровым плетизмометром LE7500 “Panlab S.L.”. Для определения вероятных изменений между показателями опытных и контрольных животных использовали t-критерий Стьюдента.

Оценку ТОЛК в баллах проводили по следующей шкале: 0 баллов - ТОЛК до 0,1 мл; 1 балл - 0,11-0,20 мл; 2 балла - 0,21-0,30 мл; 3 балла - 0,31-0,40 мл; 4 балла - 0,41-0,50 мл; 5 баллов - 0,51 мл и более. Среднегрупповые показатели ТОЛК опытных и контрольных животных рассчитывали в абсолютных (мл) и относительных (балл) единицах.

Результаты исследования показали, что общее состояние, внешний вид, поведение экспериментальных животных после накожных аппликаций экстракта ГЛФ «Рациум» в течение 28 суток ничем не отличались от контрольных групп. На втираемых участках кожи к этому времени произошло почти полное оволосение. Аппетит, прирост массы и температура тела подопытных крыс были аналогичны контрольным группам животных. Сенсibilизации испытуемых участков кожи выявить не удалось.

Таким образом, метод накожных аппликаций показал, что ГЛФ фитопрепарата «Рациум» в дозах 100, 500, 1000 мг/кг не обладает сенсibilизирующей способностью. Это подтверждается данными, полученными после некропсии в ходе субхронического и хронического эксперимента, когда не удалось выявить патологических изменений в структуре внутренних органов ЖКТ на макро- и микроскопическом (гистологическом) уровне. Полученные результаты дают возможность сделать вывод об отсутствии местно-раздражающего эффекта.

Изучение потенциальной алергенной опасности по тесту опухания лапы крыс показало, что показатели алергизации крыс линии Вистар при внутрикожном введении экстракта ГЛФ «Рациум» подопытным и плацебо контрольным животным статистически значимо не различались как по абсолютному, так и относительному показателю ТОЛК.

Уровень сенсibilизации составил 6%; $p > 0,05$ и 5%; $p > 0,05$ у самцов и самок соответственно по сравнению с контрольными значениями.

По результатам проведенного эксперимента на крысах линии Вистар можно сказать, что исследуемое вещество с учетом статистической значимости среднегрупповых показателей аллергологического тестирования в опыте по сравнению с контролем по критерию t , а также по частоте положительных тестов аллергодиагностики относится к слабым аллергенам.

Следовательно, ГЛФ фитопрепарата «Рациум» не обладает аллергизирующими свойствами, не оказывает существенного влияния на формирование гиперчувствительности замедленного типа у крыс при нанесении на кожу, внутрикожной сенсibilизации и не обладает местно-раздражающим действием.

Литература:

1. ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика».
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // под общей ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
3. Инструкция 1.1.11-12-35-2004. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ. - Мн., 2004. - 44 с.
4. Государственная Фармакопея Республики Беларусь / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; ред. совет: Г.В. Годовальников (председатель ред. совета) [и др.]. – Минск, 2006. – 3 т.

ALLERGENIC PROPERTIES OF READY MEDICINAL FORM OF PHYTOPREPARATION “RACIUM”

Nasek V.M., Sholomitskaya E.Yu., Kravchenko E.V.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The locally irritative sensitizing activity of dosage form of phytopreparation “Racium” has been studied by the stomach observation after autopsy, by the method of skin applications and the reaction of delayed-type hypersensitivity (DTH) in test of animal limb tumescence. In the experiment on Wistar rats, the studied phytopreparation “Racium” has not caused neither local irritation nor DTH formation at the intracutaneous sensitization, therefore it has been categorized as weak allergen.

ВОЗМОЖНОСТИ НЕТРАДИЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ СТРЕПТОКИНАЗЫ: ИССЛЕДОВАНИЯ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ И КЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ

^{1,2} Никандров В.Н., ² Пыжова Н.С., ¹Жук О.Н.

¹*Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь;*

²*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, г. Минск, Беларусь*

Традиционно до сих пор препараты стрептокиназы (СК) используются в клинической медицине для растворения тромбов, отложений фибрина.

В период 1975–1981г. сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР был разработан отечественный лечебный препарат SK для внутрисосудистого введения – «целиаза» (А.с. СССР № 1249936). В 1983 г. Минздравом СССР утверждена документация на этот препарат и разрешен его серийный выпуск, который на протяжении ряда лет осуществлялся Предприятием по производству бакпрепаратов при НИИ эпидемиологии и микробиологии. В середине 80-х годов параллельно в Минске на заводе Медпрепаратов началось освоение технологии получения препарата SK по лицензии фирмы “Behringwerke AG”.

В 1987 – 1991 нами описаны супероксиддисмутазо-подобная активность SK, ингибирование ее плазминоген-активаторной способности перехватчиками супероксидного радикала (нитротетразолиевым синим, адреналином), нуклеотидами (АТФ, сАМР). В последствии изложены концепция кислородзависимого пути активации плазминогена и гипотеза кислородзависимого протеолиза [1].

В 1987 г. нами совместно с НИИ травматологии и ортопедии Минздрава Республики Беларусь был предложен SK-содержащий состав для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами (Патент РФ № 2027432). Применение его местно по жизненным показаниям в хирургических клиниках Минска (клиника НИИ травматологии и ортопедии, отделение гнойной хирургии 9-ой ГКБ, НИИ кардиологии) дало хорошие результаты. Во всех случаях применения было достигнуто заживление ран. Ранее коллективом латвийских исследователей был также зафиксирован благотворный эффект внутривенного введения SK при хроническом простатите или хроническом гепатите (А.с. СССР № 1132951 и № 1232253).

В 1989 г. инстилляции SK использованы для лечения экспериментального герпетического кератоконъюнктивита у кроликов (А.с. СССР № 1822790).

В период с 1999 г. на первичных культурах коры головного мозга, вегетативных и чувствительных ганглиев, а также на перевиваемых культурах клеток крысиной глиомы С6, человеческой нейробластомы IMR-32, крысиной феохромоцитомы РС12 получена совокупность оригинальных, ранее не описанных в литературе данных, иллюстрирующих нейротрофические и протекторные свойства SK при воздействии на клетки нервной ткани повреждающих факторов различной природы.

Так, перевод диссоциированных культур неокортекса новорожденных крыс на 14 сут на дефицитную по белкам сыворотки (0,5% эмбриональной телячьей сыворотки вместо 15%) питательную среду через 48 ч вызвал статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток [2, 3]. Внесение же SK сохраняло этот показатель на уровне обогащенной сывороткой питательной среды.

Как показали результаты электронной микроскопии, при переводе культуры на среду с дефицитом по белкам сыворотки уже через 24 ч в астроцитах отмечены конденсация хроматина, множественные глыбки гиперхромного материала с предпочтительной локализацией у внутренней мембраны ядра. Сама мембрана расслаивалась, образуя выпячивания в сторону цитоплазмы. Цитоплазматические органеллы теряли характерную морфологию и вакуолизировались. Реактивные изменения отмечены в ядрах нейронов. В нейропиле отростки теряли правильную форму, их мембрана расслаивалась, исчезали органеллы [2, 3]. Если культивирование на дефицитной по белкам среде сочетали с добавкой SK (10^{-5} М), эти деструктивные изменения не проявлялись. Организация эксплантата сохранена, клетки нервной ткани не несли признаков деструкции. Интересной особенностью являлось обилие в нейронах митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами. Через 48 ч экспозиции в такой среде астроциты в поле зрения редки. По-видимому, именно они поражались в первую очередь. Появлялись клетки, содержащие многочисленные миелиновые тельца, лизосомы и вакуоли. Возможно, это результат

поглощения обломков разрушившихся клеток. В то же время, нейроны к такому воздействию более устойчивы.

СК заметно стимулировала формирование зоны роста органотипических культур чувствительного (спинального) и симпатического (краниального шейного) ганглиев [2, 3]. На питательной среде, содержащей 10% сыворотки крови, влияние СК было более выражено. Зона роста культур в присутствии СК имела повышенную плотность за счет интенсивной пролиферации и миграции из эксплантата клеток различной природы. Особо выделялись многочисленные шванновские клетки вдоль радиально направленных отростков нервных клеток [2, 3]. Наблюдение за культурами свыше 14 сут *in vitro* показало способность СК в питательной среде, содержащей 10% сыворотки крови, значительно улучшать рост и развитие этих ганглиев новорожденной крысы.

СК способствовала также увеличению жизнеспособности клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32, стимулировала их пролиферацию [4]. В концентрации 10^{-7} – 10^{-11} М она оказывала явный митогенный эффект, что выражалось в увеличении индекса пролиферации уже через 24 ч культивирования: так, индекс пролиферации клеток глиомы С6 в этот период возрос на 125–147%, а на третьи сутки – на 230365% в сравнении с контролем. Увеличение этого индекса для нейробластомы при концентрации СК 10^{-7} и 10^{-9} М составило 26–42% и 45–130 % соответственно. СК вызвала в этих клетках рост уровня ДНК, РНК и белка, начиная уже с первых суток культивирования [4]. Судя по результатам фазово-контрастной микроскопии, СК стимулировала развитие клеток этих линий.

Добавление СК к культуре феохромоцитомы РС12 вела к существенному угнетению АТР-активируемого протеолиза, сильному подавлению I-кальпаиновой активности вплоть до полного ее отсутствия. Практически мы не наблюдали повышения уровня этого типа протеолиза, сложный характер зависимости «эффект-концентрация» в случае II-кальпаиновой активности [2, 3].

При экспозиции 24 ч СК (2000, 200 или 2 МЕ) вызывала в клетках глиомы С6 существенные изменения активности лактатдегидрогеназы, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы [5].

Защитное действие СК явно проявлялось при воздействии холода, вызвавшем полную гибель органотипических культур спинального ганглия в среде, содержащей 0,5% сыворотки крови, и частичную гибель культур в среде, содержащей 10% сыворотки [2, 3]. Добавка СК в значительной степени защищала эти ганглии от холодового стресса, внешний вид культуры сохранялся, за исключением незначительных повреждений отдельных клеток зоны роста ганглиев.

Аденозинтрифосфат в анионной форме (АТР, 10^{-3} М) в такой же среде способствовал дальнейшему уменьшению доли жизнеспособных клеток до $77,23 \pm 0,64\%$ против $88,13 \pm 0,14\%$ в контроле и дезорганизации ультраструктуры нервных и глиальных клеток органотипической культуры неокортекса новорожденных крыс. Внесение АТР совместно с СК вело к увеличению доли жизнеспособных клеток до $86,53 \pm 0,97\%$, позволило сохранить организацию клеток эксплантата, что сопоставимо с действием только одной СК и с контролем (обогащенной белками среда). Следовательно, СК способна полностью нивелировать деструкцию АТР клеток нервной ткани. Более продолжительное влияние СК провоцировало развитие деструктивных изменений.

Защитное действие СК четко проявилось также при повреждающем воздействии на клетки нервной ткани гидропероксида, ионов аммония или эксайтотоксичного глутамата.

Все это свидетельствует о способности СК воздействовать на клетки и ткани непосредственно, минуя кровотоки и, принципиально, ставит на иную платформу изучение ее биологического действия, ибо с таких позиций эффекты СК являются чрезвычайно слабо изученными. Изложенные материалы показывают, что эффекты СК во многом зависят от типа клеточных элементов и их состояния их. Складывается впечатление, что в коре

головного мозга наиболее чувствительны астроциты, тогда как нейроны более устойчивы. Это, разумеется, не означает их полной резистентности. Как показали электрофизиологические исследования, суперфузия понтобульбоспинального препарата мозга крысы раствором СК вела к обратимому возрастанию частоты генерации респираторных залпов на 50–55%. Следовательно, изменения со стороны нейронов также могут иметь место. В ряде наших экспериментов СК брали в достаточно высокой концентрации – $5 \cdot 10^{-6}$ М, а при избытке СК активный плазмин не образуется. Надо сказать, что в опытах со СК на культурах симпатобластов и спинальных ганглиев мы не фиксировали появление фибринолитической (плазминовой) активности, однако энзиматический анализ свидетельствовал о присутствии функционально активной СК (практически нерасщепленной) в таких культурах.

И еще один штрих. Важную проблему клинической медицины составляют патологические процессы, инициируемые патогенными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. В арсенал факторов патогенности входят высокоактивные протеиназы. Как показали наши исследования, СК на 20–100% подавляла фибринолитическую активность клеточных протеиназ госпитальных штаммов псевдомонад.

Представленные результаты позволяют считать, что потенциал клинического применения препаратов СК не исчерпан. Эти результаты обозначили направления дальнейших работ, реализация которых даст в перспективе конкретные решения для использования СК в лечебных целях по новому назначению.

Литература:

1. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis // Cellular and Molecular Biology, 2006, vol. 52, № 4, p. 30–39.
2. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Пыжова Н.С., Петрусенко Г.П., Романовская А.А. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера // In: “Materials, methods and technology. Scientific articles 2007”. Sci. Invest. LTD–branch Bourgas. Bulgaria, 2007, p. 48–66.
3. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф., Гронская Р.И., Романовская А.А. Действие плазминогена и стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани в культуре // Биомед. химия, 2008, т. 54, № 2, с. 192–200.
4. Романовская А.А., Никандров В.Н. Плазминоген и стрептокиназа в регуляции пролиферации клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 // Доклады НАН Беларуси, 2007, т. 51, № 2, с. 57–60.
5. Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Гронская Р.И. Модуляция углеводно-энергетического метаболизма клеток нервной ткани при воздействии плазминогена и стрептокиназы // В кн.: «Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии. Матер. респ. конф. с междунар. участием». Гродно, 2010, с. 165–169.

POSSIBILITIES OF NONCONVENTIONAL APPLICATION OF STREPTOKINASE: STUDIES AT THE MOLECULAR AND CELLULAR LEVELS

^{1,2}Nikandrov V.N., ²Pyzhova N.S., ¹Zhuk O.N.

¹Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus;

²Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Public Health, Minsk, Belarus

Results of own long-term researches are generalized. The obtained results allowed to discover the new functional properties of streptokinase (SK) molecule, to propose the conception of oxygen-dependent pathway of plasminogen activation and the hypothesis of oxygen-dependent proteolysis. On this basis SK was used for treatment of patients with long-nonhealing wounds, herpetic keratoconjunctivitis. On the cultures of nervous tissue cells the neurotrophic properties of SK, its protective effect during action of damaging factors of the various nature on cells were described for the first time. The cleavage of bovine fibrinogen by proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* hospital strain was inhibited by SK additions on 20-100%.

Set of the results creates real preconditions of expansion of medical application sphere of SK preparations, first of all, for stimulation of tissues' regeneration and, rather probably, at a neurological pathology.

ВЛИЯНИЕ ЛИКОПИНА НА ПЛОИДНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ И ОЦЕНКА ЕГО ТОКСИЧНОСТИ

¹Николаевич Л.Н., ²Савицкий В.П., ¹Морозова Е.В., ¹Насек В.М., ¹Жукова И.А.,
¹Жебракова И.В., ¹Нехай А.С.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by;

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, 223040, п. Лесной-2, Минский район, Минская обл.

Ликопин, один из многочисленных каротиноидов, характеризующихся антиоксидантной активностью, свою мощную антиоксидантную функцию сочетает с достаточно широким спектром биологического действия, не связанного с антиокислительной активностью. Конкретные биохимические проявления действия ликопина разнообразны и направлены на различные структурные, метаболические и регуляторные системы организма.

Цель работы: изучение влияния ликопина на ploидность, распределение клеток по стадиям клеточного цикла, апоптоз и частоту клеток с микроядрами в крови, а также оценка его токсичности.

Методы исследования. Были сформированы группы мышей и крыс обоего пола, которым вводили субстанцию ликопина. Использовали субстанцию ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG (DSM Nutritional Products, Швейцария), которую растворяли в 0,9% растворе NaCl. Субстанцию ликопина вводили интрагастрально в дозах 1000 мг/кг, 3000 мг/кг, 4000 мг/кг и 5000мг/кг.

При проведении токсикологических экспериментов руководствовались требованиями и методическими рекомендациями, изложенными в руководящих нормативных документах [1]. Изучение острой токсичности субстанции ликопина выполнено на мышах линии ICR и крысах линии Wistar обоего пола. Спустя 14 дней у животных, которым однократно вводили

субстанцию ликопина в дозах 1000 мг/кг (100 мг/кг чистого ликопина), 5000 мг/кг (500 мг/кг чистого ликопина) проводили забор крови для анализа ploидности клеток методом проточной цитометрии.

Метод приготовления ДНК проб из крови млекопитающих для проточной цитофлуориметрии соответствовал общепринятым [2]. Приготовленные образцы крови анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Vantage» («Becton Dickinson», США), оборудованном модулем дискриминации дублетов в программе CellFit. Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер (длина волны 488 нм, 15 мВт). Измерения проводили при скорости до 2000 клеток в 1 с. В одной пробе анализировали не менее 30 000 клеточных ядер. Для оценки ploидности и распределения клеток крови по фазам клеточного цикла проводился анализ относительного содержания ДНК в клетках по интенсивности флуоресценции пропидиума иодида. Клетки дифференцировали по содержанию ДНК на диплоидные (2n2c), тетраплоидные (2n4c) и гиподиплоидные (апоптотические) (менее 2n2c) [3]. По стандартным методикам определяли распределение клеток по фазам клеточного цикла (оценка пролиферативной активности клеток), частоту микроядер (оценка мутагенного эффекта), уровень генетического апоптоза (оценка репродуктивной гибели клеток) [4]. Пролиферативную активность клеток в популяциях оценивали по сумме клеток в стадиях S+(G₂+M).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета Statistica 7.0. Для определения достоверности изменений изучаемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования. В условиях острого эксперимента на мышах и крысах обоего пола показано, что субстанция ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG, введенная интрагастрально в диапазоне доз 1000–5000 мг/кг, является малотоксичной. Максимально возможная для введения доза 5000 мг/кг (в 2500 раз превышающая эффективную дозу для грызунов) не вызывала гибели животных и развития эрозийно-язвенных изменений в желудочно-кишечном тракте. Отдаленных побочных и токсических эффектов у мышей и крыс обоего пола после однократного введения субстанции ликопина не выявлено.

Кроме того, изучены показатели распределения клеток по фазам клеточного цикла: G₀/G₁, S и G₂+M, частота апоптотических клеток и клеток с микроядрами в крови крыс, которым вводили субстанцию ликопина в дозах 1000 мг/кг (100 мг/кг чистого ликопина), 5000 мг/кг (500 мг/кг чистого ликопина).

Показано, что по мере увеличения дозы ликопина частота апоптотических клеток и клеток с микроядрами не превышает контрольный уровень. При введении животным субстанции ликопина в дозе 5000 мг/кг наблюдаются низкий уровень пролиферации клеток крови по сравнению с контролем. Частота клеток с микроядрами не превышает контрольный уровень, наблюдается тенденция увеличения количества апоптотических клеток в крови животных.

Заключение. Полученные данные позволяют заключить, что субстанция ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG относится к VI классу опасности по классификации токсичности веществ в соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (ОЭСД) и является относительно безвредной при однократном внутрижелудочном введении в рекомендуемых дозах. Спустя 14 дней после введения крысам субстанции ликопина в дозах 1000 мг/кг и 5000 мг/кг не наблюдается цитотоксического и мутагенного эффектов в популяции клеток крови.

Литература:

1. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ; под ред. Р.У. Хабриева. - 2-е изд.- М.: Медицина, 2005.- 832с.
2. Flow cytometry: a practical approach / M.G. Ormerod. – N.Y.: Oxford University Press, 1994. – 282 p.
3. Шмаров, Д.А. Проточно-цитометрический анализ пролиферации гемопоэтических клеток. Методологические вопросы / Д.А. Шмаров, Д.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 8. – С. 16–18.
4. Practical Flow Cytometry / H.M. Shapiro. – N.Y., 1995. – 155 p.

EFFECT OF LYCOPENE ON BLOOD CELL PLOIDY AND ESTIMATION OF TOXICITY

¹Nikolaevich L.N., ²Savitskij V.P., ¹Morozova E.V., ¹Nasek V.M., ¹Zhukova I.A.,
¹Zhebrakova I.V., ¹Nekhai A.S.

¹*State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Republican Science-Practical Centre for Children oncology and Hematology*

The researches carried out on ICR mice of both sexes and Wistar rats allow to conclude that the investigated substance redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG belongs to the VI class of danger due to the classification of toxicity of substances according to the modified OECD classification and is relatively harmless under single intragastric administration at recommended doses. Rat substance of lycopene administration at doses of 1000 mg/kg and 5000 mg/kg does not cause cytotoxic and mutagenic effects in animal blood cell (leukocytes) population.

РЕАКЦИЯ ИММУННЫХ КЛЕТОК КРЫС НА ЭМОЦИОНАЛЬНО-ФИЗИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Огурцова С.Э., Анисович М. В., Малей Л.П., Малашевич Я.В., Беляева А.В.,
Власенко А.К., Афонин В.Ю.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: viktorafonin@ya.ru

Актуальность проблемы. Уровень иммунокомпетентных клеток в крови человека является одним из основных показателей состояния иммунной системы. В зависимости от уровня и объема физической нагрузки, происходят морфологические и биохимические изменения со стороны Т- и В-лимфоцитов [1, 2]. Интенсивные нагрузки вызывают снижение уровня отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+) [3]. При адекватных нагрузках происходит увеличение пула Т-лимфоцитов в крови, сопровождающееся нарушением структуры лимфоидных органов. Интенсивные нагрузки приводят к истощению лимфоидных органов и падению уровня Т-лимфоцитов и их активности. В современных исследованиях существуют разноречивые данные о причинах и механизмах развития спортивного иммунодефицита. По некоторым данным иммуносупрессия развивается вследствие апоптоза иммунокомпетентных клеток. Показано увеличение числа апоптотических клеток лимфоцитов на 63% по сравнению с контролем сразу после окончания интенсивной тренировки и на 86,2% в течение 24 часов после окончания тренировки [4, 5].

Цель. Изучить иммунорегуляторный индекс животных при физической нагрузке.

Материалы и методы. Работа выполнена на 20 самцах крыс линии Wistar в возрасте 3-х месяцев и средней массой 300 г. Животных содержали при 12-ти часовом световом режиме, на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде (экспериментально-биологическая клиника ИФБ НАН Беларуси). Перед кормлением животных выдерживали в карантинных условиях в течение двух недель. Проводили два эксперимента с интервалом 1 месяц. Все крысы были разделены на 2 группы: 1-ая группа (5 животных) подвергалась одновременной комплексной эмоционально-физической нагрузке до полного истощения сил путем принудительного плавания в воде с грузом в 13% от массы тела, 2-ая (5 животных) – не получала физическую нагрузку. Через 24 часа из хвостовой вены забирали кровь для анализа

Использовали проточный цитофлуориметр Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Выделение «гейтов» клеток для анализа осуществляли по параметрам прямого и углового светорассеяния (FSC vs SSC), в смешанных линейно-логарифмических режимах (SSC vs FL1, FL2, FL3) или только с применением параметров флуоресценции с логарифмическим усилением сигнала (log/log). В каждом образце проводили сбор не менее 20 000 событий.

Для определения популяционного состава лимфоцитов использовали CDC-панель: CD4 FITC /CD8-PE.

Для исследования иммунофенотипа лимфоцитов периферической крыс линии Wistar применяли коммерческие моноклональные антитела («Beckman Coulter», США), конъюгированные FITC, PE. Исследования проводились с одноцветными метками.

Результаты. Иммунорегуляторный индекс представляет собой соотношение T-супрессоров и T-хелперов. Это очень важная информация, поскольку его снижение означает иммунодефицитное состояние. В первом опыте у контрольной группы животных значение индекса составило $3,04 \pm 0,35$, у животных с плаванием $2,05 \pm 0,12$. Падение индекса было вызвано достоверно большим увеличением ($P < 0,02$) процента T-супрессоры/цитотоксические ($CD3^+CD8^+$) с 17,10% до 23,20%. Было отмечено уменьшение процента T-хелперы-индукторы ($CD3^+CD4^+$), однако, оно было не достоверным.

В втором опыте в группе животных с физической нагрузкой значение индекса составило $2,33 \pm 0,18$, у животных без плавания $3,77 \pm 0,31$. Падение индекса было вызвано достоверно большим увеличением ($P < 0,03$) клеток $CD3^+CD8^+$ с 13,88% до 17,80%, а также уменьшением ($P < 0,01$) клеток $CD3^+CD4^+$.

Выводы. В результате можно сделать вывод, что плавание с грузом приводит к уменьшению иммунорегуляторного индекса. Данная модель может быть использована для разработки функциональных продуктов питания и БАДов для профилактики иммунодефицитных состояний, а также иммуномодулирующих лекарственных средств.

Литература:

1. Значение сдвигов состава периферической крови в определении состояния тренированности спортсмена / Кокая, О.Ф. // Автореф... канд. мед. наук - Тбил. гос. мед. ин-т. - Тб. : Изд-во АН ГССР, 1963. - 20с.
2. О реакции лимфоидной системы на однократную физическую нагрузку умеренной мощности до утомления / Невзоров В.И., Язвикова К.А. // Молекулярные и субмолекулярные механизмы адаптации к спортивной деятельности. - М.: ВНИИФК, 1979. - С.163-167.
3. Показатели T-системы иммунитета у спортсменов при интенсивных тренировках / Афанасьева И.А. // Ученые записки университета имени П.Ф. Лесгафта, вып. 1, 2007, с. 19-22.
4. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? / Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A // Biochem Biophys Res Commun, 249, 1998, p. 366-370.

5. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects / Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, Tsai K // *Med Sci Sports Exerc*, 34, 2002, p. 438-442.

REACTION OF RAT IMMUNE CELLS TO EMOTIONAL - PHYSICAL STRESS

Ogurtsova S.E., Anisovich M.V., Maley L.P., Malashevich Y.V., Belyaeva A.V., Vlasenko A.K., Afonin V.YU.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: viktorafonin@ya.ru

Decrease of immunoregulatory index was observed in rats under compulsory swimming with weight. The decrease can be basically connected with growth of CD3⁺CD8⁺ cells.

РОЛЬ ГЕНА *NMO1* В ИНДУКЦИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ

Огурцова С.Э., Афонин В.Ю., Малей Л.П., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: fatinja_2008@mail.ru

Введение. Ген *NMO1* играет важную роль в химически индуцированном канцерогенезе. Он кодирует фермент NAD(P)H: хиноноксидоредуктазу, участвующую в метаболизме хинонов. Хиноны являются важным классом химиотерапевтических агентов. Метаболическая активация хинонов находится под генетическим контролем различных генов. Один из генов - *NMO1*, кодирует фермент NAD(P)H: хиноноксидоредуктазу, которая по мнению многих авторов ответственна за восстановительную биоактивацию ряда хинонов [1]. Экспрессия гена *NMO1* наблюдается в ответ на введение индукторов. Индукция гена *NMO1* может модифицировать мутагенный эффект хиноновых противоопухолевых промутагенов вследствие изменения баланса редуказ в сторону увеличения активности NAD(P)H: хиноноксидоредуктазы, что приведет к различному соотношению мутагенных метаболитов с разным механизмом действия.

Цель работы – изучение выхода цитогенетических повреждений в костном мозге мышей в условиях индукции NAD(P)H: хиноноксидоредуктазы, увеличение активности которой находится под контролем гена *NMO1*.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на самцах мышей линии C57BL/6J с массой тела 20-25 г. В качестве индуктора гена *NMO1* использовали β-нафтофлаван, который относится к полициклическим углеводородам и повышает активность 2-х ферментов первой

(*CYP1A1*, *CYP1A2*) и 4-х ферментов второй фазы (*UGT1A6*, *GSTA1*, *NMO1*, *ALDH3A1*) биотрансформации ксенобиотиков. β -нафтофлавоны растворяли в кукурузном масле и вводили перорально в дозе 40 мг/кг в течение 3-х дней ежедневно, так как в эти сроки достигается максимальный уровень ферментов метаболизма ксенобиотиков. Митомицин С вводили внутривенно в дозе 3,5 мг/кг через сутки после последнего введения индуктора. Контрольным мышам вводили вместо индукторов кукурузное масло, а вместо промутагенов изотонический раствор.

Для изучения экспрессии генов *NMO1* тотальную РНК выделяли из замороженных, измельченных в жидком азоте образцов печени с помощью реагента «RNeasy Mini kit» («QIAGEN», Германия) согласно прилагаемому протоколу. Реакцию обратной транскрипции (синтез кДНК из полученной РНК) проводили с использованием набора реагентов QuantiTect Reverse Transcription Kit («QIAGEN»). Количественную ПЦР в режиме реального времени осуществляли в присутствии красителя SYBR Green на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену «домашнего хозяйства» *β -Actin*. Праймеры для гена *NMO1* и *β -Actin* выбирали с использованием программы «Primer3 Input 0.4.0» и заказывали у фирмы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0.

Исследование цитогенетического эффекта промутагенов проводили в костном мозге. Цитогенетические препараты клеток костного мозга готовили по общепринятой методике [2]. В качестве теста на мутагенность использовали учет aberrаций хромосом на стадии метафазы. О цитогенетическом эффекте промутагенов судили по проценту aberrантных клеток, среднему числу aberrаций на aberrантную клетку и исследованную клетку. Для анализа полученных данных применялись статистические программы Microsoft Excel (средняя арифметическая, ошибка средней арифметической, *t*-критерий Стьюдента).

Результаты и обсуждение. Из полученных результатов видно, что введение митомицина С привело к статистически достоверному ($P < 0,001$) увеличению процента aberrантных клеток через 18 часов по сравнению с вариантом «контроль». Уже через 18 часов после введения промутагена процент aberrантных клеток, значительно выше ($20,60 \pm 1,81\%$), чем у мышей, которым вводили изотонический раствор ($0,33 \pm 0,33\%$). Предварительное введение β -нафтофлавона повлияло на степень повреждения генетического материала клеток костного мозга. Рост частоты aberrантных клеток в вариантах с β -нафтофлавоном сопровождался увеличением нагруженности клеток aberrациями. Предварительная индукция ферментов β -нафтофлавоном приводит возрастанию доли клеток с двумя, тремя и большим числом aberrаций. Увеличение процента aberrантных клеток с множественными aberrациями в общем числе изученных клеток сказалось на увеличении среднего числа aberrаций как на исследованную, так и aberrантную клетку. Так, через 18 часов, процент клеток с одной aberrацией уменьшился с 67,96% до 56,82% и соответственно увеличился процент aberrантных клеток несущих 3-10 aberrаций. Как следствие выросло и среднее число aberrаций на исследованную клетку с 0,4 до 0,6 и среднее число aberrаций на aberrантную клетку с 1,95 до 2,27. Среднее число aberrаций на исследованную клетку возросло как за счет увеличения числа aberrантных клеток, так и за счет их нагруженности aberrациями. Таким образом, на основании анализа уровня aberrантных клеток и нагруженности клеток aberrациями хромосом можно заключить, что предварительное введение индуктора β -нафтофлавона привело к увеличению цитогенетического эффекта митомицина С.

Митомицин С, как и большинство хинонов, проявляет свое мутагенное действие после одно ($1e^-$)- или двухэлектронной ($2e^-$) редукции при участии различных редуктаз, результатом чего является образование, соответственно, семихинонов или гидрохинонов [3]. Эти метаболиты обладают разной способностью к конъюгации с глутатионом, что влияет на скорость выведения их из организма, к структурной перестройке с образованием моно- и

биалкилирующих соединений, а также к аутоокислению и вступлению в цикл восстановления-окисления, в процессе которого генерируются реактивные радикалы кислорода, вызывающие фрагментацию хромосом. Поэтому мутагенный эффект хинонов и спектр мутаций могут зависеть от тонкого баланса редуктаз. Единственной $2e^-$ редуктазой, о роли которой в метаболической активации хинонов существуют две взаимоисключающие точки зрения, является НАД(Р)Н:хиноноксидоредуктаза, кодируемая геном *NMO1*. Согласно одной из точек зрения - образующиеся в результате $2e^-$ редукции гидрохиноны легко конъюгируют с глутатионом и выводятся из организма, не причиняя ему никакого вреда [4]. Согласно другой – гидрохиноны вступают в цикл восстановления-окисления, а также легко перестраиваются с образованием алкилирующих метаболитов [5].

Увеличение мутагенности митомицина С на фоне предварительного введения β -нафтофлавоном дает основание предположить, что при индукции экспрессии генов меняется баланс редуктаз в сторону увеличения активности НАД(Р)Н:хиноноксидоредуктазы, которая способствует в результате $2e^-$ редукции образованию гидрохинонов, и, следовательно, к изменению профиля метаболитов в сторону увеличения его мутагенности или к худшей способности к конъюгации с глутатионом и выведению из организма. Это предположение основано на том, что индуцированные β -нафтофлавоном ферменты *CYP1A1* и *CYP1A2* участвуют в реакциях монооксигеназного типа, поэтому не могут иметь отношения к восстановительной биоактивации хинонов, также как и фермент альдегиддегидрогеназа (*ALDH3A1*), которая принимает участие в окислении альдегидов. Маловероятно, что фермент УДГ-трансфераза (*UGT1A6*) участвует в метаболизме митомицина С, т.к. согласно литературным данным, метаболиты митомицин С конъюгируют с глутатионом. Следовательно, только два фермента – *NMO1* и *GSTA1*, индуцируемые β -нафтофлавоном, могут иметь отношение к метаболизму митомицина С. Однако быстрая конъюгация гидрохинона митомицина С с глутатионом привела бы к уменьшению кластогенного эффекта митомицин С на фоне индукции экспрессии генов, а не к наблюдавшемуся увеличению.

Для того, чтобы получить подтверждение нашему предположению, что увеличение выхода цитогенетических повреждений, вызванных митомицином С у индуцированных мышей является следствием индукции экспрессии гена *NMO1* мы оценили базальный и индуцированный β -нафтофлавоном уровень экспрессии этого гена в клетках печени мышей. В нашем исследовании β -нафтофлавоном при выбранной дозе 40 мг/кг массы тела оказал значительное стимулирующее воздействие на экспрессию гена *NMO1*, увеличив уровень его экспрессии. Были обнаружены статистически достоверные различия между активностью гена *NMO1* у животных, получавших β -нафтофлавоном в течение 3-х дней и контрольными животными. В печени индуцированных мышей активность *NMO1* увеличилась в 2,7 раза ($P < 0,01$).

Таким образом, предварительная индукция ферментов β -нафтофлавоном приводит к увеличению выхода цитогенетических повреждений, вызванных митомицином С. Анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что это является следствием индукции *NMO1*, которая способна конкурировать с другими редуктазами за митомицин С как субстрат, а образующийся гидрохинон митомицина С способен к структурной перестройке с образованием алкилирующих метаболитов.

Литература:

1. Ross D., Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics // Methods Enzymol. – 2004. – Vol.382. – P. 115-144.
2. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S. Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. // Mutat. Res. –1987. – Vol.189, №2. – P.157-165.

3. Siegel D., Gustafson D.L., Dehn D.L., Han J.V. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. Role as a superoxide scavenger. //Mol. Pharm. – 2004. – Vol.65, №5. – P.25-37.
4. Beall H.D., Winski S.I. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents. I: NQO1-directed drug development // Front Biosci. – 2000. – Vol.5. – P. D639- 648.
5. Joseph P., Long D.J., Klein-Szanto A.P. Role NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) in protection on against quinone toxicity. // Biochem. Pharm. –2000. – Vol.60, №2. – P.207-214.

ROLE OF GENE *NMO1* IN INDUCTION CYTOGENIC OF DAMAGES IN BONE MARROW CELLS OF MICE BY POLYCYCLIC HYDROCARBONS

Ogurtsova S.E., Afonin V.Yu., Maley L.P., Malashevich Y.V., Pogrebnyakov I.A.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The preliminary induction of enzymes by b-naphthoflavone leads to increase in an output of cytogenic the damages caused by mitomycin C. Research of own and literary data allows to assume, that it is consequence of induction NMO1 which is capable to compete to others reductases for mitomycin C with as a substrate, and formed hydroquinone of mitomycin C with is capable to structural reorganization with formation alkylating metabolite.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ХИНОНОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРОМУТАГЕНОВ ПРИ ИНДУКЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

Огурцова С.Э., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: fatinja_2008@mail.ru

Введение. В настоящее время с обострением экологической ситуации особую актуальность приобретает изучение влияния на организм животных и человека вредных химических факторов. Энзиматические реакции, вовлеченные в процессы метаболической активации ксенобиотиков, поддаются изменению под действием различных химических соединений - индукторов и способны изменять активность ферментов, вовлеченных в эти процессы [1].

С тех пор, как был описан феномен индукции ферментов метаболизма ксенобиотиков, в список индукторов включены уже сотни химических соединений. Однако исследование спектра соединений, которые могут индуцировать различные формы ферментов метаболизма ксенобиотиков, по-прежнему актуально. Исследования последних лет показывают, что эффективными индукторами могут быть не только ПАУ и диоксины с планарной структурой, но и соединения иных химических классов (каратиноиды, индолы и др.).

В настоящее время особый интерес вызывают индукторы, относящиеся к антиоксидантам, представляющие собой соединения различных классов и объединенные на основе общей способности ингибировать свободнорадикальные процессы. Отличительными особенностями действия антиоксидантов на систему биотрансформации ксенобиотиков

является высокая специфичность индукции ферментов 2-ой фазы и слабо выраженное влияние на цитохром P-450 [2]. Большой интерес вызывают каратиноиды, в частности астаксантин и ликопин, которые являются природными эффективными антиоксидантами. До сих пор не выяснены механизмы действия каратиноидов, благодаря которым они ингибируют канцерогенез, эффективны в отношении рака молочной железы, легких, эндометрия и простаты. Как показал обзор литературы, большинство работ посвящено изучению лишь одного из механизмов действия каратиноидов – антиоксидантного [3]. В литературе очень мало работ, посвященных каратиноидам, как индукторам ферментов детоксикации второй фазы биотрансформации ксенобиотиков.

В связи с этим целью настоящей работы было сравнительное изучение в клетках печени экспрессии генов *NMO1* и *GSTA1* в норме, и после действия индукторов, относящимся к антиоксидантам.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на самцах мышей линии C57BL/6J с массой тела 20-25 г. В качестве индукторов ферментов детоксикации ксенобиотиков использовали астаксантин и ликопин. Астаксантин растворяли в изотоническом растворе, а ликопин – в кукурузном масле и вводили перорально в течение 5-ти дней ежедневно, так как в эти сроки достигается максимальный уровень ферментов метаболизма ксенобиотиков второй фазы. Объем раствора индукторов - 0,2 мл на 20 г веса. Исследуемая доза астаксантина - 25 мг/кг, ликопина – 50 мг/кг.

Для изучения экспрессии генов *NMO1* и *GSTA1* тотальную РНК выделяли из замороженных, измельченных в жидком азоте образцов печени с помощью реагента «RNeasy Mini kit» («QIAGEN», Германия) согласно прилагаемому протоколу. Реакцию обратной транскрипции (синтез кДНК из полученной РНК) проводили с использованием набора реагентов QuantiTect Reverse Transcription Kit («QIAGEN»). Количественную ПЦР в режиме реального времени осуществляли в присутствии красителя SYBR Green на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену «домашнего хозяйства» *β -Actin*. Праймеры для генов *NQO1*, *GST1A* и *β -Actin* выбирали с использованием программы «Primer3 Input 0.4.0» и заказывали у фирмы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение. Гены *NMO1* и *GSTA1* играют важную роль в химически индуцированном канцерогенезе. Есть данные, что при обработке лабораторных животных различными загрязнителями окружающей среды в условиях ингибирования метаболизма *NMO1* и *GST1A* увеличивается риск токсичности и канцерогенеза. Ген *NMO1* кодирует фермент NAD(P)H: хинон оксидоредуктазу, участвующую в метаболизме хинонов. Хиноны - содержатся в выхлопных автомобильных газах, сигаретном дыме, частично в городском воздухе, пищевых продуктах, являются важным классом химиотерапевтических агентов. Показано, что в биотрансформации хинонов принимает участие большое количество ферментов. Большинство из них участвует в одноэлектронной редукции, приводящей к образованию высоко реактивных радикалов. Однако только NAD(P)H: хинон оксидоредуктаза, кодируемая геном *NMO1*, является единственным ферментом, осуществляющим облигатную двухэлектронную редукцию хинонов, в результате чего образуются метаболиты конъюгирующие с глутатионом. Ген *GST1A* кодирует фермент глутатионтрансферазу, который участвует в конъюгирующих реакциях. Это приводит к изменению физико-химических свойств биотрансформирующихся соединений и ограничивает дальнейшие превращения продуктов метаболизма в организме, а также способствует их выведению.

Мы провели сравнительный анализ содержания мРНК методом RT-ПЦР в нормальных и проиндуцированных тканях печени. мРНК обнаружена в достаточно высоком количестве во всех образцах нормальных тканей печени, а также в тканях печени, взятых после 5-ти дневного введения индукторов. Из экспериментальных данных видно, что ген *NMO1* и

GST1A конститутивно и индуцибельно экспрессируется в клетках печени. Известен механизм индукции ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени при воздействии на организм антиоксидантов, который состоит в транскрипционной активации генов с участием лиганд-активированным фактором транскрипции AhR и специфическими XRE (Xenobiotic Response Element) или ARE (Antioxidant Responce Element) элементами ДНК.

Ликопин относится к бифункциональным индукторам. Он является эффективным индуктором ферментов CYP1A1 и CYP1A2. Ликопин индуцирует также и ферменты второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, включая и NAD(P)H: хинон оксидоредуктазу. В нашем эксперименте ликопин увеличил экспрессию гена *NMO1* в 3 раза ($P < 0,01$).

Астаксантин относится к монофункциональным индукторам. Связываясь с Ah рецептором астаксантин опосредует транскрипцию генов, кодирующие ферменты только второй фазы биотрансформации ксенобиотиков. Астаксантин оказал значительное стимулирующее воздействие на экспрессию гена *NMO1*, увеличив уровень экспрессии гена *NMO1* более чем в 20 раз ($P < 0,001$).

В нашем исследовании астаксантин при выбранной дозе 25 мг/кг массы тела не изменил экспрессию гена *GSTA1*. Статистически достоверные различия между активностью гена *GSTA1* у животных, получавших астаксантин в течение 5-ти дней, и контрольными животными не были обнаружены. В печени мышей активность *GST1A* увеличилась только на 30% по сравнению с контрольными животными. Однако эти различия статистически не достоверны. При введении другого индуктора – ликопина, было обнаружено, что это соединение также не повлияло на экспрессию гена *GST1A*. Так в клетках печени мышей, получавших ликопин, уровень экспрессии гена *GST1A* не превышал контрольных значений.

Таким образом, в нашем эксперименте установлено, что химические соединения из класса каротиноидов, структуры которых отличаются от полициклической ароматической структуры классических индукторов ферментов первой и второй фазы биотрансформации ксенобиотиков вызывают индукцию экспрессии генов, продукты которых участвуют в детоксикации хинонов. Астаксантин и ликопин обладают сильными индуцирующими свойствами в отношении экспрессии гена *NMO1* и проявляют менее выраженную способность индуцировать экспрессию гена *GST1A*.

Литература:

1. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович. — Новосибирск, 2000. — 84 с.
2. Aruoma O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive component in plant foods // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol.523-524. – P.99-109.
3. Stahl W. Non-antioxidant properties of carotenoids / Stahl W., Ale-agma N., Polidori M.C. // *Biological chemistry.* 2002. Vol.383, Issue 3-4. P.553-558.
4. Ross D. Quinone reductases multitasking in the metabolic world // *Drug Metab. Rev.* – 2004. – Vol.36, №3-4 – P. 639-654.

CHANGE EXPRESSION OF THE GENES PARTICIPATING IN METABOLISM ANTITUMOR QUINONE PROMUTAGENS AT THE INDUCTION BY VARIOUS ANTIOXIDANTS

Ogurtsova S.E., Malashevich J.V., Pogrebnjakov I.A.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Expression of genes that participate in the process of quinone detoxication can be induced by the chemical compounds from a class of carotenoids with structures that are different from

polycyclic aromatic structure of classical inducers of enzymes of the first and second phases of biotransformation of xenobiotics. Astaxantin and lycopene are characterized by the strong inducing properties in relation to the expression of *NMO1* gene, but show less visible ability to induce the expression of *GST1* gene.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПАНТЕНОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

¹Онуфриев М.В., ¹Степаничев М.Ю., ¹Лазарева Н.А., ²Катковская И.Н.,
¹Тишкина А.О., ²Мойсеенок А.Г., ¹Гуляева Н.В.

¹ Учреждение Российской академии наук Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, 117485 Москва,
ул. Бутлерова, д. 5А, E-mail: m_step@pochta.ru;

² Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230017, Гродно,
бульвар Ленинского комсомола, д. 50

Пантотеновая кислота, витамин В₅, представляет собой водорастворимый витамин, необходимый для существования живых организмов. Пантотеновая кислота используется для синтеза кофермента А (CoA), участвующего в метаболизме и синтезе углеводов, белков и липидов. Наиболее распространенные формы, в которых встречается пантотеновая кислота, – ее спиртовой аналог, провитамин пантенол (пантотенол) и пантотенат кальция. Пантотеновая кислота не синтезируется в тканях животных, однако продуцируется бактериями кишечника и в значительных количествах содержится в пище [1].

Продемонстрирована защита пантотеновой кислотой и пантенолом в экспериментальных ситуациях, сопровождающихся окислительным стрессом, в частности при ишемических повреждениях печени и сердца. Так, в модели экспериментальной ишемии-реперфузии на изолированном сердце был продемонстрирован кардиопротекторный эффект пантотеновой кислоты [2], а декспантенол ослаблял интенсивность перекисного окисления и повреждение семенников при экспериментальном ишемическом и реперфузионном действии [3]. До сих пор остаются не исследованными эффекты пантотеновой кислоты и ее производных при ишемии мозга/инсульте, а ведь потребность в нетоксичных нейропротекторах остается чрезвычайно высокой. В настоящей работе проведено исследование эффектов пантенола на модели фокальной ишемии мозга у крысы.

Исследование нейропротекторных свойств D-пантенола проводили на модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс. D-пантенол вводили внутривенно в дозе 200 мг/кг за 24 ч, 0.5 ч до и 0.5 ч, 24 ч, 48 ч после ОСМА. Для оценки неврологического дефицита использовали 20-балльную шкалу, включавшую выполнение животными следующих тестов: помещение лапы, установочный рефлекс, перекладина, наклонная платформа, вращение, визуальное вытягивание передней лапы, подвижность, общее состояние. Сумма баллов 20 отражала нормальную функцию, а снижение суммы баллов указывало на нарушенный неврологический статус. Второй метод оценки неврологического дефицита был основан на тесте вытягивания языка (ВЯ), которое оценивали по способности крысы вылизывать арахисовое масло из стеклянного цилиндра. Тесты проводили, начиная с первого дня после ОСМА. Для оценки общего физиологического состояния животных их ежедневно взвешивали.

Через 5 дней после ОСМА животных декапитировали, быстро выделяли мозг, коронарные срезы толщиной 2.0 мм окрашивали в растворе 2,3,5-трифенилтетразолия

хлорида (Sigma, USA) и фиксировали в 4%-ном растворе пара-формальдегида. На фотографиях срезов измеряли область инфаркта и рассчитывали объем инфаркта.

Данные обрабатывали статистически с использованием дисперсионного анализа и t-теста Стьюдента. Данные показателей в группах представлены в виде $M \pm SEM$ (если не указано иначе).

После ОСМА у крыс наблюдали значительный неврологический дефицит в течение всего периода наблюдения (5 дней) в сравнении с группой ложнооперированных животных. Введение пантенола снижало неврологический дефицит, что выражалось в увеличении суммы баллов через 1-5 дней после ОСМА. Тем не менее, поведение животных, которым вводили пантенол, после ОСМА оставалось нарушенным в сравнении с ложнооперированной группой. Перед ОСМА животные всех групп продемонстрировали сходную способность к вылизыванию арахисового масла из цилиндра в тесте ВЯ. Ложная операция влияла на ВЯ, снижая способность крыс вылизывать масло через 1 день после операции, однако животные быстро восстановили дооперационный уровень выполнения теста ВЯ. Крысы, получившие растворитель, были неспособны выполнять ВЯ в первые дни после ОСМА. Некоторое восстановление ВЯ было отмечено только через 5 дней после ОСМА. У животных, получавших пантенол, величина ВЯ после ОСМА также существенно снижалась, тем не менее, оставаясь в послеоперационном периоде значительно выше таковой у крыс, получавших растворитель. В группе крыс с ОСМА, обработанных пантенолом, отмечена менее выраженная потеря массы тела в сравнении группой ОСМА, не получавшей пантенол.

Объем правого полушария не различался в группах ОСМА и ОСМА + пантенол ($435.9 \pm 11.2 \text{ мм}^3$ and $435.3 \pm 8.5 \text{ мм}^3$, соответственно). Объем инфаркта в левом полушарии через 5 дней после ишемии в группе ОСМА составлял от 151 до 325 мм^3 , в среднем $244.6 \pm 19.3 \text{ мм}^3$. В группе ОСМА + пантенол объем инфаркта варьировал от 85 до 250 мм^3 , в среднем $170.4 \pm 19.8 \text{ мм}^3$. Пантенол достоверно уменьшал повреждение коры, вызванное 30-минутной ОСМА ($p < 0.02$).

Таким образом, мы продемонстрировали положительное действие пантенола на модели инсульта у крыс. Пантенол уменьшал не только объем инфаркта, но и неврологический дефицит у животных. Учитывая безопасность пантотеновой кислоты и ее производных, этот первый результат может служить основой для дальнейших, более конкретных и глубоких исследований производных пантотената в качестве перспективных нейропротекторов.

Пантотеновая кислота и ее восстановленное производное пантенол рассматриваются как важные факторы предупреждения окислительного стресса в клетках и тканях человека и животных, хотя ни пантотеновая кислота, ни ее производные не обладают свойствами перехватчиков свободных радикалов. Это стало основанием для заключения о том, что защитный эффект против разных повреждающих эффектов активных форм кислорода осуществляется за счет CoA, продукта метаболизма пантотеновой кислоты, а не самой пантотеновой кислотой. Повышение уровня CoA в клетке может ускорять различные метаболические процессы, в которые непосредственно или опосредованно вовлечен этот кофермент. В числе этих процессов может быть биосинтез глутатиона, одной из важнейших систем защиты клетки от окислительного стресса. Конкретный механизм, благодаря которому повышение уровня CoA увеличивает уровень глутатиона, а возможно и степень его восстановления, а также, происходит ли это путем повышенного биосинтеза или сниженных деградации или оттока глутатиона из клетки, остается неизвестным.

На основании полученных данных можно сделать практическое заключение о том, что пантенол обладает хорошим потенциалом для применения в медицинской практике, в первую очередь в комплексном лечении ишемической патологии мозга.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ-БРФФИ № 08-04-90013.

Литература:

1. Tahiliani A.G., Beinlich C.J. Pantothenic acid in health and disease // Vitam. Horm. 1991. V. 46. P. 165-228.
2. Кумерова А.О., Утно Л.Я., Липсберга З.Е., Шкестере И.Я. Исследование производных пантотеновой кислоты как кардиопротекторов в модели экспериментальной ишемии и реперфузии изолированного сердца // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1992. Т. 113. С. 373-573.
3. Etensel B., Ozkisacik S., Ozkara E., Karul A., Oztan O., Yazici M., Gürsoy H. The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion// Pediatr. Surg. Int. 2007. A. V . 23. P. 177-181.

NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF PANTHENOL IN EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA

¹Onufriev M.V. , ¹Stepanichev M.Yu., ¹Lazareva N.A., ²Katkovskaya I.N., ¹Tishkina A.O.,
²Moiseenok A.G., ¹Gulyaeva N.V.

We studied neuroprotective properties of D-panthenol in an experimental model of cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Administration of D-panthenol at a dose of 200 mg/kg intraperitoneally 24 h, 0.5 h prior to and 0.5 h, 24 h, and 48 h after MCAO substantially decreased neurological deficit at 1-5 days after MCAO, prevented loss of body weight, and ameliorated damage to the cerebral cortex induced by 30-min MCAO. Our data show for the first time neuroprotective properties of D-panthenol in vivo. We suppose that D-panthenol may be used for treatment of neurological disorders.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ГЛУТАМИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ПЕЧЕНИ, ВЫЗВАННЫЕ ЭТАНОЛОМ

¹Пронько П.С., ¹Хомич Т.И. ¹Сатановская В.И., ¹Гайшманова А.В., ¹Кондыба Н.И.,
¹Шляхтун А.Г., ²Лис Р.Е., ²Поплавская Е.А.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал,
230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by;

²Гродненский государственный медицинский университет, 230015, г. Гродно,
ул. Горького, 80

Актуальным является поиск малотоксичных средств метаболического действия, снижающих токсичность этанола и устраняющие метаболические и морфологические изменения в организме, вызванные хронической алкогольной интоксикацией. Известно, что глутамин ускоряет элиминацию этанола и снижает его гепатотоксичность [1]. Глутамин является предшественником глутатиона и может превращаться в субстрат ЦТК сукцинат, с чем также могут быть связаны его антиоксидантные свойства при алкогольной интоксикации. В экспериментах на животных выявлена способность N-ацетилцистеина устранять проявления этанол-индуцированного окислительного стресса, нормализовать активность систем антиоксидантной защиты в печени и мозге при алкогольной интоксикации [2, 3]. Нами было показано, что совместное назначение глутамина и N-ацетилцистеина крысам при моделировании алкогольного абстинентного синдрома способствовало снижению

выраженности поведенческих признаков синдрома отмены этанола [4]. Одновременно отмечено снижение перекисидации липидов и повышение уровня восстановленного глутатиона в печени и мозге.

Целью работы было изучение влияния двухнедельного внутрижелудочного введения крысам N-ацетилцистеина в дозе 100 мг/кг в сочетании с глутамином 340 мг/кг на метаболические изменения в крови и печени и морфологические нарушения в печени, вызванные хронической алкогольной интоксикацией.

Материалы и методы. Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали с помощью содержания крыс на жидкой алкогольной диете по Либеру и ДеКарли [5] в нашей модификации. Этанол в диете давал 36% калорий. В контрольной диете этанол был изокалорийно замещен сахарозой. В течение первых трех дней экспериментальные животные потребляли алкогольную диету с содержанием этанола 25,5 г/кг диеты (этанол 95% – 33,65 мл) и сахарозы 44 г. С четвертого дня и до конца эксперимента животные получали алкогольную диету с содержанием этанола 51 г/кг диеты (этанол 95% – 67,3 мл).

В опыте использованы крысы самцы линии Вистар начальной массой 180-250 г. Одна из контрольных групп получала стандартный рацион вивария (n=15); во второй контрольной группе животные получали жидкую безалкогольную диету, в которой этанол был изокалорийно замещен сахарозой (n=30). Опытные животные получали жидкую диету, содержащую этанол (n=45) в течение 6 недель. После этого одна группа крыс, получавших жидкую алкогольную диету (n=15), и группа крыс на контрольной жидкой безалкогольной диете (n=15) были подвергнуты эвтаназии.

Оставшихся после 6-недельной алкогольной интоксикации крыс разделили на 2 группы по 15 животных, одна из которых в течение 2 недель в/ж получала на фоне жидкой безалкогольной диеты N-ацетилцистеин в дозе 100 мг/кг в сочетании с глутамином 340 мг/кг массы тела в/ж, а вторая – плацебо (1,5% раствор крахмала) в эквивалентных объемах. Контрольные группы животных продолжали получать жидкую безалкогольную диету, или рацион вивария и плацебо (1,5% раствор крахмала). Через 2 недели после введения изучаемой композиции или плацебо, через 24 часа после последнего введения препаратов все животные были подвергнуты эвтаназии путем декапитации. После декапитации собирали кровь, печень для биохимических исследований замораживали в жидком азоте, образцы ткани хранились при –86° С до анализа. Отдельно отбирались образцы печени для гистологических и гистохимических исследований. В сыворотке крови определяли активность маркерных ферментов поражения печени: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), концентрации общего билирубина, общих липидов, триглицеридов и холестерина.

Результаты исследования. Изучение влияния двухнедельного внутрижелудочного введения крысам композиции на основе N-ацетилцистеина в дозе 100 мг/кг в сочетании с глутамином 340 мг/кг после потребления жидкой алкогольной диеты в течение 6 недель показало, что данная композиция нормализует активность АСТ и ГГТ сыворотки крови, снижая их активность до уровней, найденных у контрольных животных. Введение N-ацетилцистеина в сочетании с глутамином достоверно снизило концентрации общих липидов, триглицеридов, холестерина и общего билирубина сыворотки крови по сравнению с алкоголизированными животными, которые получали плацебо. Содержание триглицеридов в печени было достоверно повышено после хронической алкогольной интоксикации, вызванной скармливанием жидкой алкогольной диеты в течение 40 дней по сравнению с контрольными группами, которые получали жидкую безалкогольную диету или рацион вивария. После введения N-ацетилцистеина в сочетании с глутамином в течение двух недель уровень триглицеридов был достоверно ниже, чем сразу после хронической алкогольной интоксикации и не отличался от контроля на жидкой безалкогольной диете.

После введения N-ацетилцистеина в сочетании с глутамином в печени повысилась активность ферментов, детоксицирующих спирты и альдегиды: алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы с высокой Км к альдегидам, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения после хронической алкогольной интоксикации.

Активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы печени крыс, получавших в течение 6 недель жидкую алкогольную диету, не отличалась от активности ферментов в контрольной группе, содержащейся на жидкой безалкогольной диете. Двухнедельное введение N-ацетилцистеина в сочетании с глутамином после хронической алкогольной интоксикации привело к снижению активности глутатионпероксидазы печени до уровня, близкого к найденному у получавших плацебо алкоголизированных животных и контроля на жидкой безалкогольной диете после введения плацебо, снижение активности глутатионредуктазы после введения изучаемой композиции было более существенным по сравнению с теми же группами.

У большинства животных, потреблявших жидкую алкогольную диету в течение 6 недель (у 6 из 8 – 75%) наблюдались выраженный центролобулярный микровезикулярный стеатоз гепатоцитов, в некоторых случаях отмечались признаки гепатита и очаговые некрозы. В то же время после двухнедельного внутрижелудочного введения N-ацетилцистеина в дозе 100 мг/кг в сочетании с глутамином в дозе 340 мг/кг у большинства животных (7 из 8 – 87,5 %) отмечена нормальная морфологическая картина печени, архитектура печени не нарушена. В одном случае в перипортальной зоне присутствовали единичные гепатоциты с липидными вакуолями.

Заключение. Таким образом, на модели хронической алкогольной интоксикации продемонстрировано гепатопротекторное действие композиции на основе N-ацетилцистеина и глутамин.

Литература:

1. Cunningham C.C., Preedy V.R., Paice A.G. et al. Ethanol and protein metabolism // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2001. – Vol. 25. – P. 262S-268S.
2. Varma P.S., Aruna k., Rukkumani R., Menor V.P. Alcohol and thermally oxidized pufa induced oxidative stress: role of N-acetyl cysteine // *Ital. J. Biochem.* 2004. – Vol. – 53. – No 1. – P. 10-15.
3. Ronis M.J., Butura A., Sampey B.P., Shankar K. et al. Effect of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. – Vol. 39. – No 5. – P. 619-630.
4. Pronko P.S., Khomich T.I., Satanovskaya, Gaishmanova A.V. et al. Effects of glutamine, N-acetylcysteine, lipoic acid and succinate on alcohol withdrawal signs in rats // *European Neuropsychopharmacology.* – 2008. – Vol. 18. – Suppl. 4. – P. S530-S531.
5. Lieber C.S., DeCarli L. Animal models of chronic ethanol toxicity // *Methods in Enzymology.* – 1994. – Vol. 233. – P. 585-593.

EFFECT OF N-ACETYL CYSTEINE AND GLUTAMINE-BASED COMPOSITION ON METABOLIC AND MORPHOLOGIC LIVER IMPAIRMENTS PROVOKED BY ALCOHOL INTOXICATION

¹Pronko P.S., ¹Khomich T.I., ¹Satanovskaya V.I., ¹Gaishmanova A.V., ¹Kondyba N.I., ¹Shlyakhtun A.G., ²Lis R.Ye., ²Poplavskaya Ye.A.

¹State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus;

²Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230015, Belarus

The two-week intragastric administration to rats of N-acetyl cysteine at a dose of 100 mg/kg in combination with glutamine (340 mg/kg) after chronic alcohol intoxication caused a significant normalization of the blood and liver metabolic alterations and the liver morphologic impairments induced by ethanol, which is indicative of a hepatoprotective effect of this composition.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО ПРОФИЛЯ БИОПТАТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Пытлев С.И.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

Выявление патологий на ранних стадиях и прогноз развития является задачей не только актуальной, но и определяющей в профилактике и лечении таких социально значимых заболеваний как злокачественные новообразования, сахарный диабет, гипертония, инфаркт миокарда, патологии эндокринной и иммунной систем.

Из анализа литературных данных следует, что достоверно установлена причинно-следственная связь определенных аномальных соотношений микроэлементов в организме человека и развития язвенной болезни, ишемической болезни сердца, новообразований различной природы, сахарного диабета, корковой катаракты [1, 2]. Многофакторным математическим анализом результатов микроэлементного скрининга биоптатов населения ряда регионов России показана высокая (до 82%) значимость аномально-нерегулируемых соотношений микроэлементов, входящих в состав ферментов и гормонов, в динамике развития болезней системы кровообращения [3]. Выявлена связь микроэлементного профиля биоптатов с выраженной иммунной недостаточностью и, как следствие, высокой заболеваемостью населения инфекционными и вялотекущими гнойно-воспалительными заболеваниями органов и систем организма (грипп, острая и хроническая пневмония, туберкулез легких и т. д.) [4].

Экспериментально установлено влияние содержания молибдена в организме на физиологию и морфологию щитовидной железы. Показано, что коррекция элементного статуса малыми дозами молибдена стимулирует функцию щитовидной железы, в то время как повышенное содержание молибдена в организме способствует развитию патологических состояний. Методом элементного анализа пуповинной крови новорожденных с использованием атомно-эмиссионной спектроскопии индуктивно связанной плазмы установлено превышение содержания стронция в 2,1 раза, ванадия в 1,7 раза, марганца в 2 раза и пониженный уровень селена в 2,1 раза у новорожденных, родившихся с гипоксией по сравнению со здоровыми детьми.

Сопоставление результатов исследований, проведенных в различных регионах СНГ, позволило сделать вывод о том, что накопление и/или недостаток определенных групп микроэлементов и их соотношений является индикатором снижения иммунной реактивности людей независимо от возраста, пола и национальной принадлежности. Доказана «пусковая» причинная роль определенных аномальных соотношений и концентраций микроэлементов в развитии социально значимых заболеваний. Подчеркивается, что биогеохимическая гетерогенность территорий постоянного проживания населения исключает общий подход при лечении и прогнозировании заболеваний. Предложен ряд диагностических и прогностических тест-систем на основе микроэлементного анализа диагностируемых

биосубстратов человека для оценки уровня реальной нагрузки на организм человека эколого-биогеохимических факторов.

Несмотря на выявленные связи микроэлементных профилей биосубстратов с состоянием здоровья населения, их использование для ранней диагностики и прогноза развития патологических состояний населения Беларуси невозможно из-за отсутствия методик, учитывающих реальную эко-биогеохимическую характеристику территории проживания населения. Сложная зависимость патологических состояний и микроэлементного профиля диагностируемых биосубстратов требует использования высокоточных многоэлементных спектров и, соответственно, методов и приборов с высокими метрологическими характеристиками (чувствительность до 10^{-12} г/л). В связи с этим, имеющиеся сведения об изменении микроэлементного статуса организма при патологических состояниях до настоящего времени весьма разрознены, а имеющиеся методики диагностики привязаны к эко-биогеохимическим областям вне Республики Беларусь и не могут быть полноценно использованы в медицинской практике нашей страны.

В настоящее время существует возможность использования масс-спектрометрии индуктивно связанной аргонной плазмы для высокоточного элементного и изотопного анализа биоптатов представительной выборки образцов, достаточной для разработки методик прогноза и ранней диагностики патологических состояний.

Кроме того, в настоящее время имеет место недостаток отечественных препаратов для коррекции и реабилитации микроэлементного статуса организма человека при донозологических и патологических состояниях. Разработка таких составов может позволить организовать производство отечественных препаратов безрецептурного отпуска для массового потребления, а также препаратов персонализированной медицины на основе микроэлементного комплекса и лекарственных препаратов различных фармакологических групп.

Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод, что разработка методов ранней диагностики и прогноза развития социально значимых патологических состояний по микроэлементному профилю биоптатов человека на основе данных масс-спектрометрии индуктивно связанной плазмы для Республики Беларусь является актуальной задачей не только с точки зрения социальной значимости, но и с экономической точки зрения.

Литература:

1. Сусликов В.Л., Толмачева Н.В. Научные основы регламентации оптимальных уровней и соотношений макро- и микроэлементов в водно-пищевых рационах населения Российской Федерации.// *Успехи современного естествознания*, №5, 2008, с. 140.
2. Долгов И.Ю. Первично-множественные метахронные злокачественные новообразования (клиника, лечение, закономерности развития).- Автореф. докт. мед. наук.- М.2000. 51 с.
3. Винокур Т.Ю. Гигиеническая оценка влияния эколого-биогеохимических факторов на развитие ишемической болезни сердца. – Автореф. канд. мед. наук. Казань. 2007. 21с.
4. Максимов Ю.Г. Состояние здоровья населения в регионах с эколого-биогеохимическими факторами риска.- Автореф. докт. мед. наук. М. 2000. 45 с.

THE PROBABILITIES OF APPLICATION OF MICROELEMENTAL PROFILE OF HUMAN BIOPSY MATERIAL FOR EARLY DIAGNOSTICS AND PREDICTION OF PROGRESS OF PATHOLOGIC STATES

Pytlev S.I.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of

Analysis of literature data shows that concentrations and proportions of microelements in human organism play “starting” role in evolution diseases of immune and circulatory systems, diabetes, cancer, pyoinflammatory pathologies.

The conclusion has been made that the development of methods for early diagnostic and prediction of pathologic states is actual aim for Belarus from social and economic point of view.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «ЛЕЙКЛАДИН» НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И СИСТЕМНЫМ СКЛЕРОЗОМ

Рябцева Т.В., Талако Т.М., Воронова Н.В., Сирош О.П., Сорока Н.Ф.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, пр. Дзержинского 83, 220116, E-mail: ta-yana@mail.ru*

Отечественный цитостатический препарат "Лейкладин" соответствует синтезированному за рубежом кладрибину (2-хлор-2'-дезоксаденозин). Сочетание иммуносупрессивной активности с относительно низкой в сравнении с другими иммунодепрессантами токсичностью явились предпосылками к использованию лейкладина в клинике при системных заболеваниях соединительной ткани. Целью данной работы являлось изучение влияния терапии лейкладином на состояние процессов перекисного окисления липидов у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системным склерозом (СС).

Материалы и методы. В первой опытной группе пациенты с ревматоидным артритом в комплексе с традиционной терапией получали 0,1% раствор лейкладина для инъекций из расчета 0,075 мг\кг\сутки в виде 2-часовой непрерывной внутривенной инфузии в течение 7 дней. Во второй опытной группе пациенты с системным склерозом в комплексе с традиционной терапией получали 0,1% раствор Лейкладина для инъекций из расчета 0,075 мг\кг\сутки в виде 2-часовой непрерывной внутривенной инфузии в течение 5 дней. Использование цитостатического препарата «Лейкладин» у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом проводилось с разрешения Министерства Здравоохранения Республики Беларусь и этического комитета УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска.

Прооксидантную и антиоксидантную активность изучали в плазме, нейтрофилах и лимфоцитах периферической крови. Прооксидантную активность изучали методом, суть которого заключается в том, что биологическую жидкость, в которой предполагается наличие прооксидантной активности, инкубируют в присутствии полиненасыщенной жирной кислоты, например, линолевой кислоты, после чего определяют наличие продуктов перекисного окисления липидов в реакционной смеси. О прооксидантной активности судят по ускорению перекисного окисления субстрата, по сравнению с контролем, где вместо субстрата окисления используют физиологический раствор [1]. Для сравнительной оценки прооксидантных свойств подсчитывали скорость накопления ТБК-АП в системе окисления по следующей формуле: $A = ((C_{\text{опыта}} - C_{\text{контроль}}) / t_{\text{инкуб.}}) * 1000$, нмоль/л*мин, где А - скорость накопления ТБК-АП; $C_{\text{опыта}}$ - концентрация ТБК-АП в опытной пробе; $C_{\text{контроль}}$ - концентрация ТБК-АП в контрольной пробе. Определение продуктов перекисного окисления липидов проводили в реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Каталазную активность определяли спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [2].

Полученные данные систематизировались и обрабатывались с помощью персонального компьютера и программы «StatSoft STATISTICA 6.0». Анализ распределения данных показал нам непараметрический характер распределения, таким образом, вычисляли медиану, 25 и 75 процентиля. Результаты представлялись в виде Me (25%;75%). Так как данные не подчиняются закону нормального распределения, был проведен статистический анализ независимых групп (опытная и контрольные группы сравнения) с применением непараметрических статистических методов. Для оценки однородности выборок применяли критерий Вилкоксона. Критический уровень значимости p нулевой гипотезы принимали равным 0,05. Корреляционный анализ проводили методом Спирмена.

Результаты исследования. Изучение концентрации ТБК-АП в плазме крови показало, что на +21 день после окончания курса Лейкладина концентрация ТБК-АП в плазме крови пациентов с РА и СС снижается с 8,28 (5,25;9,45) до 3,81 (3,78; 4,18) и с 4,41 (3,67;5,82) до 1,95 (1,73;2,75) нмоль/мл соответственно. Снижение концентрации ТБК-АП является благоприятным признаком, т.к. продукты перекисного окисления липидов являются весьма токсичными и способны приводить к повреждению клеток и молекул. Аналогичные изменения наблюдали при изучении прооксидантной активности плазмы. На +21 день после окончания курса лейкладина прооксидантная активность плазмы крови пациентов с РА и СС снижается в 6,94 и 1,94 раза соответственно. Снижение прооксидантной активности свидетельствует об уменьшении активности окислительных процессов плазмы, а также, возможно, об активации антиоксидантных систем в плазме крови. Данный факт, является положительным прогностическим признаком и может свидетельствовать об уменьшении интенсивности воспалительного ответа, т.к. многие медиаторы воспалительного ответа являются мощными прооксидантными агентами.

Изучение внутриклеточной прооксидантной активности иммунокомпетентных клеток показало снижение прооксидантной активности, как в лимфоцитах, так и в нейтрофилах. В результате терапии РА и СС с включением лейкладина прооксидантная активность лимфоцитов снижалась, при этом наблюдалась активация антиоксидантных клеточных систем. Так, на +21 день после окончания курса лейкладина активность каталазы лимфоцитов периферической крови пациентов с РА и СС достоверно увеличивается в 1,5 и 1,8 раза соответственно. Прооксидантная активность нейтрофилов пациентов с РА и СС на +21 день после окончания курса Лейкладина уменьшилась до 3,11 (2,09; 3,72) и 7,64 (6,63; 8,28) нмоль/мин соответственно. После курса препарата активность каталазы нейтрофилов периферической крови пациентов с РА увеличилась 1,2 раза. Активность каталазы нейтрофилов периферической крови пациентов с СС не изменилась.

Результаты исследования состояния перекисного окисления липидов у пациентов с РА и СС до начала терапии лейкладином свидетельствовали о дисбалансе прооксидантной и антиоксидантной активности. Наблюдали повышение прооксидантной активности плазмы крови и низкую активность внутриклеточной каталазы, как в лимфоцитах, так и в нейтрофилах пациентов с РА и СС. Однако в процессе терапии данных заболеваний цитостатическим препаратом «Лейкладин» происходило постепенное возрастание активности каталазы и снижение концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови, что является признаком восстановления прооксидантного-антиоксидантного баланса в организме. Таким образом, терапия РА и СС лейкладином позволяет восстановить баланс в работе про- и антиоксидантных систем.

Полученные результаты подтверждают гипотезу, высказанную в статье Тутельян А.В. о том, что иммуноотропные препараты действуют не только на иммунную систему, но и осуществляют общебиологическое действие [3]. Резюмирую экспериментальные и клинико-

лабораторные данные, полученные в ходе проведения настоящего исследования, необходимо отметить взаимосвязь иммунной, про- и антиоксидантных систем организма, а также существование общих механизмов регуляции этих систем. При действии фактора эндогенного или экзогенного происхождения на клетки иммунной системы происходит синтез активных форм кислорода и стимуляция ПОЛ. Что в свою очередь ведет к активации фактора транскрипции NF-κB, заключающаяся в диссоциации тримера и выхода ингибитора IκB. Диссоциация IκB вызывает быструю транслокацию димерного NF-κB из цитоплазмы в ядро, где он, связываясь с соответствующим промоторным участками гена, запускает экспрессию, транскрипцию и трансляцию синтеза целого ряда цитокинов и ферментов антиоксидантной защиты [4].

Литература:

1. Kapich A.N. A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi / Kapich A.N. [et al.] // Journal of microbiological methods. - 2005. -Vol.61.-P.261-271.
2. Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. - М., 1977.-С.66-68.
3. Тутельян А.В. Разработка системы оценки иммунотропных препаратов природного и синтетического происхождения на основе анализа взаимосвязи иммунной и антиоксидантной защиты / А.В. Тутельян // Аллергология и иммунология. - 2004. -Т.5,№2.- С.289-299.
4. Haddad, J.J. Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-κB / J.J. Haddad // Critical Care. - 2002. -Vol.6, № 6. - P. 481-490.

THE INFLUENCE OF CYTOSTATIC DRUG «LEUCLADIN» ON LIPID PEROXIDATION OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND SCLERODERMA

Ryabzeva T.V., Talako T.M., Voronova N.V., Sirosh O.P., Soroka N.F.
Byelorussian state medical university, Minsk, av. Dzerszinskogo, 83, 220116,
E-mail: ta-yana@mail.ru

КОМПЛЕКС ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНА С КРЕМОФОРМ В КАЧЕСТВЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

¹Самцов М.П., ⁴Петров П.Т., ¹Луговский А.П., ²Воропай Е.С., ²Луговский А.А.,
²Ляшенко Л.С., ⁴Демид Д.И., ³Истомин Ю.П.

¹*Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко, Беларусь,*
220064, ул. Курчатова 7, г. Минск, E-mail: samtsov@bsu.by;

²*Белорусский государственный университет, 220030, пр. Независимости 4, г. Минск,*
Беларусь, E-mail: voropay@bsu.by;

³*Институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, 223040, пос.*
Лесной. 2, Минский район, Минская обл., Беларусь;

⁴*Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2*

Полиметиновые красители (ПК) являются перспективными объектами для использования в качестве фотосенсибилизаторов для фотохимиотерапии (ФДТ) [1]. В первую очередь это обусловлено наличием полос поглощения в диапазоне, в котором прозрачность биологических тканей наибольшая (фототерапевтическое окно [2]). Это обеспечивает глубокое проникновение света в ткани и позволяет использовать метод ФДТ для лечения не только поверхностных, но и глубококорасположенных опухолей. Кроме того, они обладают высоким коэффициентом экстинкции ($>10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Недостатком большинства полиметиновых красителей является их недостаточно невысокая растворимость в водных и водно-спиртовых растворах.

Нами предложено использовать в качестве лекарственной формы ранее комплекс ранее исследованного нами трикарбоцианинового красителя (ТК) [3] и кремофора. Исследование образцов лекарственных форм нового перспективного фотосенсибилизатора показало, что в комплексе ТК с кремофором наблюдается повышение сродства к опухолевым клеткам и тканям. Накопление комплекса в опухолевых клетках после инкубации возросло в 4 раза, по сравнению с несвязанным с кремофором красителем. Контрастность накопления комплекса (отношение интенсивности флуоресценции в опухоли к интенсивности флуоресценции в нормальных тканях бедра) составила 3,5–4, что представляет значительный интерес не только для фотодинамической терапии, но и фотодинамической диагностики злокачественных новообразований.

Токсичность комплекса ТК с кремофором оказалась значительно ниже, чем токсичность ТК, как *in vitro* (в 2 раза), так и *in vivo* (в 2,5 раза). Фотодинамическая активность комплекса ТК с кремофором в отношении опухолевых клеток HeLa возросла в 4,8 раза, по сравнению с ТК.

Острая токсичность препарата определялась на белых беспородных крысах обоего пола весом 100–150 г при внутривенном способе введения.

Таблица 1

Показатели острой токсичности (мг/кг)

	ТК	комплекс ТК с кремофором
ЛД ₁₀	47,1	64,1
ЛД ₅₀	63,8±4,7	157,1±26,3
ЛД ₉₀	80,6	250,1

Противораковая активность комплекса (ТК) с кремофором определялась на белых беспородных крысах массой 100-150 г с перевитыми опухолями: саркомы М-1, рак печени РС-1, лимфосаркомы Плисса (ЛФС). Препарат вводили внутривенно в 5 % растворе глюкозы в дозе 4-5 мг/кг. Кинетику накопления препарата исследовали путем регистрации флуоресценции *in vivo*. Максимальное содержание препарата в опухоли наблюдалось через 2-3 ч после введения. В быстрорастущих опухолях отмечалось увеличение (более чем в 4 раза) содержание препарата в опухоли по сравнению с мышечной тканью. Локальное фотооблучение опухоли проводили излучением полупроводникового лазера с $\lambda=740 \text{ нм}$ в дозе 90–280 Дж/см². Плотность мощности фотооблучения составляла 150 мВт/см². Для оценки степени повреждения опухолевой ткани после фотодинамического воздействия проводили исследование опухолей с помощью метода витального окрашивания. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты прижизненной окраски опухолей крыс после фотодинамического воздействия с лекарственной формой

Вид	лекарственная	Воздействие (концентрация	Глубина некроза
-----	---------------	---------------------------	-----------------

опухоли	форма	препарата + доза облучения)	опухоли, мм
ЛФС	(ТК)	5 мг/кг + 90 Дж/см ²	15±2
РС-1		5 мг/кг + 90 Дж/см ²	19±2
М-1	комплекс (ТК) с кремофором	4 мг/кг+200 Дж/см ²	19±3
М-1		4 мг/кг+280 Дж/см ²	18±3
М-1		5 мг/кг+200 Дж/см ²	18±2

Глубина некроза саркомы М-1 и альвеолярного рака печени РС-1 крыс после введения комплекса ТК с кремофором и фотооблучения опухоли составила 12–21 мм, что сравнимо с результатами использования официально разрешенного для клинического применения фотосенсибилизатора фотолон.

Объекты и методики исследований. В качестве объекта исследований использован разработанный в лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко комплекс симметричного индотрикарбоцианинового красителя - диэфира бромиды 2-{7-[1-(3-карбоксыпропил)-3-метил-3-этил-2(1Н)-индолинилиден]-4-хлор-3,5-(о-фенилен)-1,3,5-гептатриенил-1-ил}-1-(3-карбоксы-пропил)-3-метил-3-этилиндолия с D-глюкозой (ТК) - с кремофором.

Таким образом, комплекс ТК с кремофором характеризуется выраженным эффектом фотодинамического воздействия, низкой острой токсичностью, высокой растворимостью в воде, высокой избирательностью накопления в опухолевой ткани и может найти применение для лечения злокачественных опухолей.

Литература:

1. Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, E. A. Zhavrid, E. S. Voropay, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevsky, A. P. Lugovsky, A. A. Lugovsky. The effect of hypoxia on photocytotoxicity of TICS tricarbocyanine dye in vitro // *Experimental oncology*. 28, N 1 (2006) p. 80-82.
2. T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G.Jori, D.Kessel, M.Korbelik, J.Moan, Q.Peng. Photodynamic therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*, 90, N 12 (1998) p.889—905
3. Ковалентно связанный с глюкозой индотрикарбоцианин в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных опухолей: пат. 7296 Респ. Беларусь / Воропай Е.С., Луговский А.П., Самцов М.П., Луговский А.А., Александрова Е.Н., Жаврид Э.А., Истомин Ю.П., Чалов В. Н., Петров П.Т., Царенков В. М. опубл. 30.09.05 // *Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці.* – 2005. – № 3. – С. 157.

COMPLEX OF INDOTRICARBOCYANINE WITH CREMOPHOR AS PHOTOSENSITIZER FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMOR

¹Samtsov M.P., ⁴Petrov P.T., ²Voropay E.S., ²Liashenka L.S., ²Lugovskii A.A., ¹Lugovskii A.P., ³Istomin Y.P., ⁴Demid D.I.,

¹A.N. Sevchenko Research Institute for Applied Physical Problems, 7 Kurchatov Str., Minsk, 220064, Minsk, Belarus, E-mail: samtsov@bsu.by;

²Belarussian State University, 4, Nezavisimosti av., Minsk, Belarus, 220030, E-mail: voropay@bsu.by;

³N.N. Aleksandrov Research Institute for Oncology and Medical Radiology, Lesnoy-2, Minsk district, 223040, Minsk region;

⁴State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

ИНДОТРИКАРБОЦИАНИН С МОДИФИЦИРОВАННОЙ СТРУКТУРОЙ В КАЧЕСТВЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

¹Самцов М.П., ⁴Петров П.Т., ¹Луговский А.П., ²Воропай Е.С., ²Луговский А.А.,

²Ляшенко Л.С., ⁴Демид Д.И., ¹Тарасов Д.С., ³Истомин Ю.П.

¹ *Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко, Беларусь, 220064, ул. Курчатова 7, г. Минск, E-mail: samtsov@bsu.by;*

² *Белорусский государственный университет, 220030 пр. Независимости 4, г. Минск, Беларусь, E-mail: voropay@bsu.by;*

³ *Институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, 223040 пос. Лесной. 2, Минский район, Минская обл., Беларусь;*

⁴ *Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2*

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей широко применяется во многих странах мира. В основе метода лежит способность препаратов-фотосенсибилизаторов накапливаться в опухолевых тканях и приобретать выраженные цитотоксические свойства при возбуждении светом. В качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ используются, в основном, соединения порфиринового ряда – производные гематопорфирина и хлорина еб. Получены положительные результаты при лечении методом ФДТ рака кожи, злокачественных опухолей головы и шеи, мочевого пузыря, бронхов, женских половых органов, пищевода и желудка, метастазов в коже рака молочной железы. Однако существенным недостатком гематопорфирина и других используемых в настоящее время в клинике фотосенсибилизаторов является недостаточно глубокое проникновение света в биологические ткани в области поглощения пигмента и в результате этого – недостаточная глубина повреждения опухоли после фотодинамического воздействия.

Дальнейшие успехи метода ФДТ связывают с использованием нового поколения фототерапевтических препаратов, характеризующихся сильным поглощением света в области "фототерапевтического окна" – от 600 до 1000 нм, в которой мало рассеяние света биологическими тканями и практически отсутствует поглощение света эндогенными биомолекулами, такими как гемоглобин, меланин и вода. Это обеспечивает глубокое проникновение света в ткани и позволяет использовать метод ФДТ для лечения не только поверхностных, но и глубокорасположенных опухолей. Необходимым требованием для нового поколения фотосенсибилизаторов является также преимущественное накопление в опухолевой ткани, минимальная темновая токсичность, а также быстрое выведение из нормальных тканей во избежание развития побочных эффектов, вызванных пролонгированной фототоксичностью.

Одной из групп соединений нового поколения фототерапевтических препаратов является группа цианиновых (полиметиновых) красителей, имеющих определенные преимущества перед соединениями порфиринового ряда. Так, цианиновые красители характеризуются максимальным поглощением света в более длинноволновой области спектра (700–900 нм), чем порфирины, высоким молярным коэффициентом экстинкции ($>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); некоторые соединения этого ряда проявляют выраженные фотосенсибилизирующие свойства и способность избирательного накопления в опухолевых клетках [1-3]

Исследования *in vivo* проведены на белых беспородных крысах обоего пола. Животные находились на стандартной диете и в обычном питьевом режиме. Все манипуляции с

экспериментальные животными проводили в соответствии с правилами Этического Комитета. Штаммы перевивных опухолей крыс (лимфосаркома Плисса, фибросаркома М-1 поддерживался путем перевивки животным каждые 7–8 и 14–15 дней соответственно. Для экспериментов крысам весом 110–130 г перевивали опухоли подкожно в область левого бедра, путем введения 0,5 мл 20%-ного гомогената опухолевой ткани

Исследование накопления трикарбоцианинового красителя (ТК) в опухолевых и нормальных тканях проводили при введении крыс в состояние наркоза (5 мг/кг дроперидола и 0,05 мг/кг фентанила в/м) вводили внутривенно исследуемый препарат ТК в дозе 3 мг/кг. Для уменьшения светорассеяния шерсть над измеряемыми участками выстригали и кожу смазывали вазелиновым маслом. Относительное содержание ТК в опухолевых и нормальных тканях бедра крыс определяли по интенсивности их флуоресценции, используя комплекс аппаратуры для оптической диагностики области локализации новообразований, разработанный в лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко.

Раствор фотосенсибилизатора в 5 % растворе глюкозы вводили внутривенно крысам в состоянии наркоза. Через 2,5 - 3 ч после введения препарата опытным крысам проводили локальное фотооблучение опухоли излучением полупроводникового лазера $\lambda=740$ нм или светодиода с $\lambda=780$ нм в дозе 200 Дж/см², контрольным крысам фотовоздействие не осуществлялось. Плотность мощности светового излучения составляла 150 мВт/см². Для оценки степени повреждения опухолевой ткани после фотодинамического воздействия использовали метод витального окрашивания синькой Эванса. Через 24 ч после воздействия крысам вводили внутривенно 0,6%-ный раствор синьки Эванса (по 1 мл на 100 г веса), спустя 2 ч животных умерщвляли хлороформом, опухоль извлекали и фиксировали в течение 1 ч в 10%-ном формалине. Для определения участков некроза опухоль разрезали в продольном направлении и измеряли величину окрашенной и неокрашенной зон.

В результате модификации структуры краситель получил способность растворяться в воде. Строение соединения подтверждено путем анализа данных элементного анализа, электронных и ПМР спектров. Концентрация модифицированного ТК в опухолевых тканях накапливается до максимальной величины в течение 2,5 – 3 часов, после чего остается постоянной вплоть до 5 часов. Через сутки после введения концентрация фотосенсибилизатора уменьшается более чем на порядок. Контрастность накопления, т.е. отношение интенсивности флуоресценции ТК в опухолевой ткани к сигналу от мышечной составляет 4 – 5.

В результате исследований острой токсичности на мышах установлено, что LD₅₀ составляет около 25 мг/кг. Проведены исследования специфической активности фотосенсибилизатора при концентрации 3 мг/кг и воздействии 20 Дж/см² излучением полупроводникового лазера с $\lambda=740$ нм или светодиода с $\lambda=780$ нм. В результате установлено, что после такого воздействия наблюдается тотальный некроз опухолевой ткани, на глубине повреждение достигает 2,7 см.

Таким образом, разработано соединение перспективное для использования в качестве фотосенсибилизатора для фотохимиотерапии злокачественных новообразований.

Литература:

1. Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, E. A. Zhavrid, E. S. Voropay, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevsky, A. P. Lugovsky, A. A. Lugovsky. The effect of hypoxia on photocytotoxicity of TICS tricarbocyanine dye in vitro // *Experimental oncology*. **28**, N 1 (2006) p. 80-82.
2. М.П. Самцов, Е.С. Воропай, К.Н. Каплевский, Д.Г. Мельников, Л.С. Ляшенко, Ю.П. Истомин. Влияние энергии фотона на эффективность фотохимиотерапии // *Журн. прикл. спектр.*, Т. 76, № 4. (2009) 576—582

3. М.П. Самцов, Е.С. Воропай, Д.Г. Мельников, Л.С. Ляшенко, А.А. Луговский, Ю.П. Истомин. Спектрально- люминесцентные свойства индотрикарбодцианинового красителя в биотканях // Журн. прикл. спектр., 2010 Т. 77, № 3 С. 438-444

THE MODIFIC STRUCTURE INDOTRICARBOCYANINE AS PHOTSENSITIZER FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMOR

¹Samtsov M.P., ⁴Petrov P.T., ²Voropay E.S., ²Liashenka L.S., ²Lugovskii A.A., ¹Lugovskii A.P., ³Istomin Y.P., ⁴Demid D.I., ¹Tarasov D.S.

¹ A.N. Sevchenko Research Institute for Applied Physical Problems, 7 Kurchatov Str., Minsk, 220064, Minsk, Belarus, E-mail: samtsov@bsu.by;

² Belarussian State University, 4, Nezavisimosti av., Minsk, Belarus, 220030, E-mail: voropay@bsu.by;

³ N.N. Aleksandrov Research Institute for Oncology and Medical Radiology, Lesnoy-2, Minsk district, 223040, Minsk region;

⁴State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИНА И N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА СИСТЕМЫ ОБМЕНА СПИРТОВ И АЛЬДЕГИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Сатановская В.И., Кондыба Н.И., Пронько П.С., Гайшманова А.В., Шляхтун А.Г.
Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by

Алкогольдегидрогеназы (АДГ) и альдегиддегидрогеназы (АльдГ) – основные ферменты обмена спиртов и альдегидов. В условиях алкогольной интоксикации эти ферменты участвуют в обмене этанола и его токсичного метаболита – ацетальдегида. При этом страдают обмены других спиртов и альдегидов. При хроническом поступлении этанола происходит накопление малонового альдегида, оксипропеналя, которые в свою очередь могут инактивировать АльДГ [1,2]. Ранее нами показано, что глутамин смягчает проявления синдрома отмены этанола, нормализуя обмен ГАМК в мозге и альдегидов в печени [3].

Цель работы: изучение влияния глутамина и антиоксиданта N-ацетилцистеина на АДГ и АльДГ печени крыс после хронической алкогольной интоксикации.

Методы исследования. В модели хронической алкогольной интоксикации с использованием этанол-содержащей жидкой диеты по Либери [4] препараты вводили в/ж на фоне отмены этанола.

В опыте использованы крысы самцы линии Вистар начальной массой 180-250 г. Интактные животные содержались на стандартной диете вивария и свободным доступом к воде.

Контрольные животные получали жидкую диету на основе сухого молока, растительного масла и сахарозы (36% от общих калорий). Опытные животные получали аналогичную диету, в которой вместо сахарозы присутствовал этанол: 1-3 день – 25,5 г/л, 4-й день и до конца эксперимента – 51 г/л (36% от общих калорий). Среднее потребление этанола с диетой составило около 18 г/кг массы тела в день.

Через 40 дней интоксикации часть животных декапитировали (группа – алкогольная диета). Оставшимся крысам в течение 14 дней вводили в/ж N – ацетилцистеин (100 мг/кг) + глутамин (340 мг/кг), приготовленные на 1,5% растворе крахмала. Со дня введения препаратов жидкую алкогольную диету заменили на жидкую контрольную диету. Контрольные животные (диета вивария, сахарозная диета, отмена этанола) получали в этот период 1,5% раствор крахмала. Затем крыс декапитировали. Печень заморозили в жидком азоте и хранили при -87°C.

Спектрофотометрически определяли активность АДГ с этанолом, АльДГ с ацетальдегидом в качестве субстратов. Статистическую обработку данных проводили при помощи ППП Graph Pad Prism 5.0, используя непарный двусторонний t-test. Результаты представлены в таблице.

Результаты исследования. Алкогольная интоксикация вызвала активацию АльДГ с высокой Км к альдегидам (мМ уровень) и не затронула внутримитохондриальный фермент с низкой Км (мкМ). Отмена этанола достоверно снизила активность АльДГ с высокой Км. Введение глутамин и N-ацетилцистеина в период отмены этанола вызвало резкую активацию АДГ и нормализацию активности АльДГ с высокой Км. Поскольку известно, что N-ацетилцистеин предотвращает образование сшивок SH-групп [5], можно предположить, что наблюдаемая нами активация вызвана защитой SH-групп в активных центрах АДГ и АльДГ от накапливающихся в период отмены этанола токсичных альдегидов.

Заключение. Таким образом, Глутамин и N-ацетилцистеин защищают от деградации систему обмена спиртов и альдегидов после хронической алкогольной интоксикации.

Таблица

Активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) и альдегиддегидрогеназ (АльДГ) печени (нмоль НАДН/мин/мг белка) крыс с хронической алкогольной интоксикацией (жидкая диета – 36% калорий-этанол, 40 дней), получавших в период отмены этанола в/ж N-ацетилцистеин (100 мг/кг) + глутамин (340 мг/кг) в течение двух недель.

1	Группы	АДГ	АльДГ с высокой Км	АльДГ с низкой Км
2	Диета вивария	8,5±1,1	6,4±0,7	6,8±0,5
3	Диета сахарозная	8,9±1,9	6,7±0,7	6,440,6
4	Диета алкогольная	10,7±1,6	9,3±0,8 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05	8,0±0,7
5	Отмена этанола	7,4±1,7	5,6±0,7 p ₃ <0,01	6,6±0,6
6	N-АЦ + Глутамин	16,7±1,5 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01 p ₃ <0,005 p ₄ <0,001	8,1±0,7 p ₄ <0,05	6,0±1,0

Литература:

1. Hjelle J.J., Grubbs J.H., Petersen D. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by malondialdehyde // Toxicol. Lett. 1982. Vol. 14, №1-2. P. 35-43.
2. Navasumrit P., Ward T.H., Dodd N.J., et al. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure // Carcinogenesis. 2000. Vol. 21, №1. P. 93-96.

3. Садовник М.Н., Канунникова Н.П., Чумакова О.В. и др. Применение глутамина для коррекции нарушений метаболизма этанола, систем ГАМК и ацетилхолина у крыс в период отмены после хронической алкогольной интоксикации // Научно-практ. конф. Связь науки с практикой – важный фактор повыш. эффективности обществ. пр-ва: Тез. Докл. Гродно, 1982. Ч. 4. С. 109.

4. Lieber C.S., De Carli L.M. Animal models of chronic ethanol toxicity// In: Methods in Enzymology.-1994. Vol.233.-P.585-593.

5. Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid // Free radical Biol. Med. - 1989. Vol.6.-P.593-597.

EFFECT OF GLUTAMINE AND N-ACETYL CYSTEINE ON THE SYSTEMS OF LIVER ALCOHOL AND ALDEHYDE METABOLISMS IN RATS AFTER ALCOHOL INTOXICATION

Satanovskaya V.I., Kandyba N.I., Pronko P.S., Gaishmanova A.V., Shlyakhtun A.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus

The combined i.g. administration of glutamine (340 mg/kg) and N-acetyl cysteine (100 mg/kg) during 14 days following alcohol withdrawal in rats with chronic alcohol intoxication (liquid diet, 40 days) causes activation of liver alcohol dehydrogenase and normalization of aldehyde dehydrogenase with high Km.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ДНК-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИН-КИНАЗЫ (DNA-РК) – NU7026 НА РЕПАРАТИВНЫЙ ОТВЕТ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ЭТОПОЗИДУ

Тарасова А.В., Шман Т.В.

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии», 223040, п. Лесной-2, Минский р-н, Минская обл.,

Республика Беларусь, E-mail: tarasova_alinav@mail.ru

Введение. Актуальной проблемой в лечении острых и хронических лейкозов является устойчивость лейкоэмических клеток к химиопрепаратам. Для многих лекарственных препаратов (этопозид, флударабин, митоксантрон), используемых при терапии гемобластозов, мишенью является молекула ДНК, однако, усиление репаративных процессов в лейкоэмических клетках значительно снижает эффективность этих химиопрепаратов. Наиболее губительными для клеток являются двунитевые разрывы ДНК, которые можно детектировать по накоплению фосфорилированной формы гистона H2AX (γ -H2AX). Репарация таких повреждений происходит с помощью двух основных систем: гомологичной рекомбинации (homologous recombination, HR), которая наиболее активна в пролиферирующих клетках, в S- и G2-периодах клеточного цикла, и системы сшивания негомологических концов ДНК (nonhomologous end joining, NHEJ), которая максимально активна в G0/G1-периоде клеточного цикла [1]. Фосфорилирование гистона H2AX после генотоксического воздействия происходит с помощью трех основных киназ: АТМ (ataxia telangiectasia mutated), АТР (АТМ-Rad3-related) и DNA-РК (DNA-dependent protein kinase). Уровень γ -H2AX в клетках четко коррелирует со степенью повреждения их генома, а киназа АТМ, помимо своей функции сенсора двунитевых разрывов ДНК, задействована в

сигнальном каскаде запуска апоптоза. Таким образом, по накоплению активных форм γ -H2AX и pATM можно оценивать репаративный ответ клетки от момента детекции повреждений ДНК сенсорными белками до начальной стадии программированной клеточной гибели [2].

Целью данной работы было изучить влияние ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы NU7026 на чувствительность лейкозных клеток к этопозиду, а также исследовать динамику репаративных процессов в клетках при воздействии на них комбинации этопозиды и NU7026 и препарата отдельно.

В ходе исследования были использованы лейкоэмические клетки 32 пациентов с диагнозом острый лейкоз, находящихся на лечении в ГУ РНПЦДОГ. Чувствительность опухолевых клеток к этопозиду определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT) теста. У 15 из 32 пациентов была параллельно проведена оценка уровня γ -H2AX и pATM в клетках при воздействии на них этопозиды (10 мкг/мл) без NU7026 и в его присутствии. Часть клеток отбирали в точках 3 и 24 часа, фиксировали с помощью 1-% раствора параформальдегида (15 мин, +4°C) и ледяного 70% этанола (-20 °C, не менее 20 часов). После фиксации клетки дважды отмывали в PBS, ресуспендировали в блокирующем буфере (4% ЭТС в PBS) и инкубировали с антифосфогистон-H2AX (Ser139) Mouse Anti-Human IgG1-к антителами в разведении 1:4000 и антифосфо-ATM (Ser1981) Mouse Anti-Human IgG2b/к антителами в разведении 1:1000 в течение 2-х часов при температуре +4°C. Затем клетки отмывали в PBS с 4% ЭТС, добавляли вторичные антитела Goat Anti-Mouse-IgG1(γ 1) Alexa Fluor488 (1:4000) и Goat Anti-Mouse-IgG2b(γ 2b) Alexa Fluor633 (1:1000) и инкубировали 1 час при температуре +4°C. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter)[3]. Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel и Statistica 6.0.

Результаты. По результатам MTT-теста было выявлено повышение чувствительности лейкоэмических клеток к этопозиду в присутствии ингибитора NU7026. Медиана по LC-50 составила: 7,41 (0,09; 50,00) мкг/мл – для этопозиды и 2,51 (0,09; 50,00) мкг/мл – для этопозиды в комбинации с NU7026 (Wilcoxon test, $p < 0,01$).

В лейкоэмических клетках 15 пациентов был исследован уровень γ -H2AX и pATM после воздействия на них одного этопозиды и комбинации этопозиды с NU7026. Оценка репаративного ответа проводилась через 3 и 24 часа культивирования. Было отмечено, что после 3 часов инкубации клеток с этопозидом уровень γ -H2AX увеличивается в 15,7 раз, а уровень pATM увеличивается в 11,5 раз по сравнению с таковым в клетках, не подвергшихся генотоксическому воздействию. Количество клеток с повышенным уровнем γ -H2AX по медиане составило: в контрольных клетках – 2,9 (0,8; 13,9)%, в клетках с этопозидом – 45,5 (26,1; 90,0)%, а в клетках с этопозидом и NU7026 – 45,8 (21,9; 78,9)%. Количество клеток с повышенным уровнем pATM по медиане составил: в контрольных клетках – 1,9 (0,3; 4,9)%, в клетках с этопозидом – 22,0 (1,6; 77,3)%, а в клетках с этопозидом и NU7026 – 19,5 (1,3; 76,0)%. Таким образом, присутствие NU7026 не оказывало значительного влияния на уровень репаративного ответа клеток через 3 часа воздействия этопозиды. Через 24 часа генотоксического воздействия не было обнаружено закономерного увеличения или снижения уровня γ -H2AX в клетках, что может быть следствием индивидуальной чувствительности к препарату лейкоэмических клеток пациентов, а также включением других механизмов химиорезистентности. Было отмечено влияние NU7026 на уровень pATM в клетках через 24 часа инкубации с этопозидом. Количество клеток с высоким уровнем pATM по медиане составило: 3,00 (1,00; 22,10)% в контрольных клетках, 11,85 (0,60; 35,90)% - в клетках с этопозидом и 24,50 (2,70; 45,50)% - в клетках с этопозидом и NU7026 ($p < 0,05$). Увеличение уровня pATM в клетках может быть результатом неэффективности репарации двуниевых разрывов и запуска программы апоптоза.

В результате проведенных исследований было выявлено повышение чувствительности лейкемических клеток пациентов к ДНК-повреждающему препарату этопозиду в присутствии специфического ингибитора киназы DNA-РК. После генотоксического воздействия в клетках значительно увеличивался уровень γ -H2AX и pATM. Однако, наблюдались индивидуальные особенности динамики репаративных процессов в лейкемических клетках пациентов – изменение уровня γ -H2AX наблюдалось в широком диапазоне и не зависело от присутствия ингибитора NU7026. Было обнаружено достоверное увеличение уровня pATM в лейкемических клетках после инкубации их с этопозидом и NU7026 в течение 24 часов по сравнению с действием одного этопозидом, что может свидетельствовать о запуске программы апоптоза в ответ на неэффективность репарации двунитевых разрывов ДНК.

Таким образом, использование ингибиторов репарации ДНК может повысить эффективность действия многих противолейкозных препаратов.

Литература:

1. J.Kobayashi, K.Iwabuchi. Current topics in DNA double-strand break repair//J.Radiat.Res. (2008), 49, 93-103.
2. Toshiki Tanaka, Frank Traganos. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide relation to cell cycle//Cell Cycle (2007), 6:3, 371-376.
3. Toshiki Tanaka, Darzynkiewicz Z. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents//Cytometry Part A (2007), 648-661.

THE INFLUENCE OF DNA-DEPENDENT PROTEIN KINASE INHIBITOR NU7026 ON DNA REPAIR PATHWAYS AND SENSITIVITY OF LEUKEMIC CELLS TO ETOPOSIDE.

Tarasova A., Shman T.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus.

Leukemic cells from 32 patients diagnosed with acute leukemia were used in this study. Sensitivity to etoposide was assessed using MTT-test. DNA repair response based on the level of γ -H2AX and pATM was tested by flow cytometry.

MTT-test revealed, that inhibitor NU7026 facilitated sensitivity of leukemic cells to etoposide ($p < 0,01$). After exposure with drug γ -H2AX and pATM levels in leukemic cells was significantly increased, but there was various DNA repair dynamics in the cells from individual patients. We also observed statistically significant differences between the level of pATM in leukemic cells exposed to etoposide and in the cells exposed to combination of drug and inhibitor NU7026.

ДЕЙСТВИЕ БАРБИТУРАТОВ И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА КИСЛОРОДНЫЙ ОБМЕН ЭРИТОЦИТОВ

¹Титовец Э.П., ²Смирнова Л.А., ¹Пархач Л.П.

¹РНПЦ неврологии и нейрохирургии, 220114, г. Минск, Староборисовский тракт, 24, E-mail: ninh@mail.ru;

Введение. В настоящее время имеются данные о наличии в мембране эритроцитов крови человека трансмембранных белков аквапоринов AQP1 и AQP9 [1,2]. AQP1 эритроцитов обеспечивает до 100% водного обмена и участвует в газообмене эритроцитов [2]. AQP9 участвует в контроле липидного обмена [1]. Как показали наши исследования, преобладающий в численном отношении в мембране эритроцитов AQP1 принимает участие в газообмене кислорода [3].

Известно, что на аквапорин AQP1 оказывают ингибирующее действие низкомолекулярные соединения ртути, а также такие фармакологические средства, как тиопентал, фенобарбитал и пропофол, применяемые для внутривенного наркоза [1,4]. Также имеются данные, что экспрессия аквапорина AQP1 возрастает под действием дексаметазона, который активирует транскрипцию гена этого аквапорина [5]. Промоторный сайт гена AQP1 включает структуру ответа на действие глюкокортикоидов.

Целью исследования было изучить действие барбитуратов и глюкокортикоидов на кислородный обмен эритроцитов.

Материалы и методы исследования. Для изучения кислородного обмена эритроцитов и воздействия на него фармакологических препаратов в РНПЦ неврологии и нейрохирургии сконструировано полярографическое устройство открытого типа (авт. проф. Титовец Э.П.), включающее газообменный модуль и систему термостатирования в модульном комплексе. Модульный компьютеризированный комплекс с пакетом прикладных программ, обеспечивает регистрацию и сохранение данных, а также расчет параметров кислородного обмена эритроцитов: скоростей переноса кислорода через эритроцитарную мембрану в обоих направлениях [5].

Эритроциты крови человека отмывали и трижды пересаждали в фосфатном буфере: NaCl – 86 mM; Na₂HPO₄ – 21 mM; NaH₂PO₄ 8,3mM; CaCl₂ – 10 μM; pH 7,4. Исследования выполняли при 24⁰C. При измерениях использовали суспензию эритроцитов с их содержанием – 0,30x10⁶/мкл. Количество эритроцитов определяли с помощью гематологического анализатора Nihon Condens MEK 7222.

Результаты. Исследовали влияние длительного применения глюкокортикоидов на кислородтранспортные функции эритроцитов, определяемые количеством и активностью аквапорина AQP1. Контрольную группу составили добровольцы-доноры – мужчины и женщины (n=12). Вторую группу составили пациенты с анемиями различного генеза, при лечении которых не применялась глюкокортикоидная терапия (n=13). Третью группу составили пациенты, при лечении которых в течение более 2 месяцев применяли интенсивную глюкокортикоидную терапию. Показано, что скорости кислородного обмена эритроцитов максимальны у пациентов, получавших длительное время – от 2 месяцев до 7 лет глюкокортикоидные препараты: скорость дезоксигенации в этой группе выше на 39% по отношению к контролю, оксигенации – на 29% (в группе пациентов с анемиями без глюкокортикоидной терапии – на 10% и 8%, соответственно).

Таким образом, при лечении анемий различного генеза глюкокортикоидами наблюдается повышение проницаемости эритроцитарной мембраны к кислороду. В силу имеющихся данных о том, что экспрессия водного канала AQP1 в клетках эндотелия сосудов возрастает под действием глюкокортикоидов [4], наших данных об участии AQP1 в организации трансмембранного переноса кислорода, а также факта наличия AQP1 в мембранах эритроцита, можно предположить, что длительное применение глюкокортикоидной терапии приводит к повышенной экспрессии этого аквапорина в мембране не только клеток эндотелия сосудов, но и эритроцитов. Соответственно, увеличение количества трансмембранных каналов AQP1 в эритроците приводит к увеличению скоростей кислородного обмена эритроцитов.

В зрелом эритроците синтез белка AQP1 не осуществляется, что делает эритроцит удобным объектом для исследования непосредственного действия фармакологических средств на его активность. В модельных экспериментах *in vitro* эритроциты крови доноров подвергали 30-минутной инкубации с терапевтическими дозировками преднизолона, применяемого для внутривенных инъекций. Показано, что инкубация эритроцитов с преднизолоном не приводила к существенным изменениям скоростей как оксигенации, так и дезоксигенации эритроцитов, т.е. глюкокортикоиды не оказывают существенного влияния на кислородтранспортную активность AQP1.

Таким образом, терапевтический эффект глюкокортикоидов *in vivo*, связанный с ускорением процессов трансмембранного переноса кислорода и воды, будет определяться скоростью экспрессии AQP1, поскольку этот препарат не влияет непосредственно на активность AQP1.

Проведены исследования действия тиопентала натрия и, в сравнительном аспекте, ингибитора аквапорина AQP1 хлорида ртути на кислородтранспортные функции эритроцита. Известно, что ионы ртути ковалентно связываются с SH-группой водной поры AQP1, что лежит в основе их ингибирующего относительно транспорта воды эффекта [1]. Выявлено, что тиопентал, применяемый в клинике для внутривенной анестезии и по некоторым другим показаниям, оказывает ингибирующее действие. Максимальное торможение активности AQP1 развивается в течение ≈ 25 мин, соответствующее времени взаимодействия барбитурата с функционально значимыми тиольными группами этого аквапорина. Ход эксперимента и время воздействия были аналогичны воздействию хлорида ртути

Как известно, тиопентал тормозит перенос воды через AQP1, причем является векторным ингибитором этого аквапорина – тормозит процесс переноса воды в клетку, но не влияет на ее перемещение через мембрану из клетки [2]. В целом, применение тиопентала в терапевтических целях может способствовать разрешению отека головного мозга в силу активации переноса воды из интерстициального пространства в микрососуды. В отношении кислорода показано, что тиопентал ингибирует трансмембранный транспорт кислорода в направлении из клетки и в значительной степени тормозит перемещение кислорода внутрь клетки. Полученные данные интерпретируются с позиций функционирования аквапорин-зависимого механизма газообмена эритроцитов.

Заключение. Изучен кислородный обмен эритроцитов у доноров, у пациентов с анемиями различного генеза при длительном воздействии глюкокортикоидной терапии, а также действие на кислородтранспортные процессы фармакологических препаратов: тиопентала, преднизолона. Выявлено, что длительное применение глюкокортикоидов при лечении анемий различного генеза приводит к повышению проницаемости эритроцитарной мембраны к кислороду, вследствие предполагаемого увеличения экспрессии AQP1 в мембране эритроцитов под воздействием препарата. Показано ингибирующее действие тиопентала на транспорт кислорода через эритроцитарную мембрану и отсутствие значимых изменений кислородного обмена эритроцитов после инкубации эритроцитов с преднизолоном. Полученные данные находят свое объяснение с позиций функционирования аквапорин-зависимого пути кислородного обмена эритроцитов.

Литература:

1. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты. Мн., 2007. 239 с.
2. Blank M.E. and Ehmke H. Aquaporin-1 and HCO_3^- - Cl^- transporter-mediated transport of CO_2 across the human erythrocyte membrane. // J. Physiol. 2003. Vol.550. N2. P. 419–429.

3. Титовец Э. П., Пархач Л.П. Степанова Т.С. Изучение механизма переноса кислорода через эритроцитарную мембрану: роль аквапорина AQP1// Весці НАН Беларусі. Сер.біял. навук. 2010. №2. С.81-87.

4. Voigtlaender J., Heindl B., Naunyn-Schmiedeberg's B. Transmembrane water influx via aquaporin-1 is inhibited by barbiturates and propofol in red blood cells. // Arch. Pharmacol. 2002. Vol. 366. P.209–217.

5. Kobayashia I., Yokoo H., Yanagita T., et al. Induction of aquaporin 1 by dexamethasone in lipid rafts in immortalized brain microvascular endothelial cells //Brain Res. 2006. Vol.1123. P. 12–19.

THE EFFECT OF GLUCOCORTIKOIDS AND BARBITURATES ON OXYGEN TURNOVER IN ERYTHROCYTES

¹Titovets E P., ²Smirnova L.A., ¹Parkhach L P.

¹*National Practical Research Center of Neurology and Neurosurgery State Company;*

²*Belorussian Medical Academy Advanced Education*

The effect of pharmacological therapy is considered from the point of view of regulation of aquaporin activity in erythrocytes membrane. A new technology has been developed to study oxygen turnover in human red blood cells. It has been revealed increase in the erythrocyte membrane oxygen transfer rates in patients after corticosteroid therapy. This effect is explained in terms of aquaporin1 enhanced expression induced by dexamethasone. It was demonstrated that erythrocytes oxygen exchange rate was inhibited by thiopental. The results are explained in terms of the functioning of aquaporin-dependent oxygen transfer mechanism.

ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ С ФЕРМЕНТАМИ БИОСИНТЕЗА СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ТРАНСГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹Фалетров Я.В., ²Фроленков К.А., ¹Рудая Е.В., ¹Сивоплясова А.В., ³Костин Д.Г.,
³Слобожанина Е.И., ¹Шкуматов В.М.

¹*Учреждение Белорусского Государственного Университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Ленинградская, 14, 220030, г. Минск, Беларусь, E-mail: biopharm@bsu.by;*

²*РУП «Белмедпрепараты», Фабрициуса, 30, 220007, г. Минск, Беларусь;*

³*«Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Академическая 27, 220072, г. Минск, Беларусь*

Оценка взаимодействия лекарств с белками-мишенями является важной частью прогноза фармакологических свойств лекарственного вещества, его терапевтических и побочных эффектов. Компьютерные методы моделирования взаимодействий низкомолекулярных веществ с белками (белок-лигандный докинг) являются важным и удобным средством современных биохимико-фармакологических исследований лекарств. Цитохром P450c17 (17 α -гидроксилаза-17,20-лиаза) является ключевым ферментом биосинтеза 17альфа-гидрокси-прегнанов и половых стероидных гормонов (андрогенов, эстрогенов). Ингибирование P450c17 лекарствами может служить основой терапевтического действия лекарств при терапии гормон-зависимых форм рака простаты и рака молочной железы, так и побочным действием при терапии других заболеваний. Абиратерона ацетат –

селективный стероидный ингибитор P450c17 - сейчас находится на стадии клинических испытаний [1]. Известно, что 17 α -этинил-стероиды способны ингибировать цитохром P450 3A4 печени, участвующий в метаболизме огромного числа лекарств; циклопентанпергидрофенантроновый фрагмент в структуре вещества значительно способствует его связыванию с P450c17 [1, 2].

Была оценена способность трех лекарственных веществ, являющихся 17 α -этинил-3-кето- Δ^4 -стероидами, ингибировать P450c17 при помощи докинга и сравнить данные *in silico* с данными экспериментов *in vitro*, полученных с использованием цельноклеточной тест-системы на основе трансгенного штамма дрожжей, экспрессирующих P450c17. В качестве таких лекарственных веществ были выбраны мифепристон (действующее вещество препаратов *Мифегин*, *Мифепристон* и т.д.) - антагонист прогестерона, даназол (*Дановал*, *Данол* и т.д.) - ингибитор высвобождения АКТГ, левоноргестрел (*Постинор*, *Микролют* и т.д.) – прогестин, оральная контрацептив [3]. В работе использованы: прогестерон, 17 α -гидроксипрогестерон, даназол (17 α -прегна-2,4-диен-20-ино(2,3-d)изоксазол-17-ол), кетоконазол (цис-1-ацетил-4-[4-[[2-(2,4-дихлорфенил)-2-(1H-имидазол-1-ил-метил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]-пиперазин), мифепристон ((11 β ,17 β)-фенил-17-гидрокси-17-(1-пропинил)-эстра-4,9-диен-3-он), левоноргестрел ((17 β)-17-гидрокси-17-этинил-19-метил-эстра-4-ен-3-он). При молекулярном докинге использовали собственную модель фермента, созданную с помощью программ BLAST и Modeller на основе трехмерной структуры микросомального P450 печени с наилучшей степенью гомологии с P450c17 [4]. Докинг осуществлен с помощью программ Autodock 4.0 и AutoDock Tools (Graphics Laboratory, Scripps Research Institute, США) согласно модели «ключ-замок». Координаты центров областей взаимодействия с размерами 60 \times 70 \times 60 \AA^3 были выбраны вблизи гема. Построение и форматирование молекул стероидов осуществляли с помощью программ ChemDraw, Chem3D (ChembrigeSoft) и HyperChem 7.01 (Hypercube, Inc.). Анализ полученных данных – конформаций комплексов P450c17 и констант диссоциации, рассчитанных по величинам скоринг-функций, проводился на основании данных литературы о свойствах P450 и его известных ингибиторов [1]. Оценка подавления активности P450c17 данными веществами осуществлялась по степени образования 17 α -гидроксипрогестерона как описано в [3, 4].

Показано, что все стероидные молекулы могут локализоваться вблизи гема P450c17, частично или полностью оккупируя сайт связывания прогестерона – субстрата P450c17. Локализация этинильных фрагментов данных стероидных лекарств указывает на малую вероятность их модификации за счет реактивных железо-кислородных интермедиатов P450c17. Локализация оксазольного цикла даназола не позволяет атому азота в его составе связываться с железом гема (как в случае кетоконазола). Константы диссоциации (Kd), полученные по данным докинга указанных выше стероидов, приведены в таблице. Там же приведены экспериментальные значения концентраций, при которых степень ингибирования P450c17-зависимого 17 α -гидроксилирования прогестерона трансгенными дрожжами *S.cerevisiae* YEp5117 α , составляли 50% (IC50). Эти дрожжи являются основой цельноклеточной тест-системы, модель культуры клеток ткани-мишени и позволяют оценивать как взаимодействие с ферментом-мишенью, так и общую токсичность и способность соединения проникать через биологические мембраны. Дрожжи *S.cerevisiae* YEp5117 α осуществляют важные реакции стероидогенеза млекопитающих: 17 α -гидроксилирование (обусловлено «встроенным» P450c17), 17 β - и 20 α -кетовосстановление (катализируют белки-ортологи гидроксистероид-дегидрогеназ). В экспериментах *in vitro* с клетками трансгенных дрожжей образование метаболитов данных стероидных лекарств и инактивации ими P450c17 не наблюдалось.

Таблица. Параметры взаимодействия стероидных лекарств с цитохромом P450c17.

Вещество	Kd, нМ	IC50, мкМ
Прогестерон	71	-
Левоноргестрел	22; 120	40
Даназол	106; 153 *	45
Мифепристон	1400; 3140	60

* при наличии двух различных конформаций.

Методами белок-лигандного докинга и сравнения активности P450c17 в составе трансгенных дрожжей, экспрессирующих этот фермент стероидогенеза млекопитающих, установлена способность этих лекарств ингибировать активность P450c17. Это может рассматриваться как побочное действие лекарства в норме, и как механизм терапевтического действия в случае таких стероид-зависимых патологий, как рак простаты и молочной железы.

Литература:

1. Новикова Л.А., Фалетров Я.В., Ковалева И.Е., Мауерсбергер Ш., Лузиков В.Н., Шкуматов В.М. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям //Успехи биологической химии. 2009. Т.49. Р. 159-208.
2. F. P. Guengerich. Uncommon P450-Catalyzed Reactions //Curr. Drug Metab. 2001. V.2. P. 93-115.
3. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Фролова Н.С., Барт Г., Мауерсбергер Ш. Влияние модификаторов биосинтеза стероидов на биотрансформацию прогестерона рекомбинантными микроорганизмами, экспрессирующими цитохром P-450c17// Биомед. химия. 2006. Т. 52. С. 298-308.
4. Фроленков К.А., Фролова Н.С., Рудая Е.В., Шкуматов В.М. Влияние тетразолов на взаимоотношение 17 α -гидроксилазной и 20(α,β)-гидроксистероид-дегидрогеназной активностей в рекомбинантных дрожжах, трансформирующих стероиды // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2008. Т 7. С. 41-44.

ESTIMATION OF DRUGS INTERACTION WITH ENZYMES OF STEROID HORMONES BIOSYNTHESIS BY MOLECULAR DOCKING AND EXPERIMENTAL MODEL SYSTEM, BASED ON TRANSGENIC MICROORGANISMS

¹Faletrov Ya.V., ²Frolenkov K.A., ¹Rudaya E.V., ¹Sivopliasova A.V., ³Kostsin D.G.,
³Slobozhanina E.I., ¹Shkumatov V.M.

¹Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
Leningradskaya str., 14, 220030, Minsk, Belarus; E-mail: biopharm@bsu.by;

²RUE «Belmedpreparaty», Fabritsius str., 30, 220007, Minsk, Belarus;

³Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Science of Belarus,
Academicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Belarus

Interaction of levonorgestrel, danazol and mifepristone with cytochrome P450c17 – a key enzyme of steroid hormones biosynthesis – were studied using protein-ligand docking. It has been shown, that molecules of this drugs can localize close to heme of P450c17 and (partially) occupy substrate binding site. Localization of ethinyl moieties of the drugs pointed on little possibility of their activation by reactive oxo-iron intermediates in the active site of P450c17. Similarly, oxazole ring of danazole seemed to be no able to form bond between N-atom of the ring and iron of

P450c17 heme. Decreasing of progesterone 17 α -hydroxylation rate by the steroid drugs was shown in experiments *in vitro* with test-system, based on transgenic yeast *S.cerevisiae* YEp5117 α , expressing P450c17. Neither the drugs' metabolites, nor P450c17 inactivation were detected in the test-system, that is compatible with docking results. Sum of experimental data indicate, that affinity of the drugs to P450c17 decrease in the following row: levonorgestrel, danazol and mifepristone.

КИНЕТИКА В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Хейдоров В.П., Чалый Г.Ю., Титорович О.В.

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь,

E-mail: heidorov@mail.ru

Химическая кинетика находит все более широкое применение во многих областях знаний науки и практики, она глубоко проникает в биологию, биохимию, медицину, фармакологию, фармацевцию и др.

Использование результатов химической кинетики в анализе веществ основано на прямых измерениях скорости реакций и закономерностях физической и химической динамики процессов.

Кинетические методы определения веществ выгодно отличаются от других методов своей простотой и доступностью применяемой аппаратуры, селективностью с низким пределом обнаружения определяемых веществ, что делает эти методы особенно перспективными в анализе биологически активных веществ.

За последние 15-20 лет заметно возрос интерес в мировой практике к разработке кинетических методов определения веществ в медико-биологических объектах и сложных рецептурных смесях. Однако, такие исследования и кинетические разработки пока отсутствуют в отечественных публикациях и появляются единичные в российских журналах.

Данное сообщение продолжает наши исследования изучения кинетических закономерностей окислительного превращения биологически активных веществ и разработку их анализа в медико-фармацевтических объектах [1-5].

В качестве реагентов использовали окислители разной природы и были выбраны те, которые пригодны для проведения реакций в кинетическом режиме. Одним из таких веществ был выбран натрия гипохлорит, который синтезировали в лаборатории путем пропускания полученного газообразного хлора в охлажденный (от 0°C до -2°C) раствор натрия гидроксида.

Объектами исследования были различные биологически активные вещества, пиримидиновые и пуриновые азотистые основания, их нуклеозиды и нуклеотиды, ксантинпроизводные.

Нами получены интересные результаты в научном плане и практическом применении кинетических исследований производных пурина – ксантинов, которые являются ценными фармакологически активными лекарственными веществами, они много лет применяются в медицинской практике при различных патологиях. Экспериментальные исследования кинетики показали, что в одинаковой реакционной системе(смеси) при одинаковых условиях(рН, концентрации, температуре) скорость реакции окисления теofilлина превосходит скорость окисления кофеина в несколько десятков раз, хотя они являются очень близкими структурными аналогами и отличаются только на одну группу – на метильный радикал при азоте N₇ в имидазольном кольце гетероциклической пуриновой системы. Благодаря этому удивительному факту эти очень близкие структурные аналоги можно определять в присутствии друг друга без их разделения. При этом были разработаны

методики их определения. Рассчитаны кинетические и активационные параметры реакций: константы скорости, энтальпии и энтропии активации, энергия Гиббса.

Результаты, полученные в данной работе, послужат основой и моделью для дальнейших исследований кинетических закономерностей реакций других биологически активных веществ и разработки методов их анализа в исследуемых объектах.

В докладе будут проиллюстрированы экспериментальные результаты кинетики и механизма реакций (рисунки, графики, таблицы).

Литература:

1. Ершов Ю.А., Хейдоров В.П., Мушкамбаров Н.Н. Кинетика и термодинамика реакции N-хлорбензолсульфамида натрия с 1,3-диметилксантином // Кинетика и катализ. – М., 1989. - №1. – С. 38-43.
2. Хейдоров В.П., Ершов Ю.А., Поленов В.А. Кинетика и механизм реакции в системе теofilлин–хлорамин-тимол // Кинетика и катализ. – М., 1991. – Вып. 5. – Т.32. – С. 1067-1072.
3. Хейдоров В.П., Ершов Ю.А., Зябкина О.А. Кинетика реакции окисления пентоксила гипохлорит-ионами. //Журн. физ.химии. – 2006. – Т.80. - №3. – С.432-435.
4. Хейдоров В.П., Ершов Ю.А., Чалый Г.Ю. Математическое моделирование реакции окисления метилурацила //Межд. конф. «Математика. Компьютер. Образование». Москва-Пушино. – 22-27 января, 2007. – С.242.
5. Чалый Г.Ю., Титорович О.В., Хейдоров В.П. Кинетика окислительного превращения триметилксантина // Всеросс. научн. конф. «Химическая кинетика окислительных процессов. Окисление и антиокислительная стабилизация». - Уфа-2009.- С.69.

KINETICS IN THE ANALYSIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE MATERIALS

Heidorov V.P., Chaly G.Ju., Titorovich O.V.
Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

The kinetic researches of oxidative metamorphosis of biologically active materials purine`s derivatives and the possibility to use these received results in the analysis of the specified materials are presented in this work.

ВЛИЯНИЕ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА МЕКСИБЕЛ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИЗА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ФОНЕ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

¹Ходос О.А., ¹Гидранович Л.Г., ²Сачек М.М.

¹*Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск,
пр. Фрунзе, 27, E-mail: scider@mail.ru;*

²*Республиканский научно-практический центр медицинских технологий,
информатизации, управления и экономики здравоохранения, г. Минск, ул. П. Бровки, 7А,
E-mail: rnpemt@belcmt.by.*

Протеолитические ферменты ответственны за реализацию широкого спектра физиологических и патологических эффектов в центральной нервной системе. В головном мозге протеиназы участвуют в превращении неактивных пронеуропептидов в

соответствующие активные продукты, которые функционируют как нейромедиаторы и нейромодуляторы, принимают участие в продукции нейротрансмиттеров, играют ключевую роль в долговременной памяти, реализации аксонального транспорта, трансмембранной передаче сигнала [1]. Однако, протеолиз становится патологическим, когда нормальный баланс между активностью протеиназ и их ингибиторов нарушается [2]. Участие протеиназ в формировании синдрома отмены этанола остаются недостаточно изученными. Поэтому, выявление закономерностей изменения активности протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов в ткани головного мозга при отмене этанола является актуальным, а протеолитические ферменты ЦНС представляются новыми потенциально важными мишенями для лекарственных средств [2]. Препарат Мексигел (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат) отличается широким спектром фармакологической активности, так как является антигипоксическим, стресспротективным, ноотропным, противосудорожным препаратом, который также ингибирует свободно-радикальные процессы окисления липидов, оказывает модулирующее влияние на активность мембраносвязанных ферментов и ионных каналов, повышает резистентность организма к действию различных повреждающих факторов, в том числе интоксикациях этанолом, и обладает выраженным антиамнестическим, транквилизирующим и антиалкогольным действием [3].

Целью данной работы является изучение влияния отечественного препарата Мексигел на активность трипсиноподобных и их эндогенных ингибиторов в ткани головного мозга крыс на фоне отмены этанола.

Материалы и методы исследования. Опыты проводились на самцах крыс линии «Wistar», поставляемых из питомника «Рапполово» (Российская Федерация), средняя масса которых составляла 360 грамм. Животные содержались в стандартных условиях специализированного вивария ЦНИЛ УО «Витебский государственный медицинский университет» при естественном световом дне. Для экспериментов отбирали животных, предрасположенных к добровольному потреблению с использованием теста «этанолового наркоза» путем однократного внутрибрюшинного введения 25% раствора этанола в дозе 4,5 г/кг массы тела животного. Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводилась путем предоставления животным 15% раствора этанола *ad libitum* в качестве единственного источника питья в течение 29 недель, после чего его заменяли на водопроводную воду. Забой животных осуществляли декапитацией через 1, 3 и 7 суток после отмены этанола. Животные контрольной группы в течение всего эксперимента в качестве источника питья получали только водопроводную воду. Лекарственный препарат мексигел вводили в хвостовую вену животных в дозе 10 мг/кг массы животного. В результате были сформированы следующие экспериментальные группы: I – контрольная группа (интактные животные); II – животные, потреблявшие раствор этанола в течение 29 недель, забой которых осуществлялся через 1 (II-1), 3 (II-3) и 7 (II-7) суток после отмены этанола; III – животные, потреблявшие раствор этанола 29 недель, которым внутривенно вводили препарат мексигел в течение 1 (III-1), 3 (III-3) и 7 (III-7) суток; IV – животные, не подвергавшиеся алкоголизации, которым вводили мексигел в течение 1 (IV-1), 3 (IV-3) и 7 (IV-7) суток соответственно. Регулярно контролировали объем выпитого животными раствора этанола и воды, еженедельно осуществляли взвешивание крыс.

Для определения активности трипсиноподобных протеиназ и их эндогенных ингибиторов в качестве базовых методик использовались апробированные ранее методы, описанные Erlanger В. и др. [4], а также методика, предложенная Хватовым Т.А. и Беловой В.Б. [5]. Данные методики были разработаны для исследования протеолиза в сыворотке крови. Нами проведена адаптация, модификация и усовершенствование указанных методик для изучения активности протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов в экстрактах ткани головного мозга крыс. Концентрацию этанола в крови экспериментальных животных контролировали с помощью метода газовой хроматографии.

Обработку результатов проводили с помощью непараметрического метода сравнения независимых групп Краскела-Уоллиса (ANOVA по Краскелу-Уоллису) – обобщение метода Манна–Уитни для сравнения трех групп и более. При отклонении нулевой гипотезы принимали альтернативную гипотезу о различии групп и далее проводили парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна–Уитни, применяя поправку Бонферрони при оценке значения p .

Результаты и обсуждение. Исследования показали, отечественный препарат Мексигел нормализует активность трипсиноподобных протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга крыс после отмены этанола.

Без применения препарата Мексигел активность трипсиноподобных протеиназ увеличивалась по сравнению с контролем через 1 сутки после отмены этанола на 94,59 % ($p=0,0042$), тогда как через 3 и 7 суток она не отличалась от контрольных значений ($p=0,4750$, $p=0,1985$). В этих условиях активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в экстрактах больших полушарий головного мозга крыс уменьшалась по сравнению с контрольной группой через 1 сутки после отмены этанола на 20,55 % ($p=0,0027$), через 3 суток – на 23,32 % ($p=0,0042$), через 7 суток – на 25,69 % ($p=0,0027$).

При введении экспериментальным животным препарата Мексигел на фоне отмены этанола активность трипсиноподобных протеиназ в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга нормализовалась до контрольных значений, различия между контрольной и опытными группами не были статистически значимыми через 1, 3 и 7 суток ($p=0,1160$; $p=0,5677$; $p=0,0864$ соответственно). Использование данного препарата через 1, 3 и 7 суток отмены этанола стабилизирует активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ на уровне контрольных значений ($p=0,0864$; $p=0,0101$; $p=0,1531$), тогда как без фармакологической коррекции мексигелом указанный показатель был снижен. Применение лекарственного препарата Мексигел восстанавливало естественный физиологический протеиназо-ингибиторный баланс в ткани больших полушарий головного мозга крыс во все сроки отмены этанола, тогда как не оказывало влияния на указанные показатели у животных, не потреблявших раствор этанола. Данные результаты могут свидетельствовать о том, что отечественный препарат Мексигел способен снижать и корректировать активность трипсиноподобных протеиназ до уровня контроля в ткани больших полушарий головного мозга после отмены этанола.

Выводы:

1. Отмена этанола после хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель вызывает по сравнению с контролем увеличение активности трипсиноподобных протеиназ через 1 сутки на 94,59 % и снижение активности эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ через 1, 3 и 7 суток отмены на 20,55 %, 23,32 % и 25,69 % соответственно.

2. Препарат Мексигел нормализует активность трипсиноподобных протеиназ и их эндогенных ингибиторов в ткани больших полушарий головного мозга крыс до уровня контрольных значений во все сроки отмены этанола.

3. Мексигел не оказывает влияния на активность трипсиноподобных протеиназ и их эндогенных ингибиторов в ткани больших полушарий головного мозга животных, не подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации и отмене этанола.

Литература:

1. Lendeckel, U. Proteinases in the brain / U. Lendeckel, N. M. Hooper. USA: Springer Science. – 2005. – 393 p.
2. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases / A. Lukes [et al.] // Mol Neurobiol. – 1999. – Vol. 19, № 19. – P. 267 – 284.

3. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепама, парацетамола и их комбинаций / Т.А. Воронина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 4. – С 6 – 9.

4. Erlanger, B.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B.F Erlanger, N. Kokowsky, M. Cohen // Arch Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271-278.

5. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: Метод. Рекомендации. / Хватов В.Б., Белова Т.А. – М., 1981. – 27 с.

INFLUENCE OF MEXIBEL ON PROTEOLYSIS INTENSITY IN BRAIN TISSUE IN RATS AT WITHDRAWAL STATE AFTER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Khodos O.A., Hidranovich L.G., Sachek M.M.

Vitebsk state medical university, Belarus

ТАНДЕМНОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЗИНОПРИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНЫХ ИСПЫТАНИЙ

¹Хоменко А.И., ¹Матюлько А.В., ¹Гринцевич И.Б., ¹Повалищев В.Н., ²Болдова О.Г.

¹УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Минский район, пос. Лесной,
Беларусь, E-mail: dh.nal.by@mail.ru;

²Открытое Акционерное Общество «Борисовский завод медицинских препаратов», г.
Борисов, Беларусь, E-mail: borimed@borimed.com

Внедрение в производство и выход на рынок РБ многочисленных препаратов-дженериков предполагает испытание биологической эквивалентности, как одного из необходимых аспектов контроля их качества. Для этого проводятся фармакокинетические исследования, связанные с определением активного фармацевтического ингредиента и/или его метаболитов. Наиболее объективные результаты оценки биоэквивалентности можно получить при сравнительном определении фармакокинетических параметров *in vivo*. В случае, если точно определить активный ингредиент и/или его метаболиты невозможно, необходимо проведение сравнительных фармакодинамических исследований либо исследований *in vitro* [1].

Одним из представителей препаратов-дженериков, широко внедряемых на рынок РБ различными производителями, является ингибитор ангиотензин-превращающего фермента лизиноприл (N^2 -[(1S)-1-карбокси-3-фенилпропил]-L-лизил-L-пролин). Содержание лизиноприла в биологических жидкостях человека определяют титриметрическим и спектрофотометрическим методом анализа, а также ГХ и ВЭЖХ с различными типами детектирования: спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим. Наиболее чувствительным и селективным является методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, который позволяет детектировать низкие концентрации лизиноприла в плазме крови при его приеме в терапевтических дозах без необходимости проведения предколоночной дериватизации [2,3]. С целью проведения аналитического этапа биоэквивалентных испытаний дженерических препаратов лизиноприла перед лабораторией стояла задача разработки методики, позволяющей определять исследуемое вещество в низких диапазонах концентраций (от 0,5 нг).

Клинический этап биоэквивалентных испытаний лекарственного средства «Дироприл» (таблетки 10 мг, таблетки 5 мг производства ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (РБ)), проводили на базе 4-й городской клинической больницы (руководитель клинического этапа – профессор Кевра Михаил Константинович). Испытания проводились с участием 18 здоровых добровольцев, которые однократно приняли терапевтическую дозу препарата 10 мг. Отбор образцов крови для проведения аналитического этапа биоэквивалентных испытаний проводили в интервале времени 0,5 – 48 часов после приема препарата. Для определения содержания лизиноприла в плазме крови использовали разработанный в условиях УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» метод ВЭЖХ-МС/МС.

В исследуемые пробы плазмы крови вносили раствор внутреннего стандарта – эналаприлата (European pharmacopoeia standard BP), белки плазмы осаждали раствором хлористоводородной кислоты (марка «хч»), а исследуемые субстанции выделяли методом твердофазной экстракции на сорбционных патронах Oasis HLB 3 cc, 60 мг (Waters, США) и анализировали с использованием хромато-масс-спектрометра с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantum Access (Thermo Fisher Scientific, США), путем изократического элюирования с ионизацией анализируемых веществ методом электрораспыления при атмосферном давлении (ESI-MS/MS). Общее время анализа составляло 6 мин.

В разработанной методике количественного определения лизиноприла в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием были валидированы следующие аналитические характеристики: эффект матрицы для лизиноприла 93 %, для эналаприлата 93 %; диапазон применения методики испытаний составил 0,5 – 80 нг/мл; уравнение калибровочной зависимости имеет вид $y = kx$ и характеризуется следующими параметрами: $k = 0,04047$, $\varepsilon(k) = 0,65$ %, $r = 0,99996$; ПО – 0,02 нг/мл (экспериментально подтвержденное значение), 0,015 нг/мл (рассчитанное значение); величина смещения результата (B , %) по результатам анализа в разные дни ($n = 10$) – от -3,8 % до 7,3 %; повторяемость (S_r , %) в разные дни ($n = 10$) – от 4,7 % до 12,8 %; повторяемость (S_r , %) в один день ($n = 6$) – от 2,3 % до 9,0 %; степень извлечения (Rec , %) для лизиноприла – 93 % (0,5 нг/мл), 84 % (32 нг/мл), 81 % (80 нг/мл), усредненное значение по трем уровням концентраций – 86 %, для эналаприлата в рабочей концентрации (13,89 нг/мл) – 108 % ($n = 9$). Подтверждена внутрилабораторная воспроизводимость разработанной методики испытаний по персоналу и по времени. Доказана устойчивость (робастность) методики испытаний по параметрам воспроизводимости времен удерживания, площади внутреннего стандарта при рутинном анализе большого количества ($n > 1000$) испытуемых образцов на протяжении длительного времени (более 20 календарных дней).

Таким образом, разработанная и апробированная методика количественного определения лизиноприла в плазме крови человека после однократного приема внутрь малой дозы препарата (10 мг) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием удовлетворяет всем критериям приемлемости, изложенным в нормативных документах [4, 5].

В результате проведенных испытаний было показано, что фармакокинетические показатели тестируемых препаратов «Дироприл» таблетки 10 мг производства ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (РБ) эквивалентны таковым для референтного препарата «Диротон» таблетки 10 мг производства «Гедеон Рихтер» (Венгрия) в соответствии с критериями, установленными в ГФ Республики Беларусь (см. рис. 1).

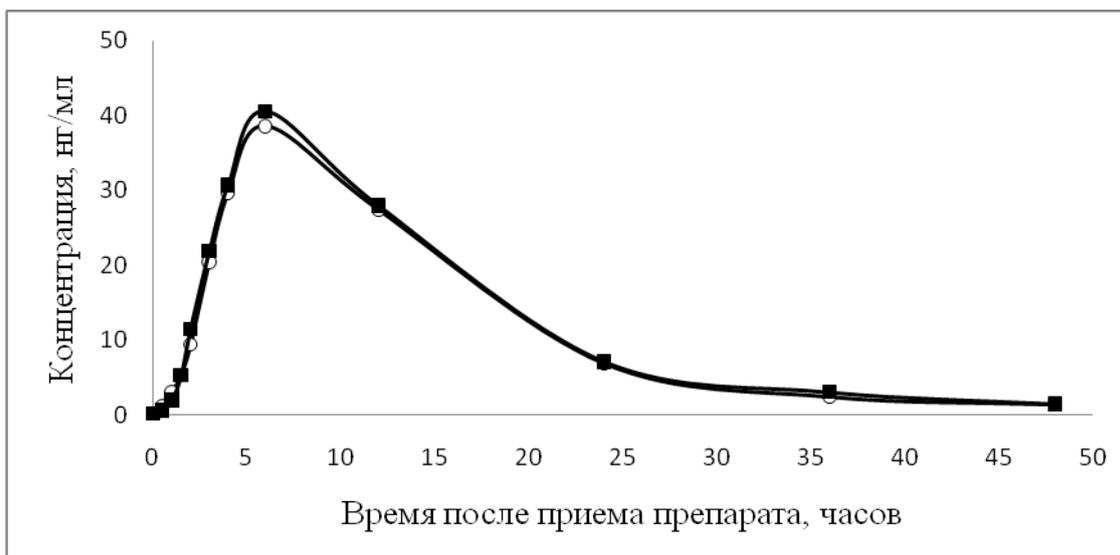


Рисунок 1. Фармакокинетические кривые ЛС «Дироприл» (испытуемый препарат, -o-) и ЛС «Диротон» (референтный препарат, -■-) после разового приема ЛС в дозировке 10 мг.

Из представленных фармакокинетических кривых следует, что уже после 0,5 часа после приема, препарат обнаруживается в системном кровотоке в концентрации порядка 1 – 2 нг/мл.

Время достижения максимальной концентрации (C_{max}) лизиноприла в крови и для испытуемого и референтного препарата составило 6 часов. Период полувыведения препарата $T_{1/2} = 16$ часов. Стоит обратить внимание на тот факт, что усредненная максимальная концентрация лизиноприла (C_{max}) составила для референтного препарата 40,6 нг/мл и 38,6 нг/мл для испытуемого. Различие между этими величинами для испытуемого и референтного препарата составляет 95,1 %, что соответствует критериям приемлемости (80% – 125%), изложенным в ГФ Республики Беларусь, и литературным данным [2, 3]. Начиная с десятого часа, отмечается постепенное снижение концентрации лизиноприла в плазме крови. К 48 часу эксперимента концентрация лизиноприла достигает 1 – 2 нг/мл.

Полученные результаты биоэквивалентных испытаний указывают на эквивалентность испытуемого генерического ЛС «Дироприл» производства ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (РБ) референтному ЛС «Диротон» производства «Гедеон Рихтер» (Венгрия). Фармакокинетические параметры испытуемого препарата полностью соответствуют таковым для референтного ЛС.

* Выражаем благодарность профессору Кевре Михаилу Константиновичу за помощь в проведении клинического этапа биоэквивалентных испытаний.

Литература:

1. Киселева Г. С. Биоэквивалентность и качество лекарственных средств // Провизор. — 1998. — № 4. — С. 43–44.
2. Sagirli O and Ersoy L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection // Journal of Chromatography B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2004. — № Sep 25; 809(1), — P. 159–165.
3. Padua Ana A.F., Barrientos-Astigarraga Rafael E., Rezende Vinicius M., Gustavo D. Mendes, De Nucci Gilberto. Lisinopril quantification in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography B. — 2004. — № 809, — P. 211–216.

4. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. — FDA. May 2001.

5. СТБ 1436-2004 «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний».

LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE QUANTIFICATION OF LISINOPRIL IN HUMAN PLASMA: METHOD VALIDATION AND ITS APPLICATION TO BIOEQUIVALENCE STUDY

¹Khomenko A., ¹Matsiulka A., ¹Hryntsevich I., ¹Povalishev V., ²Boldova O.

¹ «National antigoping laboratory», Minsk region, settlement of Lesnoy, Belarus,

E-mail: dh.nal.by@mail.ru;

² JSC "Borisovskiy Zavod Medicinskikh Preparatov", Borisov, Belarus,

E-mail: borimed@borimed.com

The bioequivalence of two lisinopril formulations by determining its plasma concentration was examined. Two groups of 18 healthy volunteers participated in this study. Each volunteer received a single dose of 10 mg reference lisinopril tablet (Diroton® by Gedeon Richter Ltd., Hungary) and a test tablet (Diropril by JSC "Borisovskiy Zavod Medicinskikh Preparatov", Belarus). The blood samples were taken, collected and frozen. The plasma lisinopril concentration was measured during the period of 0.5 - 48 h after the dose intake by a fully validated HPLC-MS/MS method. The obtained results showed that the method successfully met the accuracy and linearity requirements for lisinopril within a concentration range between 0.5 and 80 ng/mL. The maximum plasma drug concentration (C_{max}) and the time to reach C_{max} (T_{max}) were derived from the plasma concentration-time data. The mean maximum concentration (C_{max}) of the test and reference were found to be 38.6 ng/mL and 40.6 ng/mL respectively. T(1/2) and T_{max} values were also tested and the difference was not statistically significant (16h and 6h in both cases, respectively). The developed method showed the suitability for its intended use for the quantitative determination of lisinopril in human plasma.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ МЕРКАЗОЛИЛ-ИНДУЦИРОВАННОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Хомич Т. И., Колошина Н. В., Пронько П. С.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал,

230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: office@biochem.unibel.by

В организме у этанола существует много точек приложения. Это связано с его физико-химическими особенностями. Этанол способен смешиваться с водой в любых соотношениях. Так же легко растворяется он в липидах, беспрепятственно проходит через гемато-энцефалический и плацентарный барьеры. Именно взаимодействие этанола с гидрофобными участками липопротеидов, составляющих структурную основу мембран клеток, лежит в основе повреждающего действия на них этилового спирта. В связи с повышенным сродством этанола к липидам, при отравлении этиловым спиртом страдают, прежде всего органы, богатые ими. Исследования последних лет указывают на способность этанола индуцировать перекисное окисление липидов (ПОЛ), которое является одним из механизмов алкогольного повреждения тканей [1, 2].

Мозг является особенно чувствительным к активации ПОЛ, поскольку он потребляет большое количество кислорода, мембраны его богаты полиненасыщенными жирными кислотами. Образованные в клетках свободные радикалы удаляются системой антиоксидантной защиты. Активность ферментных систем антиоксидантной защиты и уровень низкомолекулярных скэвенджеров свободных радикалов в мозговой ткани сравнительно невысокие. Перекисное окисление липидов, а также окисление белков, вызывают изменение текучести мембран, их рецепторной функции и ионной проницаемости, что в свою очередь может привести к гибели нейронов. Токсические эффекты этанола на организм обусловлены не только избыточным образованием свободнорадикальных продуктов, но и непосредственным действием этанола на компоненты антиоксидантной системы, что приводит к ее истощению и изменению интенсивности ПОЛ [3].

Важная роль в регуляции метаболизма этанола и развитии процессов свободнорадикального окисления принадлежит гормонам щитовидной железы. Было отмечено, что избыточное содержание тиреоидных гормонов приводит к развитию гиперметаболического состояния в организме и увеличению выработки свободных радикалов, а также снижению активности некоторых антиоксидантных ферментов. При тиреоидэктомии или химической блокаде щитовидной железы наблюдались обратные изменения [4, 5].

Целью настоящей работы явилось изучение активности ПОЛ и антиоксидантной системы в мозжечке и больших полушариях головного мозга гипотиреоидных крыс подвергнутых острой алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. В эксперименте использованы крысы-самцы линии Wistar массой 140-160 г, которые содержались на сбалансированном рационе вивария. В опыте было 6 групп животных. Контролем служила группа интактных животных, получавших воду. Гипофункцию щитовидной железы моделировали путем внутрижелудочного (в/ж) введения антитиреоидного препарата – мерказолила в дозах 5 и 20 мг/кг (2 раза в сутки) с целью создания различного по степени тяжести гипотиреоза. После 14 дней введения препарата группы гипотиреоидных животных и группа животных с эутиреоидным статусом подвергались острой алкогольной интоксикации (6 г/кг, 30%-ного раствор этанола (V/V), в/ж) за 4 часа до декапитации. Части крыс, получившей мерказолил, вводили воду (контроль эффекта мерказолила). В сыворотке крови животных определяли содержание гормонов щитовидной железы – общий тироксин (T_4) и общий трийодтиронин (T_3) методом радиоиммунологического анализа при помощи тест-систем ИБОХ (Беларусь). Интенсивность ПОЛ (уровень малонового диальдегида – МДА) оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, содержание восстановленного глутатиона (GSH) – с использованием реактива Элмана, активность каталазы – по скорости разложения перекиси водорода, активность супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) – по окислению кверцетина, глутатионпероксидазы (ГПО) – по скорости окисления глутатиона в присутствии гидроперекиси трет-бутила, глутатионредуктазы (ГР) – по количеству использованного НАДФН на восстановление окисленной формы глутатиона. Белок определяли по методу Лоури [6]. Полученные результаты статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Тиреоидный статус организма экспериментальных животных оценивали по уровню тиреоидных гормонов в плазме крови. Было отмечено воздействие острой алкогольной интоксикации на щитовидную железу, которое выразилось в снижении концентрации T_3 и T_4 в крови эутиреоидных животных и животных с экспериментальным гипотиреозом. Введение этанола вызвало более глубокое снижение уровня тиреоидных гормонов у крыс, получавших мерказолил. Полученные данные могут указывать на суммацию эффектов мерказолила и этанола в результате изменения

секреторной способности клеток щитовидной железы и нарушения периферических механизмов биотрансформации тиреоидных гормонов в печени.

Степень окислительного повреждения и изменения системы антиоксидантной защиты исследовались в мозжечке и больших полушариях головного мозга крыс, поскольку наши предварительные исследования и литературные данные указывают на более высокую чувствительность этих отделов мозга к этанол-индуцированному повреждению. Введение этанола привело к достоверному снижению уровня восстановленного глутатиона в больших полушариях мозга: в группе эутиреоидных крыс содержание ГSH составило $0,71 \pm 0,03$ мкмоль/г ткани, после однократного введения этанола – $0,59 \pm 0,02$ мкмоль/г ткани ($p < 0,02$). В больших полушариях головного мозга животных, которые получали в течение 14 дней мерказолил, содержание ГSH находилось в пределах значений контрольной группы. Через 4 ч после однократного введения этанола в дозе 6,0 г/кг массы тела крыс содержание его достоверно не изменилось. В мозжечке эутиреоидных и гипотиреоидных животных, получавших этанол, существенных изменений уровня восстановленного глутатиона не выявлено.

Введение мерказолила животным в дозах 5 и 20 мг/кг массы тела не влияло на активность каталазы: показатели ее были на уровне значений группы эутиреоидных крыс. В цитозоле больших полушарий и мозжечка, как у эутиреоидных, так и у гипотиреоидных крыс после острой алкогольной интоксикации было обнаружено достоверное повышение активности фермента (на 80-95%) по сравнению с группой животных, которые не получали этанол. Каталаза, кроме своей основной функции разложения перекиси водорода, может проявлять пероксидазную активность в отношении некоторых соединений, к которым относится этанол. В ткани мозга, где активность алкогольдегидрогеназы низкая, каталаза может быть основным ферментом, катализирующим окисление этанола, чем, вероятно, можно объяснить резкое повышение ее активности. Активность глутатионпероксидазы практически не изменилась в цитозоле исследуемых отделов мозга. Повышение активности глутатионредуктазы в больших полушариях и мозжечке после введения этанола является, по всей вероятности, компенсаторным механизмом для регуляции уровня эндогенного глутатиона при этанол-индуцированном окислительном стрессе. Следует отметить, что введение мерказолила способствовало более выраженному повышению активности ГР у животных, получавших этанол. После введения этанола в больших полушариях и мозжечке эутиреоидных крыс не выявлено изменений активности Cu,Zn-СОД. В больших полушариях мозга животных, получавших мерказолил в дозе 20 мг/кг, обнаружено повышение активности фермента на 23%. После алкогольной интоксикации активность СОД у животных аналогичной группы не изменилась, но была выше на 29% по сравнению с контрольной группой. В мозжечке экспериментальных животных, которым вводили 5 и 20 мг/кг мерказолила, было обнаружено снижение активности СОД на 18 и 21% соответственно. Введение этанола привело к незначительному повышению активности фермента в мозжечке животных, однако эти изменения не отличались от данных контрольной группы животных, получавших этанол.

При однократном введении высокой дозы этанола контрольным и гипотиреоидным животным в больших полушариях и мозжечке были обнаружены недостоверные изменения уровня продуктов перекисного окисления липидов, определяемых как МДА. В исследуемых отделах мозга при индукции ПОЛ в гомогенатах в опытах *in vitro* комплексом аскорбат/ Fe^{2+} наблюдалась активация перекисного процесса после введения этанола, как у эутиреоидных, так и у гипотиреоидных крыс. Активация стимулируемого аскорбатом ПОЛ может быть связана с повышением уровня свободного железа в цитозоле клеток мозга под действием этанола, что приводит к нарушению соотношения Fe^{2+}/Fe^{3+} , которое является критическим фактором при инициации перекисного окисления.

Заклучение. Выявленные изменения в активности ферментов антиоксидантной защиты и уровня основного компонента неферментативного звена – глутатиона в исследуемых отделах головного мозга крыс с различным статусом тиреоидных гормонов при однократной нагрузке этанолом позволяют предположить, что мозг гипотиреоидных животных в меньшей степени, чем мозг эутиреоидных животных, подвержен алкогольному повреждению.

Литература:

1. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants / A. Mansouri [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – Vol. 298, № 2. – P. 737–743.

2. Ethanol-induced injury in rat primary cortical astrocytes involves oxidative stress: effect of idebenone / C. Muscoli [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2002. – Vol. 329, № 1. – P. 21–24.

3. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions / S.K. Reddy [et al.] // *Neurotoxicology.* – 1999. – Vol. 20, № 6. – P. 977–897.

4. Mechanism of the alcohol cyclic pattern: role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis / J. Li [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, № 1. – P. 118–125.

5. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments / S.O. Rahaman [et al.] // *Neurosci. Res.* – 2001. – Vol. 40, № 3. – P. 273–279.

6. Хомич Т. И., Пронько П. С. Влияние N-ацетилцистеина и липоевой кислоты на антиоксидантный статус печени крыс при синдроме отмены этанола *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* 2009. № 1. С. 66-69

EFFECT OF ACUTE ALCOHOL INTOXICATION ON THE ACTIVITY OF THE RAT BRAIN ANTIOXIDANT SYSTEM DURING METHIMAZOL –INDUCED HYPOTHYROIDITIS

Khomich T.I., Koloshina N.V., Pronko P.S.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus

We studied the sensitivity to lipid peroxidation of the cerebellum and large hemispheres in the brain of euthyroid and hypothyroid rats with acute alcohol intoxication produced by single intragastric ethanol administration at a dose of 6 g/kg body weight (hypothyroiditis was provoked by administering methimazol at a dose of 5 and 20 mg/kg). This resulted in an inhibitory ethanol effect on the thyroid function. Alterations in antioxidant protection enzymes and glutathione level in the brain regions of rats with varying status of thyroid hormones were found after a single ethanol load. The results obtained suggest that the brain of hypothyroid rats is less subjected to alcohol injury as compared to that of euthyroid animals.

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОГО ИММОБИЛИЗОВАННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ДЛЯ СИНТЕЗА КРЕАТИНФОСФАТА

¹Чернявский Е.А., ¹Лесникович Ю.А., ¹Стреха И.С., ²Сенчук В.В., ¹Шкуматов В.М.

¹Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», 220030,
ул. Ленинградская, 14, г. Минск, E-mail: biopharm@bsu.by;

²Белорусско-голландское совместное предприятие «Фармлэнд», 220053, ул. Червякова,
46, г. Минск, Беларусь, E-mail: pharmland@belsonet.net

Креатинфосфат выполняет ключевую роль в энергетическом обеспечении мышечного сокращения. В настоящее время в арсенале современных эффективных кардиопротекторных средств, улучшающих метаболизм миокарда, имеется единственный лекарственный препарат – Неотон производства фирмы «Alpha Wasserman» (Италия). Многочисленные клинические испытания препарата и большой опыт его применения в практической кардиологии подтверждают эффективное кардиопротекторное действие. Креатинфосфат тормозит процесс деструкции сарколеммы ишемизированных кардиомиоцитов и миофибрилл, уменьшает размер зоны некроза и ишемии, обеспечивает внутриклеточный транспорт энергии, оказывает положительное воздействие на метаболизм миокарда и микроциркуляцию. При ишемии и постишемической реперфузии креатинфосфат демонстрирует антиаритмический эффект посредством уменьшения эктопической активности желудочков при сохранении физиологической функции клеток волокон Пуркинье.

Широкое распространение креатинфосфата в терапии заболеваний сердца ограничивает монополизация рынка фармацевтической субстанции, лекарственной формы и, как следствие, высокой стоимостью препарата Неотон. В настоящее время субстанцию креатинфосфата получают из природных источников и методами химического синтеза. Методы экстракции и очистки из природного сырья имеют ряд недостатков – варьирование содержания креатинфосфата в сырье, нестабильность креатинфосфата в растворах, большое количество стадий и др. Химический синтез включает использование активных и токсичных реагентов, а также дорогостоящих полупродуктов. Альтернативным решением является использование биотехнологических приемов для решения задач производства субстанции креатинфосфата. В этом отношении представляется наиболее перспективным применение биохимических технологий синтеза с использованием высокоэффективных, высокоспецифичных и стабильных иммобилизованных ферментов для проведения контролируемой реакции получения креатинфосфата.

Цель работы заключалась в получении активной иммобилизованной формы креатинкиназы (Е.С. 2.7.3.2, креатин N-фосфотрансфераза, фосфокреатин фосфокиназа), катализирующей реакцию обратимого переноса фосфорильной группы между АТФ и креатином с образованием АДФ и креатинфосфата.

В работе использовали ферментные препараты креатинкиназы с чистотой не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидной геле и специфической ферментативной активностью 150 -180 мкмоль АТФ/мин на 1 мг белка в реакции образования креатинфосфата. Концентрацию свободной креатинкиназы измеряли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ 8.96 и относительной молекулярной массы фермента 82000. Концентрацию иммобилизованной

креатинкиназы измеряли модифицированным методом Лоури. Специфическую ферментативную активность креатинкиназы измеряли в реакции образования креатинфосфата с использованием сопряженной ферментативной системы, включающей пируваткиназу и лактатдегидрогеназу. Реакцию проводили при 30°C в 0,1 М глицин-NaOH буфере, рН 9,0, содержащем 40 мМ креатина, 4 мМ АТФ, 5 мМ магния сульфата, 1 мМ фосфоенолпирувата, 150 мкМ NADH, и по 25 международных единиц пируваткиназы и лактатдегидрогеназы в конечном объеме реакционной среды 3 мл. Реакцию запускали внесением ферментного препарата. При изучении иммобилизованной креатинкиназы реакционную смесь постоянно перемешивали. Каталитические параметры свободной креатинкиназы и иммобилизованной креатинкиназы для ее субстратов (креатин и MgATP) получали в координатах Лайнуивера-Берка из зависимостей активности фермента от концентрации одного из субстратов при нескольких фиксированных концентрациях другого субстрата. Во всех случаях концентрацию Mg^{2+} поддерживали на уровне 1 мМ путем добавления соответствующих количеств сульфата магния.

Осуществлена иммобилизация креатинкиназы через свободные эpsilon-аминогруппы аргинина и лизина на бромциан-сефарозе, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот на аминогексил-сефарозе и остатки гистидина молекулы белка на бромацетил-сефарозе. Иммобилизация креатинкиназы на бромциан-сефарозу приводила к быстрому образованию нерастворимого конъюгата с высокой концентрацией иммобилизованного белка, достигающей 350 нмоль на 1 мл геля. Реакция свободных карбоксильных групп креатинкиназы с аминогексил-сефарозой в присутствии водорастворимых карбодиимидов сопровождалась низкой степенью иммобилизации фермента (примерно 5 нмоль на 1 мл геля). Низкий уровень иммобилизации вероятнее всего связан как со стерическими затруднениями, так и низкой концентрацией нуклеофильного агента (первичных аминогрупп аминогексил-сефарозы). В свою очередь алкилирование бромацетил-сефарозой приводила к образованию конъюгата с концентрацией 30 нмоль креатинкиназы на 1 мл геля. Значительно меньшее значение концентрации креатинкиназы по сравнению с иммобилизацией на бромциан-сефарозе свидетельствовало о плохой доступности остатков гистидина и метионина по сравнению с остатками лизина в молекуле креатинкиназы. Используя модификацию свободных карбоксильных групп гистамином, можно добиться обогащения белка имидазольными группами, которые будут более доступны для связывания с бромацетил-сефарозой, чем остатки гистидина и метионина в молекуле нативного белка. Активация карбодиимидом карбоксильных групп может вызывать межмолекулярные сшивки креатинкиназы с образованием олигомерных форм белка. Однако, как показали данные гель-электрофореза в денатурирующих условиях, при использовании высоких концентраций нуклеофильного агента (гистамина), этого образования высокомолекулярных агрегатов практически не наблюдалось. Связывание гистамин-модифицированной креатинкиназы с бромацетил-сефарозой позволило получить сорбент с высокой концентрацией иммобилизованного лиганда (300 нмоль на 1 мл геля сефарозы), немного уступающей значению для связывания нативного белка с бромциан-сефарозой (350 нмоль на 1 мл геля сефарозы).

Дальнейшая работа была направлена на изучение активности иммобилизованной на бромацетил-сефарозе креатинкиназы. Установлено, что внесение 0,1 М ацетата в реакционную среду приводило к увеличению ферментативной активности иммобилизованной креатинкиназы в 1,7 раза. Вместе с тем, каталитическая активность свободной креатинкиназы увеличивалась лишь на 10%. Измерение активности креатинкиназы при различных значениях рН показало, что как свободная, так и иммобилизованная креатинкиназа проявляли высокую активность в диапазоне рН 8,0 – 9,0, которая снижалась на 25 – 30% при смещении рН реакционной среды на 1 единицу как в кислую, так и в щелочную стороны. Определены значения каталитических параметров

(V_{max} , K_m , K_s) для иммобилизованного и свободного препарата креатинкиназы. Полученные данные свидетельствовали о том, что иммобилизованная креатинкиназа сохраняла достаточно высокую эффективность каталитического превращения как креатина, так и MgATP.

Изучена инактивация препаратов креатинкиназы в зависимости от времени инкубации фермента (0 – 50 мин) при 45°C в 0,1 М глицин/NaOH буфере при pH 8,5, и от концентрации гуанидин гидрохлорида (0 – 1,0 М). Установлено, что константы скорости первого порядка термоинактивации свободной креатинкиназы и иммобилизованного фермента равны 0,032 и 0,021 мин⁻¹. В свою очередь концентрации гуанидинхлорида, которые вызывали 50%-ную инактивации ферментных препаратов были равны 0,54 М и 0,65 М для свободной и иммобилизованной креатинкиназы, соответственно.

Таким образом, проведен сравнительный анализ различных методов иммобилизации креатинкиназы. Установлено, что наибольшая концентрация лиганда достигалась при связывании нативного белка с бромциан-сефарозой. Иммобилизованная креатинкиназа проявляла высокую активность в диапазоне pH 8,0 – 9,0, и сохраняла достаточно высокую эффективность каталитического превращения субстратов. Показано, что ацетат увеличивал ферментативную активность иммобилизованной креатинкиназы в 1,7 раза, в то время как для свободной креатинкиназы увеличение было незначительно. Данные температурной и химической инактивации свидетельствовали об увеличении стабильности креатинкиназы после иммобилизации.

PREPARATION OF STABLE IMMOBILIZED BIOCATALYST FOR CREATINPHOSPHATE SYNTHESIS

¹Cherniavsky E.A., ¹Lesnikovich J.A., ¹Strakha I.S., ²Senchuk V.V., ¹Shkumatov V.M.

¹*Institute of Physico-Chemical Problems, Belarussian State University,*

Leningradskaya St 14, Minsk, 220050, Belarus, E-mail: biopharm@bsu.by;

²*Belarusian-Dutch joint venture PharmLand LLC, Chervyakova str., 46, Minsk, 220053, Belarus, E-mail: pharmland@belsonet.net*

The comparative analysis of different methods of the creatine kinase immobilization was carried out. It is established that the greatest concentration of ligand was reached at the binding of native protein with cyanogen bromide-Sepharose. Immobilized creatine kinase displayed the high activity in the range of pH 8,0 - 9,0, and maintained the sufficiently high efficiency of the catalytic transformation of substrates. It is shown that acetate increased the enzymatic activity of immobilized creatine kinase to 1,7-fold, while for free creatine kinase an increase was insignificant. Data of temperature and chemical inactivation showed that the stability of creatine kinase increased after immobilization.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-АЦЕТИЛ-L-КАРНИТИНА МЕТОДОМ ОБРАТНО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

Шабуня П.С., Чернова Т.А., Курман П.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by

В последние десятилетия активно изучается фармакологическое применение при различных заболеваниях такого естественного метаболита как N-ацетил-L-карнитин. В

организме человека N-ацетил-L-карнитин синтезируется в митохондриях из карнитина и ацетил-CoA с помощью карнитин-ацетилтрансферазы. При участии ацетил-транслоказы N-ацетил-L-карнитин транспортируется через внутреннюю мембрану, затем диффундирует через внешнюю мембрану митохондрии в цитоплазму, где выступает источником ацетильных групп для цитоплазматических белков и ацетилхолина. Ацетил-карнитин легко преодолевает гемато-энцефалический барьер и оказывает положительный эффект при таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера, депрессия, церебрально-сосудистая деменция, ВИЧ и некоторых видах невропатий [1]. N-ацетил-L-карнитин в настоящее время производится и продается в качестве биологически активной добавки (БАД), рекомендуемой для замедления старения клеток мозга, повышения умственной работоспособности и увеличения выносливости во время физической активности. При этом существуют как однокомпонентные БАД, содержащие в качестве действующего вещества только N-ацетил-L-карнитин, так и БАД, в состав которых помимо N-ацетил-L-карнитина входят и другие биологически активные вещества (например, витамины, экстракты растений, минералы) [2, 3]. При производстве фармацевтических продуктов необходимо определение количественного содержания вышеназванного активного соединения в исходных субстанциях и в конечных продуктах простым, но в то же время надежным и современным методом.

Существует большое количество разнообразных методов количественного анализа содержания N-ацетил-L-карнитина. Среди них, например, радиоизотопный метод [3], метод газовой хроматографии с предварительной дериватизацией ацилкарнитинов до циклических летучих лактонов, капиллярный электрофорез [4]. Для анализа N-ацетил-L-карнитина и других ацилкарнитинов широко используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными видами детекторов (спектрофотометрический, флуоресцентный или масс-селективный). Эти методы отличаются высокой чувствительностью и точностью, однако требуют наличия специфических дериватирующих реактивов и дорогостоящего оборудования [4]. Для рутинного анализа высоких концентраций N-ацетил-L-карнитина в субстанциях и конечных продуктах нами был предложен и апробирован метод обратно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором и использованием в подвижной фазе в качестве ион-парного реагента анионного поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия.

Методы исследования. Раствор стандарта N-ацетил-L-карнитина (A6706 Sigma) в концентрации 4 мг/мл готовили в деионизованной воде. Из этого раствора путем разбавления тем же растворителем были получены калибровочные растворы в концентрациях 0,2; 0,4; 0,8 и 2 мг/мл. Раствор анализируемых образцов (например, субстанция N-ацетил-L-карнитина или содержимое капсул БАД) готовили в концентрациях примерно 1 мг/мл в пересчете на заявленное содержание N-ацетил-L-карнитина. Аликвоты растворов перед хроматографированием фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. В качестве подвижных фаз были использованы: фаза А - 5мМ раствор додецилсульфата натрия в воде, рН 2,5 (доводится ортофосфорной кислотой); фаза В - 100% ацетонитрил. Анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 с диодноматричным детектором при следующих условиях: колонка Agilent Zorbax SB-C18 размером 250 x 4,6 мм, зерно 3,5 мкм; температура колонки +25°C; скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин; детектирование при длине волны 210 нм; объем вводимой пробы - 20 мкл. Изменение состава подвижной фазы происходило по следующей схеме: линейный градиент от 25% до 40% ацетонитрила в подвижной фазе А за 5 минут, затем изократический режим при 40 % ацетонитрила в подвижной фазе А в течение следующих 10 минут.

Результаты. В ходе разработки методики были опробованы подвижные фазы с различным содержанием додецилсульфата натрия (от 1 мкМ до 5мМ) и ацетонитрила, а также различные режимы элюирования. В итоге наилучшее разделение и форма пика

(коэффициент асимметрии не превышал 2) были получены при условиях, представленных в разделе «методы исследования». Ориентировочное время удерживания для N-ацетил-L-карнитина составило $10,9 \pm 0,5$ мин. Калибровочные кривые для растворов ацетилкарнитина показывали хорошую линейность в диапазоне концентраций 0,2 – 2 мг/мл (коэффициент корреляции составил 0,999).

Проведенный анализ модельных смесей, содержащих N-ацетил-L-карнитин и необходимые вспомогательные вещества подтвердил возможность применения разработанного метода ВЭЖХ с целью количественного определения этой субстанции в фармацевтических препаратах. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Статистическая обработка результатов определения N-ацетил-L-карнитина в модельных смесях методом ВЭЖХ

Количество N-ацетил-L-карнитина в модельной смеси, мг/капс.		Точность определения (относительное стандартное отклонение, RSD, %)	Правильность, (ассигасу, %)
внесено	определено		
215,0	213,1	1,2	99
140,0	137,2	1,4	98

Для разработанного метода была показана специфичность и избирательность при количественном анализе содержания N-ацетил-L-карнитина в 3-х компонентной БАД, содержащей N-ацетил-L-карнитин, экстракт гинкго, липоевую кислоту и необходимые вспомогательные вещества и в 2-х компонентной БАД, содержащей N-ацетил-L-карнитин, инозин и необходимые вспомогательные вещества.

Заключение. Разработан и апробирован простой и удобный метод ВЭЖХ с использованием спектрофотометрического детектора и додецилсульфата натрия в качестве ион-парного реагента для количественного определения N-ацетил-L-карнитина в фармсубстанциях и конечных продуктах фармацевтического производства.

Литература:

1. Acetyl-L-Carnitine Monograph // *Alternative Medicine Rev.* – 2010. – Vol. 15, № 1. – P. 76-82.
2. Swanson Health Products [Electronic resource] / – USA, 2010. – Mode of access: <http://www.swansonvitamins.com> – Date of access: 22.09.2010.
3. Интернет-портал ООО «ПИК-ФАРМА» [Электронный ресурс] / – Москва, 2006. – Режим доступа: <http://www.pikfarma.ru/products/Carnisetin.html> – Дата доступа: 22.09.2010.
4. Vernez L. Analysis of carnitine and acylcarnitines in biological fluids and application to a clinical study: inauguraldissertation zur Doktors der Philosophie / Basel, Switzerland, 2005. – 152 p.

QUANTIFICATION OF N-ACETYL-L-CARNITINE BY REVERSED-PHASE HPLC

Shabunya P.S., Chernova T.A., Kurman P.V.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by

Simple and easy-to-use reversed-phase HPLC method with UV-Vis detector and sodium dodecyl sulfate as ion-pair reagent was developed and tested for quantification of N-acetyl-L-carnitine in pharmaceutical substances and products of pharmaceutical industry.

ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКИЙ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИОФЛАВОНОИДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Шилов В.В., ¹Красненкова Т.П., ¹Шафрановская Е. М., ¹Кузуб А.Ю.,
¹Кардаш О.Ф., ²Булгак А.Г.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск,
ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: farmacia@it.org.by;

²ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология»
220036, г. Минск, Республика Беларусь, ул. Р. Люксембург, 110

Комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений, в основе которых лежит инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия, в настоящее время объединяется под названием метаболического синдрома (МС). Степень выраженности нарушений углеводного обмена при МС колеблется от минимальной (нарушенные гликемия натощак и толерантность к глюкозе (НТГ) до развития сахарного диабета 2 типа. Выделение данного синдрома обусловлено повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Улучшение чувствительности к инсулину и уменьшение хронической гиперинсулинемии, а также коррекция гиперлипидемии должны обязательно проводиться у пациентов с МС, так как способны предотвратить развитие осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Следовательно, для терапии данного синдрома необходимо разрабатывать средства, влияющие на его основные патогенетические механизмы. Такими средствами могут стать биофлавоноиды. Флавоноиды широко распространены в растительном мире. Их содержание в растениях различно: в среднем 0,5-5%, иногда достигает 20%. Биологическая роль РФ заключается в участии в окислительно-восстановительных процессах, предохранении растения от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Многие флавоноиды обладают Р-витаминной активностью, уменьшают хрупкость кровеносных капилляров, усиливают действие аскорбиновой кислоты, оказывают седативное действие, а также используются как противовоспалительные, противоязвенные и противоопухолевые средства. Некоторые РФ обладают кровоостанавливающими свойствами и являются хорошими желчегонными средствами [1].

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния флавоноидов, экстрагированных из растений семейств *Vitaceae*, *Zingiberaceae* и *Polygonaceae*, на углеводный и липидный обмены веществ в условиях эксперимента.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Wistar (масса 210-250 г, n=48), рандомизированных на 8 групп. Крысы групп 1, 2, 3, 4 имели свободный доступ к питью (10% раствор фруктозы) и высококалорийной пище [2]. Крысам 2-, 3- и 4-й групп вводился р.о. раствор РФ в дозах 20, 70, 200 мг/кг, соответственно, 5 дней в неделю в течение 4 недель, животным 1-й группы (контроль) вводили раствор крахмала в эквивалентном объеме.

Особь 5-, 6-, 7-, 8-й групп получали стандартное питание. Особям 6- и 7-й экспериментальных групп в течение 30 дней р.о. вводился РФ в дозах 20 мг/кг и 70 мг/кг,

соответственно. По окончании указанного срока введения РФ у крыс групп 5, 6 и 7 моделировали состояние острой гиперхолестеринемии введением раствора твин-80 из расчета 200мг/100г массы тела [3]. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме в соответствии с действующими нормами содержания экспериментальных животных.

Статистическая обработка данных выполнялась методами однофакторного анализа ANOVA, сравнение между группами осуществлялось по методу Фишера, данные в таблицах представлены как среднее значение±стандартное отклонение ($\bar{x} \pm S\bar{x}$).

Результаты исследования. Выявлено, что у животных группы 3, содержащихся на высококалорийной диете, при внутрижелудочном введении РФ в дозе 70 мг/кг в течение 1 месяца, массы тела была на 11% ($P<0,05$) ниже по сравнению с группой плацебо-контроля (табл. 1). Таким образом, РФ в дозе 70 мг/кг оказывает корректирующее действие на обмен веществ, препятствуя увеличению массы тела у животных, получающих высококалорийную диету и питье с фруктозой (10%).

Таблица 1 – Относительная масса тела, относительный коэффициент массы печени и уровень глюкозы у самцов крыс 1, 2, 3, 4 и 8 экспериментальных групп

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 8
	Контроль-плацебо на высококалорийной диете (n=6)	РФ 20 мг/ кг (n=6)	РФ 70 мг/ кг (n=6)	РФ 200 мг/ кг (n=6)	Контроль на стандартном питании (n=6)
Масса тела по отношению к исходным значениям, %	160±20,3	150±18	142,1±6,5*	160,4±12,1	140,0±8
ОКМ печени, кг ×10 ⁻³ /кг	44±8	41±3,4	43±4,1	40±5*	35,4±2,0
Глюкоза, мкМ/л	8,9±1,6	7,4±0,8*	7,3±0,8*	6,8±1,2***	6,4±1,0

Примечание: различия по сравнению с контролем *- $P<0,05$, ***- $P<0,01$

У животных, содержащихся на высококалорийной диете, было выявлено образование жировых инфильтратов и увеличение массы печени. ОКМ печени у самцов-крыс группы 8, содержащихся на стандартной диете, в норме составляет 35,4±2,0 кг×10⁻³/кг, тогда как в группе 1 этот показатель был значительно выше - 44±8, кг×10⁻³/кг. При введении РФ в дозе 200 мг/кг у животных 4-й группы не наблюдалось прироста относительного коэффициента массы печени; значение этого показателя, в среднем, на 10% ($P<0,05$) меньше, чем у животных 1-й группы (плацебо).

Следует отметить, что в этих экспериментальных условиях у животных, которым вводили РФ во всех исследуемых дозах, уровень глюкозы в крови достоверно ниже, чем у животных контрольной группы 1. При введении РФ в дозах 20 мг/кг и 70 мг/кг уровень глюкозы был ниже, чем в контроле на 16% ($P<0,05$), а при более высокой дозе препарата (группа 4) - на 24% ($P<0,01$). Таким образом, при потреблении продуктов с высоким содержанием жира и сахара РФ оказывают гипогликемическое действие.

У животных, которым вводили р.о. РФ в дозе 20 мг/кг и 70 мг/кг в течение 1 месяца и по окончании этого срока моделировали острую гиперхолестеринемию введением твин-80, уровень холестерина был достоверно ниже на 16,6%, ($P<0,02$) и 15,5% ($P<0,05$), соответственно, по сравнению к величиной этого показателя контрольных животных группы

5. Достоверного изменения концентрации триглицеридов в крови в этой экспериментальной модели обнаружено не было.

Таблица 2 – Показатели биохимического анализа крови крыс-самцов линии Wistar 5, 6, 7 и 8 групп

Показатели	Группа 5	Группа 6	Группа 7	Группа 8
	Контроль-плацебо с введением твин-80 (n=6)	РФ 20 мг/ кг (n=6)	РФ 70 мг/ кг (n=6)	Контроль без введения твин-80 (n=6)
Холестерин, мкМ/л	1,87±0,16	1,56±0,22**	1,58±0,22*	1,44±0,15
Триглицериды, мкМ/л	1,37±0,39	1,41±0,40	1,29±0,39	1,12±0,40

Примечание: различия по сравнению с контролем *- P<0,05;**- P<0,02

Данные, опубликованные в литературе, свидетельствуют, что флавононы и изофлавоноиды, полученные из растений семейств бобовых обладают выраженными гиполипидемическими свойствами [4]. В данной работе показан гипохолестеринемический эффект РФ из растений семейств *Vitaceae*, *Zingiberaceae* и *Polygonaceae*. Поскольку выделение холестерина из организма определяют, прежде всего, процессы окисления его в желчные кислоты, механизм гиполипидемического действия РФ, который связан с ускорением синтеза желчных кислот, является новым фармакологическим подходом к лечению гиперхолестеринемии.

Перспективным является использование РФ в комплексной терапии сахарного диабета и метаболического синдрома, так как показано, что глицирам и карбеноксалон, влияя на гормоны, ликвидируют инсулинорезистентность [5].

Заключение. Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что комплекс флавоноидов, экстрагированных из растений семейств *Vitaceae*, *Zingiberaceae* и *Polygonaceae*, может быть использован в качестве основы для создания новых профилактических средств, предназначенных для коррекции веса и уменьшения, потенцируемого избыточным потреблением жиров и углеводов, риска развития кардиоваскулярных заболеваний за счет одновременного воздействия, как на углеводный, так и на липидный обмен.

Литература:

1. Способ получения средства, обладающего гиполипидемическим и противоатеросклеротическим действием: патент РФ А1 1767739 RU А61 К35/78 / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян, Ю.К. Василенко - №4843660; заявл. 29.06.90; опубл. 01.08.94 // Официальный бюлл. / Центр интеллектуальн. собственности. – 1994. - № 3. – С.234.
2. Reuter, T. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes / T. Reuter // Drug Discovery Today: Disease Models. – 2007. – V4, N1. – P. 3-8.8
3. Способ получения средства, обладающего гиполипидемическим и противоатеросклеротическим действием: патент РФ А1 1767739 RU А61 К35/78 / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян, Ю.К. Василенко - №4843660; заявл. 29.06.90; опубл. 01.08.94 // Официальный бюлл. / Центр интеллектуальн. собственности. – 1994. - № 3. – С.234.
4. Хушбактова З.А., Сыров В.Н., Батиров Э.Х. Влияние флавоноидов на течение гиперлипидемии и атеросклероза в эксперименте // Хим.-фармац. журн.-1991.Т.25, № 4.- С.53-57.
5. Гай М.А., Степанова Э.Ф., Василенко Ю.К., и др. Разработка и изучение гипогликемического фитокомплекса // Матер. 55 регионал конф. по фармации, фармакол. и подготовке кадров. – Пятигорск. - 2000.-С.213-214

HYPOCHOLESTEREMIC AND HYPOGLYCEMIC EFFECT OF BIOFLAVANOIDS IN EXPERIMENT

¹Shylau V.V., ¹Krasnenkova T.P., ¹Shafranovskaya E.M., ¹Kuzub A.J., ²Kardash O.F., ²Bulgak A.G.

¹*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: farmacia@it.org.by;*

²*Scientific and Practical Center of Cardiology, 220036, Minsk, Republic of Belarus, R. Luxemburg str., 110*

The researches of hypocholesteremic and hypoglycemic actions of plant flavonoid (PF) having been extracted from plants of families *Vitaceae*, *Zingiberaceae* and *Polygonaceae* are presented. It is established, PF was treated p.o. in a dose of 70 mg/kg were precluded the body gain of rats being contained a high-calorific diet and had access ad libitum to a solution of fructose (10 %) as drink. The results of above experimental model are demonstrated, that the PF in a doses 20, 70, 200 mg/kg had taken a hypoglycemic action, and had reduced relative mass factor of a liver in a dose of 200 mg/kg. It is shown, that the PF in a dose of 20 and 70 mg/kg precludes the cholesterol increase in blood in experimental model of acute hypercholesterinemia having been induced by a tween-80 solution introducing i.p.

ВЛИЯНИЕ L-АЛАНИЛ-L-ГЛУТАМИНА НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ ЭТАНОЛА У КРЫС

Шляхтун А.Г., Пронько П.С., Сатановская В.И., Хомич Т.И., Гайшманова А.В.,
Кондыба Н.И.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230030, г. Гродно, БЛК 50, E-mail: alexj.slash@gmail.com

В связи с тем, что в клинической практике отсутствуют оптимальные средства лечения острой алкогольной интоксикации и отравлений этанолом, а также для проведения дезинтоксикационной терапии у больных алкоголизмом [1], актуальным является поиск малотоксичных средств метаболического действия для снижения токсичности этанола и нормализации метаболических нарушений в постинтоксикационный период при отравлении алкоголем и у больных алкоголизмом. Ранее было показано, что глутамин способен уменьшать токсическое действие алкоголя за счет антигипоксических и антиоксидантных свойств [2], снижать потребление этанола в условиях свободного выбора и выраженность симптомов синдрома отмены этанола у крыс [3]. Нестабильность растворов глутамина при длительном хранении и стерилизации, низкая растворимость свободного глутамина ограничивают его применение в практике [4]. Ряд синтетических производных глутамина, в частности, L-аланил-L-глутамин, обладают высокой стабильностью и растворимостью, что позволяет решить проблему доставки достаточного количества глутамина в ткани [4]. В доступной литературе не найдено работ по изучению влияния дипептидов глутамина на метаболизм и токсичность алкоголя у человека или экспериментальных животных, что указывает на актуальность данного исследования.

Цель работы: изучить влияние L-аланил-L-глутамина на параметры фармакокинетики этанола при моделировании острой алкогольной интоксикации у крыс.

Материалы и методы. В работе использованы, L-аланил-L-глутамин (Applichem, Германия), L-глутамин (Sigma, США), L-аланин (Sigma, США), абсолютный этанол (Merck KGaA, Германия), спирт-ректификат «Люкс». Все прочие реактивы марки х.ч.

Для определения влияния L-аланил-L-глутамин на параметры фармакокинетики этанола в крови использовались крысы-самцы линии Wistar массой 170-210 г, полученные в виварии «ИФБ НАН Беларуси», Гродно.

За 30 минут до введения этанола 4 опытных группы крыс получали внутривентриально L-аланил-L-глутамин в дозе 500 мг/кг, глутамин – 336 мг/кг, аланин – 164 мг/кг (что соответствует их содержанию в L-аланил-L-глутамин), или аланин в сочетании с глутамином (164 и 336 мг/кг, соответственно). Контрольным животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Моделирование острой алкогольной интоксикации осуществляли внутривентриальным введением этанола в дозе 1,5 г/кг в виде 25% раствора. Через 30, 60, 120, 180 и 240 мин после введения из надреза кончика хвоста отбирали кровь в объеме 50 мкл для определения концентрации этанола. Хлорнокислые экстракты крови хранились до анализа при температуре - 86°C.

Уровни этанола в пробах определяли на газовом хроматографе Agilent 6890 с детектором ионизации в пламени, используя стеклянную колонку длиной 2,5 м, внутренним диаметром – 2 мм), заполненную хроматоном NAW-DMCS, пропитанным 5% Carbowax 20M.

Полученные значения концентраций этанола в крови использовали для расчета параметров фармакокинетики этанола: площади под кривой «концентрация-время» (AUC, ммоль·ч·л⁻¹), среднего времени удерживания (MRT, ч), константы скорости элиминации (K_e, ч⁻¹, мин⁻¹), периода выведения половины введенной дозы препарата (T_{1/2}, ч), кажущегося объема распределения (V, л), общего клиренса (CL, л/ч). Для вычисления параметров фармакокинетики использовалась однокамерная модель с внесосудистым введением.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism v.5.0. Данные представлены в виде M ± m, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего. Для оценки достоверности изменений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Даннета. Статистически значимыми считали различия при значении p<0,05.

Результаты исследования. Показано, что использованные препараты в указанных дозах статистически значимо понижали концентрации этанола в крови крыс по сравнению с контрольной группой. В случае с введением аланил-глутамин концентрации этанола в крови были меньше на 15, 17 и 30% через 120, 180 и 240 мин после введения этанола соответственно, для глутамин - на 13 и 26% через 120 и 240 мин соответственно, для аланин – на 24 % через 240 мин, для композиции аланин+глутамин – на 16 и 23% через 120 и 240 мин соответственно, по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние предварительного введения аланил-глутамин, глутамин и аланин на концентрацию этанола (mM) в плазме крови крыс после его введения внутривентриального введения в тест-дозе 1,5 г/кг

Группы	Время после введения этанола, мин				
	30	60	120	180	240
Контроль (n=16)	20.02±1.30	28.29±0.52	21.92±0.89	14.76±0.49	7.43±0.53
Аланил-глутамин (n=8)	16.25±0.74	26.67±0.47	18.84±0.55*	12.32±0.43*	5.16±0.21**
Аланин+Глутамин (n=8)	17.01±0.77	27.04±0.72	18.52±0.70*	12.98±0.85	5.71±0.36*
Глутамин (n=8)	21.04±0.97	27.61±0.81	19.10±0.71*	13.28±0.50	5.57±0.20*
Аланин (n=8)	19.63±0.75	26.77±0.66	19.69±0.59	13.05±0.59	5.69±0.31*

L-Аланил-L-глутамин, глутамин и аланин в использованных дозах статистически значимо уменьшали площади под кривой «концентрация-время» и увеличивали клиренс этанола по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние предварительного введения аланил-глутамина, глутамина и аланина на параметры фармакокинетики этанола после его внутривенного введения в тест-дозе 1,5 г/кг

Параметры фармакокинетики	Контроль (n=16)	Аланил-глутамин (500 мг/кг) (n=8)	Аланин + Глутамин (164 и 336 мг/кг, соотв.) (n=8)	Глутамин (336 мг/кг) (n=8)	Аланин (164 мг/кг) (n=8)
AUC, mM*ч/л	128.1±5.4	103.9±1.2**	113.9±7.5	105.6±3.8*	108.2±3.70*
MRT, ч	4.48±0.19	4.08±0.13	4.46±0.39	3.57±0.19*	3.88±0.25
Ke, час ⁻¹	0.22±0.11	0.25±0.01	0.24±0.02	0.29±0.01**	0.27±0.01
T(1/2), ч	3.11±0.20	2.83±0.09	3.09±0.27	2.48±0.13*	2.69±0.17
V, л	0.22±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.21±0.01	0.22±0.01
CL, л/ч	0.050±0.002	0.061±0.001**	0.057±0.004	0.060±0.002*	0.058±0.002*

После введения глутамина отмечено также существенное снижение времени удерживания и времени полу-элиминации этанола при одновременном увеличении клиренса этанола (табл. 2). Эти изменения свидетельствуют об ускорении элиминации этанола из организма под влиянием изучаемых соединений. Композиция аланин+глутамин не оказала значимого эффекта на фармакокинетику этанола.

Основным путем метаболизма этанола в организме человека и животных является его окисление алкогольдегидрогеназой (АДГ) до ацетальдегида, а затем до ацетата альдегиддегидрогеназой (АльДГ). Путь окисления этанола АДГ в печени является основным и определяет скорость его метаболизма в организме. В связи с тем, что окисление этанола АДГ и ацетальдегида АльДГ происходит с потреблением цитоплазматического НАД⁺, при алкогольной интоксикации происходит снижение соотношения НАД⁺/НАДН в клетках печени [5]. Наблюдаемое в эксперименте ускорение элиминации алкоголя, вероятно, происходит благодаря пополнению малат-аспартатного шунта субстратами, что ускоряет реокисление НАДН и повышает соотношение НАД⁺/НАДН в цитоплазме гепатоцитов и ускоряет окисление этанола алкогольдегидрогеназой.

Заключение. Полученные данные показывают, что L-аланил-L-глутамин, глутамин и аланин ускоряют элиминацию этанола и могут быть использованы при разработке средств для лечения отравлений алкоголем и расстройств, наблюдаемых в постинтоксикационный период у больных алкоголизмом.

Литература:

1. Johnson B.A., Swift R.M., Ait-Daoud N. et al. Development of novel pharmacotherapies for the treatment of alcohol dependence: focus on antiepileptics. // Alcohol.Clin. Exp. Res. – 2004. – Vol. 28. – №2. – P. 295-301.
2. Hong R.W, Rounds J.D., Helton W.S. et al. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury.// Ann Surg. – 1992. – Vol. 215. No 2. – P. 114–119.
3. Shlyahatun A.H., Pronko P.S. Attenuation by glutamine derivatives of ethanol-induced brain amino acid imbalance and alcohol withdrawal severity in rats // Acta Biochimica Polonica. – 2009. – Vol. 56, Suppl. 3. – p. 153.

4. Fürst P., Albers S., Stehle P. Glutamine-containing dipeptides in parenteral nutrition // J. Parent. Enteral Nutr. – 1990. – Vol. 14. – P. 118-124.
5. Crabb D.W., Bosron W.F., Li T.K. Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: application to predicting alcohol elimination rates in vivo // Arch. Biochem. Biophys. – 1983. – Vol. 224. – P. 299-309.

EFFECT OF L-ALANYL-L-GLUTAMINE ON THE ETHANOL PHARMACOKINETICS IN RATS

Shlyahatun A.H., Pronko P.S., Satanovskaya V.I., Khomich T.I., Gaishmanova A.V.,
Kondyba N.I.

*State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of
the NAS of Belarus", Grodno Branch, BLK 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus,
E-mail: alexj.slash@gmail.com*

The study has demonstrated that synthetic glutamine derivative, L-alanyl-L-glutamine, glutamine and alanine given intraperitoneally increased the elimination rate of ethanol from blood compared with saline as a control treatment. Ability of these substances to increase ethanol elimination rate from blood might have clinical application in treatment of alcohol poisoning and postintoxication disorders.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕКСАПЕПТИДА ASN-TRP-ASP-VAL-TYR-LYS НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

¹Янченко В.В., ¹Выхристенко Л.Р., ¹Новиков Д.К., ²Грибовская О.В.,
²Мартинovich В.П., ²Голубович В.П., ¹Языкова Е.В., ¹Хайрулина Н.В.

¹*Витебский государственный медицинский университет, 210602, г. Витебск,
пр. Фрунзе, 27;*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 2200141, Минск,
ул. академика В.Ф. Купревича, 5/2, E-mail: vermar@iboch.bas-net.by*

В связи с наблюдаемым в последние десятилетия неуклонным ростом аллергических заболеваний, увеличением доли респираторной аллергии (бронхиальная астма, аллергический ринит) [1,2] приоритетным направлением является разработка новых методов коррекции иммунитета у больных с IgE-зависимой аллергией. Ранее в тестах *in vitro* нами было показано, что синтетические пептидные фрагменты активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е связывают антитела Е класса и оказывают десенсибилизирующее действие на лейкоциты крови больных бронхиальной астмой [3,4]. Логичным продолжением работы являются эксперименты *in vivo*. Целью настоящего исследования являлась оценка биологической эффективности и безопасности синтетического гексапептида p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα, аналога активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е, у лабораторных животных с экспериментальной бронхиальной астмой.

Материалы и методы исследования. Для создания сенсibilизации у животных, а также при проведении провокационных тестов с аллергенами использовали водно-солевые экстракты аллергенов домашней пыли, пера подушки, пылевого клеща, библиотечной пыли, произведенные ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Россия). В 1 мл раствора аллергена содержалось 10 000 PNU. Пептид p₁₃₇₋₁₄₂FcεRIα – гексапептид H-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys-

ОМе получали классическими методами пептидного синтеза в растворе. В работе использовали линейных мышей СВА обоего пола массой 20 ± 2 г.

Протокол исследования. Доклинические исследования синтетического пептида $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Витебского государственного медицинского университета.

Исследование проходило в 6 этапов:

1-й – создание сенсibilизации у лабораторных животных к аллергенам: домашней пыли, пера подушки, пылевого клеща, библиотечной пыли – 1–14 сутки;

2-й – десенсibilизация животных синтетическим пептидом $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ (или введение плацебо) – 15-27 сутки; Животных, сенсibilизированных раствором аллергенов, разделили на 2 подгруппы: 1С – контрольная ($n=7$) – животные после завершения периода сенсibilизации получали подкожно 0,9% раствор изотонического натрия хлорида (растворитель синтетического пептида $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$) – 0,1 мл/мышь, введение выполняли 5 раз с интервалом в 2 дня. 1Р – опытная ($n=7$) – животные после завершения периода сенсibilизации получали синтетический пептид $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ подкожно – 30 нг/0,1 мл/мышь, введение выполняли 5 раз с интервалом в 2 дня.

3-й – создание краткосрочной модели бронхиальной астмы у лабораторных животных путем проведения интраназальной провокации с респираторными аллергенами домашней пыли, пера подушки, пылевого клеща, библиотечной пыли – 29 сутки;

4-й – изучение влияния синтетического пептида $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ в сравнении с плацебо на тканевую и клеточную гиперчувствительность к аллергенам у сенсibilизированных мышей по результатам тестов *in vivo* (внутрикожный тест) – 30 сутки и *in vitro* (прямой тест дегрануляции тучных клеток) – 33 сутки;

5-й – умерщвление животных – 33 сутки, приготовление препаратов внутренних органов и проведение гистологического исследования – 33–60 сутки.

6-й – статистическая обработка данных для итоговой оценки безопасности и эффективности синтетического пептида $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$. Продолжительность исследования составила 2 месяца.

Результаты и обсуждение.

Оценку эффективности биологического действия пептида $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ проводили на третьем - пятом этапах по следующим показателям:

1. Степень выраженности внутрикожного теста с аллергенами.
2. Степень выраженности реакции на интраназальную провокацию с аллергеном.
3. Степень выраженности аллергенспецифической дегрануляции тучных клеток под действием аллергенов после десенсibilизации синтетическим пептидом $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$ в сравнении с группой-плацебо.
4. Гистологическое исследование тканей легких и бронхов.

Степень выраженности внутрикожного теста с аллергенами оценивали по индексу реакции, вычисляемому как соотношение местной реакции кожи в мм при внутрикожном введении аллергена к местной реакции в мм при введении раствора гистамина. В 1Р группе животных, получавших синтетический пептид $p_{137-142}F\epsilon RI\alpha$, он был равен 0,34 (0,25; 0,43) при среднем значении диаметра волдыря 2,7 мм, в контрольной группе 1С не десенсibilизированных животных эти значения составили 1,49 (1,4; 1,6) и 13,1 мм. Индекс реакции в контрольной 1С группе был выше по сравнению с опытной группой в 4,4 раза.

При проведении интраназальной провокации раствором микст-аллергенов №1 производили учет симптомов ринита (почесывание носа, чихание, зуд, ринорея), астмы (кашель, снижение частоты дыхания), системной аллергической реакции (судороги, смерть животного), наблюдая за животными в течение 30 минут. Каких-либо внешних признаков аллергической реакции у животных опытной группы 1Р зарегистрировано не было. У мышей контрольной группы 1С наблюдалось двигательное беспокойство, почесывание мордочки.

Перечисленные признаки оценивались как проявление аллергической реакции немедленного типа на интраназальное введение аллергена.

При изучении дегрануляции тучных клеток под действием аллергена выявлено, что процент дегранулировавших тучных клеток в группе мышей, получавших синтетический пептид $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$, составил -6,0 (-11,8; 4,5)%, тогда как в группе плацебо был равен 34,6 (29,8; 48,8)%, различия между группами достоверны ($p < 0,05$). Эксперимент показал высокую эффективность синтетического пептида $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$ в предупреждении развития IgE зависимой дегрануляции тучных клеток под действием причинно-значимого аллергена.

При гистологическом исследовании тканей легких и бронхов оценивались следующие патологические нарушения: утолщение стенок альвеол; инфильтрация лейкоцитами; клеточная очаговая инфильтрация; наличие экссудата в альвеолах и бронхах; наличие очагов кровоизлияния. В отличие от животных, подвергшихся десенсибилизации синтетическим пептидом $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$, в группе плацебо, не десенсибилизированных животных, имелись более выраженные признаки патологии, характерные для аллергического воспалительного процесса. В группе 1С выявлено наличие всех 5 патологических признаков, в отличие от группы 1Р, в которой основным вариантом выявленной патологии в легких было небольшое утолщение стенок альвеол и небольшая их клеточная инфильтрация лейкоцитами у нескольких опытных животных.

Оценка безопасности гексапептида $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$ проводилась по следующим параметрам: общее состояние и выживаемость животных; динамика массы тела (до и после подкожного введения пептида и плацебо – на 15 и 25 сутки соответственно); определение количества лейкоцитов в периферической крови, подсчет лейкоцитарной формулы, определение скорости оседания эритроцитов (исходно и после забоя животных – на 33 сутки); степень выраженности анафилактической реакции на подкожное введение синтетического пептида $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$; гистологические исследования внутренних органов лабораторных животных опытной и контрольной групп.

Проведенные исследования показали, что синтетический пептид $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$ при подкожном введении в дозе 150 нг/кг обладает высокой безопасностью, поскольку он не вызывал гибели животных и отклонений состояния животных от физиологической нормы; не оказывал влияния на изменение массы тела животных; не изменял морфологический состав крови животных; не вызывал анафилактических реакций; существенно не изменял морфологический состав тканей и органов (печень, почки, надпочечники, сердце, поджелудочная железа, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник) животных.

При подкожном введении лабораторным животным пептид $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$ проявил высокий уровень биологической эффективности, индуцировал формирование иммунологической толерантности к аллергенам у сенсibilизированных животных, поскольку:

- предупреждал аллергическое воспаление в тканях бронхов и легких;
- угнетал специфическую кожную реакцию на аллерген;
- снижал специфическую дегрануляцию тучных клеток под влиянием причинно-значимых аллергенов..

Пептид $r_{137-142}Fc\epsilon RI\alpha$ в этом экспериментальном исследовании показал себя как эффективное и безопасное лекарственное средство и, в перспективе, может использоваться для иммунотерапии IgE зависимых аллергических болезней у людей с полисенсibilизацией в условиях 1-2 фаз клинических испытаний.

Литература:

1. Скепьян Н. А. Аллергические болезни: дифференциальный диагноз, лечение. Мн., 2000.

2. Новиков Д. К., Новикова В. И., Доценко Э. А. Бронхиальная астма у взрослых и детей. М., 1998.
3. Янченко В.В., Мартинович В.П., Мельник О.В., Голубович В.П., Новиков П.Д., Новиков Д.К., Шрестха К.Г. Влияние тетрапептида Arg-Asn-Trp-Asp эпитопа FcεRI на клетки системы иммунитета. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2004. №3. С.22–32.
4. Martinovich V.P., Gribovskaya O.V., Yanchenko V.V., Novikov D.K., Novikov P.D., Golubovich V.P., Yanchenko L.K. A study of immunobiological activity of the WRNWDYYK octapeptide. // J. Peptide Sci. Supp. Vol. 14, N 8. P. 112.

INVESTIGATION IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY OF HEXAPEPTIDE ASN-TRP-ASP-VAL-TYR-LYS ON EXPERIMENTAL MODEL OF ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

¹Yanchenko V.V., ¹Vihristenko L.R., ¹Novikov D.K., ²Gribovskaya O.V., ²Martinovich V. P.,
²Golubovich V. P., ¹Yazikova E.V., ¹Khayrulina N.V.

¹*Vitebsk State Medical University;*

²*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus*

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Поройков В.В.</i> Виртуальный скрининг и компьютерное конструирование базовых структур новых лекарств	3
<i>Петров С. А., Карпов Л. М.</i> Коррекция метаболических нарушений витаминно-метаболическими комплексами	5
<i>Чиркин А.А., Данченко Е.О., Балаева-Тихомирова О.М., Крумплевская Л.А., Нарута Е.Е.</i> Метаболические эффекты природного антиоксидантного препарата	7
<i>Егоров В.В., Назаров В.А., Андрончик К.А., Здрачек Е.А.</i> Применение ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе	9
<i>Шкуматов В.М.</i> Трансгенные микроорганизмы для биохимической фармакологии модификаторов биосинтеза стероидных гормонов	13
<i>Абдо М., Шафрановская Е.В., Чернова Т.А., Погребняков И.А.</i> Влияние N-ацетил-L-карнитина и Mg-таурина на метаболические показатели у старых крыс	16
<i>Агабалаева Е.Д., Гончарова Л.В., Спиридович Е.В.</i> Потенциал пажитника греческого (<i>Trigonella foenit graecum</i> L.) как источника биологически активных соединений для создания парафармацевтиков	19
<i>Алексеев О.В., Шилов В.В., Кардаш О.Ф., Юдина О.А., Красненкова Т.П., Забело О.И., Федулова Е.В., Копач П.С., Жердецкая Н.А., Булгак А.Г., Колядко М.Г., Островский Ю.П.</i> Модель хронической ишемии миокарда, индуцированная 5-фторурацилом	21
<i>Анисович М.В., Пытлев С.И., Афонин В.Ю., Шилов В.В.</i> Цитостатические свойства водных субстанций на основе куркумина	24
<i>Бизунок Н.А., Дубовик Б.В., Полозов Г.И., Шадыро О.И.</i> 4. Новый индуктор клеточной генерации активных форм кислорода в ряду экранированных фенолов	26
<i>Бизунок Н.А., Дубовик Б.В., Полозов Г.И., Шадыро О.И.</i> Структурные аналоги α-токоферола модулируют генерацию активных форм кислорода макрофагами	28
<i>Бизунок Н.А., Дубовик Б.В., Полозов Г.И., Шадыро О.И.</i> Антирадикальная активность производных коричной кислоты на модели клеточной генерации активных форм кислорода	31
<i>Бондарюк Е.В., Сенчук В.В.</i> Роль эритроцитов и гемоглобина в транспорте и пероксидазной биотрансформации флавонолов	33
<i>Бородинский А.Н., Караедова Л.М.</i> Влияние L-аргинина, L-глутамин и янтарной кислоты на состояние углеводного обмена при острой алкогольной интоксикации	36
<i>Буко В.У., Нарута Е.Е., Белановская Е.Б., Кузьмицкая-Николаева И.А.</i> Скрининг препаратов для комбинационной фармакотерапии неалкогольного стеатогепатита	39
<i>Виноградов С.В., Виноградов В.В.</i> Ронколейкин и В-витамины в лечении сепсиса	42
<i>Воронов П.П., Макарович А.Ф., Макар Е.А., Самойлик А.А., Буко В.У.</i> Экстракт Инхистара (<i>Phallus Inpidicus</i>) снижает уровень глюкозы в крови при аллоксановом диабете у крыс	45
<i>Гетко Н.В., Субоч В.П., Кручонок А.В., Кабушева И.Н.</i> Летучие вещества листьев и корней интродуцированной в Беларусь эхинацеи пурпурной (<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench)	47
<i>Глинник С.В., Ринейская О.Н., Романовский И.В., Прокопчик К.Г.</i> Прооксидантно-антиоксидантный статус мозга крыс в условиях экспериментального гипертиреоза	50
<i>Гриншпан Д.Д., Савицкая Т.А., Цыганкова Н.Г., Невар Т.Н., Макарович С.Е.</i> Натриевая соль сульфата ацетата целлюлозы - полимер многофункционального назначения в технологии получения таблеток и мазей	52
<i>Гуринович В.А., Катковская И.Н., Омельянчик С.Н., Бадун Г.А., Мойсеёнок А.Г.</i> Биотрансформация D-пантенола в механизмах нейропротекции	56
<i>Демид Д.И., Губина Л.П., Залашко Л.М., Романовский Д.И., Петров П.Т.</i>	59

Применение ВЭЖХ в анализе комбинированного препарата, нормализующего работу желудочно-кишечного тракта <i>Демид Д.И., Залашко Л.М., Губина Л.П., Романовский Д.И., Петров П.Т.</i>	61
Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе нового комбинированного препарата «пандетокс» <i>Демид Д.И., Кормушина А.Д., Фатеева О.А., Романовский Д.И., Петров П.Т.</i>	63
Сравнительная оценка биодоступности лекарственных средств на основе осельтамивира фосфата <i>Емельянова А.А., Якубовский С.В., Чайка Л.Д., Жукова Н.Д.</i> Изменения структуры поджелудочной железы при абдоминальной хирургической инфекции и их коррекция сукцинат-содержащим препаратом в эксперименте	66
<i>Жукова И.А., Павленко В.С., Никифорова И.Н.</i> Действие комплексного препарата с анальгетической активностью в тесте Hot Plate на мышах	69
<i>Забело О.И., Федулова Е.В., Анисович М.В., Афонин В.Ю., Шилов В.В., Красненкова Т.П., Ковалева М.В.</i> Протективные свойства растительных флавоноидов	71
<i>Здрачек Е.А., Егорова В.В., Назаров В.А., Календо Р.А.</i> Универсальный электрод и унифицированная методика количественного определения гидрофобных физиологически активных аминов в лекарственных формах методом потенциометрического титрования	74
<i>Иванов О.А., Красненкова Т.П., Афонин В.Ю., Домаш В.И.</i> Антикоагулянтная активность ингибиторов протеаз Echinaceae Purpurea	77
<i>Иващенко Н.В., Сенчук В.В.</i> Биохимическая фармакология флавонолов: роль реакций пероксидазной биотрансформации	79
<i>Казючиц О.А., Ильянок Г.А., Климашевич В.Б., Петров П.Т.</i> Технологические подходы при разработке биокорректоров в форме твердых желатиновых капсул	83
<i>Каплин А.В., Винарский В.А., Юрченко Р.А., Поляков Ю.С., Лецев С.М., Шевчук Т.А.</i> Определение синтетических агонистов каннабиноидных СВ1- и СВ2-рецепторов группы «Аминоалколоидов» в растительных смесях	85
<i>Караедова Л.М., Бородинский А.Н.</i> Влияние композиции L-аргинина и L-глутамина с янтарной кислотой на дегидрогеназные реакции в условиях острой алкогольной интоксикации	87
<i>Киселева Е.П., Михайлопуло К.И., Ижик А.В., Сидоренко А.В., Новик Г.И.</i> Тест-система для количественного определения клеток бифидобактерий в культуральных средах для технологий производства биодобавок пробиотического действия	90
<i>Кондрашова С.Б., Кохан С.Б., Лаврентьев В.П.</i> Синтез ацетилхолина в гипоталамусе крыс при лихорадке. Влияние ГАМК	93
<i>Кравченко Е.В., Асташко Ю.В., Понтелеева И.В.</i> Моделирование десинхроноза в эксперименте на инбредных мышах BALB/C в темноте и с использованием искусственного освещения	95
<i>Кравченко Е.В., Максимова Л.В.</i> Моделирование процессов неассоциативного обучения у аутбредных мышей ICR в Tail Suspension Test	98
<i>Кравченко Е.В., Максимова Л.В.</i> Влияние нейротропных олигопептидов на процессы неассоциативного обучения у аутбредных мышей ICR в Tail Suspension Test	101
<i>Кравченко Е.В., Максимова Л.В.</i> Моделирование процессов неассоциативного обучения у мышей в тесте Tail Flick	104
<i>Кравченко Е.В., Максимова Л.В.</i> Изучение эффектов нейротропных дипептидов на процессы неассоциативного обучения у мышей в тесте Tail Flick	107

<i>Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Забродоцкая Е.В.</i> Оценка влияния нейротропного дипептида ИФБ-30 на глутамат- и холинергические механизмы регуляции циркадных ритмов поведенческой активности	110
<i>Кравченко Е.В., Понтелеева И.В.</i> Исследование влияния пролинсодержащего дипептида ИФБ-30 на выработку условной реакции пассивного избегания у крыс Wistar	113
<i>Кравченко Е.В., Понтелеева И.В., Петров П.Т.</i> Исследование влияния БАД «Ноотрицин» на выработку условной реакции пассивного избегания у крыс линии SHR	116
Кукса О.И., Гулевич А.Л., Ковалевич В.А. Новые реагенты для определения нестероидных анальгетиков и антибиотиков	119
Логацкая М.А., Савицкий В.П., Афанасенко Д.А., Зорин В.П. Сравнение уровней накопления хлоринов в активированных и покоящихся Т-клетках и их чувствительности к фотосенсибилизированному повреждению	120
<i>Лукиенко Е.П., Королёв П.М., Гроховская Т.Ч., Пеховская Т.А., Коваленчик И.Л.</i> Коррекция антиоксидантного статуса экспериментальных животных при иммобилизационном стрессе на фоне раздельного и совместного введения селенометионина и пантенола	124
<i>Макаревич А.М., Спиридович Е.В.</i> <i>Vaccinium corymbosum</i> L. как источник антоциановых пигментов в производстве фармацевтической продукции	126
<i>Марьянкова Р.Ф., Казющц О.А., Добыш И.И.</i> Микробиологический анализ фармсубстанций и готовой формы осельтамивира фосфата	128
<i>Михальчук А.Л., Кисель М.А., Курман П.В.</i> Триазольные производные низкомолекулярных природных биорегуляторов – новое направление поиска	130
направление поиска потенциальных модуляторов активности цитохромов Р-450	
<i>Мойсёнок А.Г.</i> Пантотеновая кислота – достижения и новые возможности применения фармакологического препарата	132
<i>Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.</i> Влияние милдроната и карнитина хлорида на экспрессию генов PPAR у крыс	135
<i>Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.</i> Оценка экспрессии генов PPAR у крыс при введении статинов	137
<i>Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.</i> Характеристика уровня экспрессии генов PPAR, пролиферации, апоптоза и клеток с микроядрами у крыс с гиперлипидемией при введении ликопина	140
<i>Мушкина О.В., Гурина Н.С.</i> Определение антиоксидантной и противовоспалительной активности лекарственных средств растительного происхождения	143
<i>Надольник Л.И., Чумаченко С.С., Горева Д.А., Валентюкевич О.И., Яськевич С.С., Климович П.Н.</i> Тиреопротекторные свойства антиоксидантных комплексных препаратов	146
<i>Назаров В. А., Астапович Р. И., Здрачек Е. А., Егорова В. В.</i> Количественное определение физиологически активных аминов в лекарственных формах с помощью ионоселективных электродов	149
<i>Насек В.М., Нехай А.С., Пронько П.С.</i> Антиалкогольная активность нового препарата в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах С57Bl/6	152
<i>Насек В.М., Шоломицкая Е.Ю., Кравченко Е.В.</i> Аллергизирующие свойства готовой лекарственной формы фитопрепарата «Рациум»	154
<i>Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Жук О.Н.</i> Возможности нетрадиционного применения препаратов стрептокиназы: исследования на молекулярном и клеточном уровнях	156

<i>Николаевич Л.Н., Савицкий В.П., Морозова Е.В., Насек В.М., Жукова И.А., Жебракова И.В., Нехай А.С.</i> Влияние ликопина на ploидность клеток крови и оценка его токсичности	160
<i>Огурцова С.Э., Анисович М. В., Малей Л.П., Малашевич Я.В., Беляева А.В., Власенко А.К., Афонин В.Ю.</i> Реакция иммунных клеток крыс на эмоционально-физический стресс	162
<i>Огурцова С.Э., Афонин В.Ю., Малей Л.П., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.</i> Роль гена NMO1 в индукции цитогенетических повреждений в клетках костного мозга мышцей полициклическими углеводородами	164
<i>Огурцова С.Э., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.</i> Изменение экспрессии генов, участвующих в метаболизме хиноновых противоопухолевых промутагенов при индукции различными антиоксидантами	167
<i>Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Катковская И.Н., Тишкина А.О., Мойсеенок А.Г., Гуляева Н.В.</i> Нейропротекторные свойства пантенола при экспериментальной ишемии мозга	169
<i>Пронько П.С., Хомич Т.И. Сатановская В.И., Гайшманова А.В., Кондыба Н.И., Шляхтун А.Г., Лис Р.Е., Поплавская Е.А.</i> Влияние композиции на основе N-ацетилцистеина и глутаминa на метаболические и морфологические нарушения в печени, вызванные этанолом	172
<i>Пытлев С.И.</i> Возможности использования микроэлементного профиля биоптатов человека для ранней диагностики и прогноза развития патологических состояний	174
<i>Рябцева Т.В., Талако Т.М., Воронова Н.В., Сирош О.П., Сорока Н.Ф.</i> Влияние цитостатического препарата «Лейкладин» на процессы перекисного окисления липидов у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом	176
<i>Самцов М.П., Петров П.Т., Луговский А.П., Воронай Е.С., Луговский А.А., Ляшенко Л.С., Демид Д.И., Истомин Ю.П.</i> Комплекс индотрикарбоцианина с кремофором в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных опухолей	179
<i>Самцов М.П., Петров П.Т., Луговский А.П., Воронай Е.С., Луговский А.А., Ляшенко Л.С., Демид Д.И., Тарасов Д.С., Истомин Ю.П.</i> Индотрикарбоцианин с модифицированной структурой в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных опухолей	181
<i>Сатановская В.И., Кондыба Н.И., Пронько П.С., Гайшманова А.В., Шляхтун А.Г.</i> Влияние глутаминa и N-ацетилцистеина на системы обмена спиртов и альдегидов в печени крыс после алкогольной интоксикации	183
<i>Тарасова А.В., Шман Т.В.</i> Влияние ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) – NU7026 на репаративный ответ и чувствительность лейкемических клеток к эпопозиду	185
<i>Титовец Э.П., Смирнова Л.А., Пархач Л.П.</i> Действие барбитуратов и глюкокортикоидов на кислородный обмен эритроцитов	188
<i>Фалетров Я.В., Фроленков К.А., Рудая Е.В., Сивоплясова А.В., Костин Д.Г., Слобожанина Е.И., Шкуматов В.М.</i> Оценка взаимодействия лекарств с ферментами биосинтеза стероидных гормонов с помощью молекулярного докинга и экспериментальной модели на основе трансгенных микроорганизмов	190
<i>Хейдоров В.П., Чалый Г.Ю., Титорович О.В.</i> Кинетика в анализе биологически активных веществ	193
<i>Ходос О.А., Гидранович Л.Г., Сачек М.М.</i> Влияние отечественного препарата Мексибел на интенсивность протеолиза в ткани головного мозга крыс на фоне отмены этанола после хронической алкогольной интоксикации	194
<i>Хоменко А.И., Матюлько А.В., Гринцевич И.Б., Повалишев В.Н., Болдова О.Г.</i>	197

Тандемное масс-спектрометрическое определение лизиноприла в плазме крови человека: валидация количественной методики анализа и ее применение для биоэквивалентных испытаний	
<i>Хомич Т. И., Колошина Н. В., Пронько П. С.</i> Воздействие острой алкогольной интоксикации на активность антиоксидантной системы в мозге крыс при мерказолил-индуцированном гипотиреозе	200
<i>Чернявский Е.А., Лесникович Ю.А., Стреха И.С., Сенчук В.В., Шкуматов В.М.</i> Получение стабильного иммобилизованного биокатализатора для синтеза креатинфосфата	204
<i>Шабуня П.С., Чернова Т.А., Курман П.В.</i> Количественное определение N-ацетил-L-карнитина методом обратно-фазовой ВЭЖХ	206
<i>Шилов В.В., Красненкова Т.П., Шафрановская Е. М., Кузуб А.Ю., Кардаш О.Ф., Булгак А.Г.</i> Гипохолестеринемический и гипогликемический эффект биофлавоноидов в эксперименте	209
<i>Шляхтун А.Г., Пронько П.С., Сатановская В.И., Хомич Т.И., Гайшманова А.В., Кондыба Н.И.</i> Влияние L-аланил-L-глутамина на фармакокинетику этанола у крыс	212
<i>Янченко В.В., Выхристенко Л.Р., Новиков Д.К., Грибовская О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П., Языкова Е.В., Хайрулина Н.В.</i> Изучение иммунобиологической активности гексапептида ASN-TRP-ASP-VAL-TYR-LYS на экспериментальной модели аллергической бронхиальной астмы	215

Научное издание

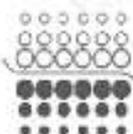
БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
Международной научно-практической конференции

(Минск, 2-3 ноября 2010 г.)

Ответственный за выпуск: Демид Д. И.
Компьютерная верстка: Нехай А. С.
Дизайн обложки: Демид Д. И.

Подписано в печать 27. 10. 2010. Формат 60×84 1/16
Бумага офсетная. Гарнитура Times Печать Ризо.
Усл. печ. л. 12,56 .Уч.-изд. л. . Тираж 150 экз. Заказ .3145



KAMPILAB

Газовые и жидкостные хроматографы, масс-спектрометры, спектрофотометры, ICP-MS, капиллярный электрофорез, амплификаторы, атомно-силовая микроскопия
компания Agilent Technologies



ООО «КАМПИЛАБ»
220018, г. Минск, ул. Шаранговича, 19-345
тел./факс: +375 17 259-09-78, 259-07-77
www.campilab.by
campilab@campilab.by



Agilent Technologies

Authorized Distributor