

Назустріч VIII Національному  
з'їзду фармацевтів України

**УКРАЇНСЬКИЙ  
БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
ЖУРНАЛ**



**УКРАИНСКИЙ  
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**



**UKRAINIAN  
BIOPHARMACEUTICAL  
JOURNAL**

Заснований у лютому 2008 р.

№ 4 (45) 2016

УДК 615.015:615.3:615.31

*Науковий журнал «Український біофармацевтичний журнал» внесений до затвердженого ВАК України Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук з біологічних та фармацевтичних наук (протокол № 1-05/01 від 10.02.2010)*

## УКРАЇНСЬКИЙ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

**ЗАСНОВНИК:**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Головний редактор**

Малоштан Л. М., д.б.н., професор

**Редакційна колегія:**

Бондар В. С., Березнякова А. І., Безуглий П. О., Вороніна Л. М., Галузінська Л. В. (відповідальний секретар), Гладченко О. М., Гладух Є. В., Гриценко І. С. (науковий консультант), Загайко А. Л. (заступник головного редактора), Ковальов В. М., Гризодуб О. І., Дедух Н. В., Деримедвідь Л. В., Дрогоров С. М., Залюбовська О. І., Зупанець І. А., Кисличенко В. С., Кравченко В. М., Маслова Н. Ф., Риженко І. М., Рубан О. А., Сахарова Т. С., Стрельников Л. С., Тихонов О. І., Філімонова Н. І., Черних В. П. (головний науковий консультант), Хворост О. П., Штриголь С. Ю., Ярних Т. Г., Яковлева Л. В.

**Редакційна рада:**

Александрова К. В. (Запоріжжя), Гараєв Е. А. (Баку), Гольцев А. М., Головенко М. Я. (Одеса), Германюк Т. А. (Вінниця), Дев'яткіна Т. О. (Полтава), Корпачов В. В. (Київ), Краснопольський Ю. М., Мамчур В. Й. (Дніпропетровськ), Мітрохін М. М. (Москва), Одегова Т. Ф. (Перм), Петренко О. Ю., Полянська Г. Г. (Санкт-Петербург), Субота Н. П., Чайковський Ю. Б. (Київ), Фіра Л. С. (Тернопіль), Чалдаков Г. Н. (Варна), Чекман І. С. (Київ), Цемахович В. А. (Тель-Авів), Юнусходжаєв А. Н. (Ташкент)

*Схвалено вченою радою НФаУ (протокол № 11 від 29.06.2016 р.)*



*Назустріч VIII Національному з'їзду фармацевтів України*

***Шановні колеги!***

**13-16 вересня 2016 р.** згідно з посвідченням УкрІНТЕІ № 113 від 21.04.2015 р. у м. Харкові на базі Національного фармацевтичного університету відбудеться **VIII Національний з'їзд фармацевтів України.**

Широкомасштабний фаховий захід у вітчизняній галузі охорони здоров'я збирає близько **800 учасників із 24 регіонів України та 22 держав світу.**

На з'їзді будуть презентовані досягнення національної фармацевтичної індустрії, досвід інтеграції до європейського простору, розглянуті нагальні потреби галузі. Делегати підіб'ють підсумки, обговорять та затвердять концепцію розвитку фармацевтичного сектора галузі охорони здоров'я України на 2016-2021 рр. Упродовж трьох днів роботи з'їзду делегати та учасники матимуть можливість спілкуватися з колегами, обмінюватися практичним досвідом, обговорювати сучасні аспекти розробки та промислового виробництва фармацевтичних препаратів, зокрема біотехнології та нанотехнології у фармації, сучасні підходи до створення нових лікарських засобів, пакування та маркування лікарських препаратів, питання клінічної фармації, стан соціальної фармації, перспективи фармацевтичної освіти в Україні, зокрема участі роботодавців у підготовці кадрів для фармації тощо.

У рамках науково-практичної конференції «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи», яка пройде 15-16 вересня 2016 року, будуть проведені 10 наукових симпозиумів, 6 лекцій майстер-класу, 3 дискусії за круглим столом, 9 воркшопів, 3 сателітних симпозиуми, 1 семінар-тренінг.

Під час роботи з'їзду відбудеться презентація низки ексклюзивних видань, серед яких 3-є видання Фармацевтичної енциклопедії, Rx-index – Довідник еквівалентності лікарських засобів, 3-є видання Державної фармакопеї.

Під час проведення VIII Національного з'їзду фармацевтів України відбудеться святкування професійного свята – **Дня фармацевтичного працівника України** та нагородження кращих представників фармації.

**Оргкомітет VIII Національного з'їзду фармацевтів України**

тел.: +38 (057) 706-22-69

тел./факс: +38 (057) 706-30-98

E-mail: pharm\_congress@nuph.edu.ua

**Організатори VIII Національного з'їзду фармацевтів України**

- Міністерство охорони здоров'я України
- Державна служба України з лікарських засобів та контролю за наркотиками
- Міністерство освіти і науки України
- Національна академія наук України
- Національна академія медичних наук України
- Харківська обласна державна адміністрація
- Харківська обласна рада
- Харківська міська рада
- Громадська організація «Харківська обласна асоціація фармацевтичних працівників»
- ТОВ «Українська рейтингова агенція»
- Національний фармацевтичний університет

**Спонсори VIII Національного з'їзду фармацевтів України**

- |   |   |
|---|---|
| • ПАТ «Фармак» – генеральний спонсор  | • ТОВ «Санофі Авентіс Україна»          |
| • ПАТ «Хімфармзавод «Червона зірка»   | • ПАТ «Лекхім»                          |
| • ТОВ «Фіто-Лек»  | • ТОВ «Такеда Україна»                  |
| • ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»  | • ТОВ «Біонорика»                       |
| • ТОВ «Фарма Старт»   | • ОКП «Фармація»                        |
| • ТОВ «ВАЛАРТИН ФАРМА»  | • ТОВ «Ранбаксі Фармасьютікалз Україна» |
| • Корпорація «Артеріум»   | • Ananta Medicare Ltd                   |
| • ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ»   | • ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»      |
| • ТДВ «ІнтерХім»  | • ТОВ «Кусум Фарм»                      |
| • ТОВ «Рекітт Бенкізер Україна»   | • ТДВ «Рівнефармація»                   |
| • ТОВ «Юрія-Фарм»   | • ТОВ «НВП «ГЕМО-ПРОЕКТ»                |
| • ПАТ «Стома»   | • ТОВ «НВФК «Ейм»                       |
| • ТОВ «Прана-Фарм»  | • «STADA Україна»                       |
| • ТОВ «ТОМАШ»   | • ТОВ «Бізнес-кредит»                   |
| • Компанія «Dr. Reddy's Laboratories Ltd» Представництво – «Dr. Reddy's Laboratories Ltd» | • Фармацевтична асоціація «Lege Artis»  |

**Інформаційні спонсори VIII Національного з'їзду фармацевтів України**

- |  |  |
|--|--|
| • Щотижневик «Аптека» – головний інформаційний спонсор               | • Журнал «Вісник фармації»   |
| • ТОВ «Моріон»   | • Журнал «Клінічна фармація»                                       |
| • Компанія «Проксіма Ресерч»   | • Журнал «Соціальна фармація в охороні здоров'я»                   |
| • Журнал «Современная фармація»                                      | • «Український біофармацевтичний журнал»                           |
| • Журнал «Фармацевт Практик»   | • Журнал «Управління, економіка та забезпечення якості в фармації» |
| • Журнал «Pharma Magazine»   | • Журнал «ScienceRise»   |
| • «Видавничий дім «Заславський» газета «Новости медицины и фармации» | • Журнал «Фармаком»  |
| • Журнал «Фармацевтическая отрасль»                                  | • Журнал «Фармацевтичний часопис»                                  |
| • Журнал «Les Nouvelles Esthetiques Украина»                         | • Фармацевтичний портал Depharm – офіційний інтернет-партнер       |
| • Журнал «Фармакологія та лікарська токсикологія»                    | • ТРК «Оріон» – спеціальний медіа-партнер                          |
| • «Журнал органічної та фармацевтичної хімії»                        |  |

**Технічні партнери VIII Національного з'їзду фармацевтів України**

- РА «Пропаганда»
- ПрАТ «ІДС АКВА СЕРВІС»
- «Gorbenko catering»
- Premier Palace Hotel Kharkiv



## **ДО 75-РІЧЧЯ ЗАСЛУЖЕНОГО ДІЯЧА НАУКИ І ТЕХНІКИ УКРАЇНИ, ДОКТОРА ФАРМАЦЕВТИЧНИХ НАУК, ПРОФЕСОРА КОВАЛЬОВА ВОЛОДИМИРА МИКОЛАЙОВИЧА**

20 вересня 2016 року виповнюється 75 років видатному вченому, заслуженому діячеві науки і техніки України, доктору фармацевтичних наук, професору кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету Володимирі Ковальову.

Пріоритетним напрямком наукової діяльності Володимира Миколайовича був та є пошук і дослідження біологічно активних речовин природного походження, виділення, структурний аналіз, синтез аналогів природних флавоноїдів, ізофлавоноїдів, карденолідів і антрахінонів, спектральні методи аналізу, стандартизація, розробка способів отримання фітопрепаратів.

Володимир Миколайович закінчив Харківське медичне училище №1, фармацевтичне відділення (1962), Харківський фармацевтичний інститут (1969), де пройшов шлях від студента, аспіранта, асистента, доцента до завідувача (1985-2012) і професора (1986) кафедри фармакогнозії НФаУ.

У 1979 р. В. М. Ковальов захистив кандидатську дисертацію на тему «Фармакогностичне дослідження деяких видів стальника». Наукова робота мала велике наукове і практичне значення. В індивідуальному стані було виділено і досліджено 68 природних сполук, які відносяться до похідних флавону, флавонолу, ізофлавонолу, ізофлавонону та тритерпеноїдів. 15 з цих сполук виявилися новими для роду Стальник (*Ononis*), а речовини оногенін (7-гідрокси-, 3',4'-метилendioкси-, 6'-метоксіізофлавонони) і онозид (7-O-β-D-глюкопіранозид, 3',4'-метилendioкси-, 6'-метоксіізофлавонони) виявилися новими природними сполуками. У 1983 р. Ковальову В. М. присвоєно вчене звання доцента.

Доцент Ковальов В.М. продовжував наукову роботу, результатом фундаментальних досліджень в області пошуку фенольних, тритерпенових, азотовмісних і стероїдних сполук карденолідної природи в рослинах родини бобові стало написання та успішний захист докторської дисертації «Дослідження рослин родини бобові як джерела отримання біологічно активних речовин і синтез їх аналогів» (1983). У 1986 р. В. М. Ковальов отримав вчене звання професора, а в 1996 р. – почесне звання «Заслужений діяч науки і техніки України».

Серед наукових досягнень слід відзначити, що Володимир Миколайович є співавтором 14 лікарських препаратів, з яких «Гліфазин» (гранули, свічки), «Флаванобол», «Ононін-стандарт», «Піфламін», бальзам «Чаклун», кормова добавка «Люцерон» впроваджені в промислове виробництво. Він розробив фармакопейні статті «Ононін-стандарт» ТС 42-1238-82, «Корінь стальника» ФС 42-1931-82, «Настоянка стальника» ФС 42-1932-82. За результатами наукових досліджень опубліковано понад 550 наукових праць, одержано більше 70 авторських свідоцтв, патентів України та Росії.

Крім того, особливе місце у числі науково-практичних робіт займає перший вітчизняний підручник з дисципліни «Фармакогнозія» для студентів фармацевтичних ВНЗ та факультетів, провізорів, лікарів та валеологів «Фармакогнозія з основами біохімії рослин» (2000, 2004). Дане видання стало знаковою подією для розвитку науки і освіти в країні в цілому.

Професор Ковальов В. М. є автором низки наукових посібників з фітотерапії: монографія «Фітотерапія у вашому домі. Лікування лікарськими рослинами» (1990), «1000 рецептів з лікарських трав» (1991, 1993) та ін.; він співавтор навчальних посібників «Практикум з фармакогнозії» (2003), «Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати» (2001, 2003), «Фармакогнозія» (1999, 2007), «Laboratory Handbook on Pharmacognosy» (2007), «Основи практичної фітотерапії» (1999), «Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини» (2014) і низки інших навчально-методичних матеріалів, а також автор статей у «Фармацевтичній енциклопедії» (2005, 2010), співавтор багатьох методичних вказівок (рекомендацій), робочих програм з фармакогнозії з основами біохімії лікарських рослин.

Під керівництвом професора Ковальова В. М. було захищено 5 докторських і більше 20 кандидатських дисертацій, які відрізнялися своєю новизною та унікальністю.

Професор Ковальов В. М. входить до складу спеціалізованої вченої ради по захисту докторських і кандидатських дисертацій, редакційної ради видання «Фармацевтична енциклопедія», був членом Фармакопейного комітету СРСР і Фармакопейного комітету МОЗ України; він є членом редакційних рад журналів «Український біофармацевтичний журнал», «Аннали Мечниківського інституту», республіканської проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України.

Професору Ковальову В. М. присвоєні почесні грамоти Міністерства охорони здоров'я СРСР, Верховної Ради України, виконкомом Харківської міської ради; відзнаки «Відмінник охорони здоров'я», «Відмінник освіти України», «Вища школа СРСР – за відмінні успіхи у роботі» і «Винахідник СРСР»; Володимирі Миколайовичу присвоєні почесні звання «Заслужений діяч науки і техніки України» і почесний професор НФаУ.

***Від щирого серця, з великою вдячністю колектив і студенти Національного фармацевтичного університету, колеги, друзі, учні бажать Володимирі Миколайовичу з нагоди 75-річного ювілею здоров'я, довгих років життя, благополуччя, не втрачати властивого йому оптимізму, життєрадісності та захопленості новими справами!***





## ДО 65-РІЧЧЯ ДОКТОРА ФАРМАЦЕВТИЧНИХ НАУК, ПРОФЕСОРА КОВАЛЬОВОЇ АЛЛИ МИХАЙЛІВНИ

28 серпня 2016 року виповнюється 65 років із дня народження видатного вченого-фармакогноста, доктора фармацевтичних наук, професора кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету Ковальовій Аллі Михайлівні.

Алла Михайлівна Ковальова народилась у м. Дзержинську Донецької області. У 1968 р. з «золотою медаллю» закінчила середню Щербинівську школу (сел. Щербинівка) м. Дзержинська Донецької області. З відзнакою закінчила у 1973 р. Харківський фармацевтичний інститут (спеціальність «Фармація») та здобула кваліфікацію провізора. Працювала впродовж декількох років у Центральній районній аптеці № 208 м. Донецька районним рецептарем.

Кандидатську дисертацію на тему «Фармакогностичне дослідження видів родів горох і віка» захистила у 1988 р. у Спеціалізованій раді при Всесоюзному НДІ хімії та технології лікарських засобів за фахом 15.00.02 – «Фармацевтична хімія та фармакогнозія» та отримала науковий ступінь кандидата фармацевтичних наук (1988 р.). З 1991 р. вона доцент кафедри фармакогнозії Харківського державного фармацевтичного інституту.

Дисертацію на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія «Фармакогностичне дослідження видів родин *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Convallariaceae* та *Apiaceae*, перспективи їх використання в медицині» захистила у 2002 р. в Спеціалізованій раді при Національному фармацевтичному університеті (НФаУ), м. Харків. Доктор фармацевтичних наук з 2003 р. З 2004 р. і до теперішнього часу займає посаду професора кафедри фармакогнозії НФаУ. З 2007 р. Ковальова А. М. є членом Американської асоціації фармакогностів – American Society of Pharmacognosy.

Наукові роботи професора Ковальової А. М. відомі далеко за межами нашої країни та цитуються багатьма вченими світу. На рахунок Алли Михайлівни більш ніж 500 наукових та навчально-методичних робіт. Вона є автором та співавтором 280 статей, 18 навчально-методичних та науково-популярних видань, співавтором 45 авторських свідоцтв і патентів.

Наукові дослідження стали базисом для створення близько 100 оригінальних препаратів, з яких у промислове виробництво впроваджено «Піфламін, таблетки», таблетовані лікарські форми «Хлорофіліпт», «Коргліконт» та ін.

Алла Михайлівна продовжує розпочаті раніше хемотаксономічні дослідження. У 1988 р. вона провела хемотаксономічне і хеморесурсознавче дослідження 15 сортів *Pisum sativum* L., було встановлено хімічний профіль та своєрідність сортів гороху посівного.

З 1991 р. Ковальова А. М. опрацьовує нові підходи до цілеспрямованого пошуку біологічно активних речовин серед рослин флори України та суміжних країн, основним методом системного дослідження флори обрано метод хемотаксономії. Вперше у хемосистематиці рослин поряд із хімічними ознаками Ковальова А. М. використовує морфолого-екологічні ознаки. Основні результати хемотаксономічних досліджень опубліковані в монографії «Современные технологии поиска растительных источников биологически активных веществ на основе многомерного таксономического анализа» (Москва: Ирисгрупп, 2011).

**Основні напрямки наукових інтересів:** вивчення проблеми системного цілеспрямованого дослідження рослинних джерел БАР і створення препаратів різної фармакотерапевтичної дії; фенетико-еколого-таксономічні і ресурсознавчі дослідження флори України та суміжних країн на основі нумеричних методів і теорії графів з використанням програмного забезпечення; розробка методів стандартизації нових лікарських форм, гармонізованих з Європейською фармакопеею; визначення фенетико-таксономічних характеристик родів та родин рослин для виявлення перспективних видів для медицини та вирішення спірних питань систематики.

Алла Михайлівна створила свою наукову школу, яка продовжує розширятися. Під керівництвом Ковальової А. М. було захищено 1 докторську дисертацію і 7 кандидатських дисертацій. Роботи не раз вражали своєю фундаментальністю, значною науковою та практичною новизною.

За сумлінну працю та значний внесок у розвиток вітчизняної освіти, науки та практики Ковальова А. М. нагороджена почесними грамотами ректорату НФаУ, Міністерства освіти і науки України (2006 та 2011), Головного управління освіти і науки Харківської облдержадміністрації (2005); Дипломом фіналіста конкурсу в номінації «Кращий інноваційний проект біофармацевтичного кластеру» в Міжнародному конкурсі інноваційних проектів «Харківські ініціативи» (2010); Дипломом учасника Всеукраїнської програми «Золотий фонд нації» (2011); Дипломом ювіляра України «За віддане служіння Україні» (2011); Дипломом учасника проекту «Обличчя України. Імена. Портрети. Долі» за вагомий внесок у розвиток суспільства (2011); Золотою медаллю Фонду культури України «За високий професіоналізм» (2012). Алла Михайлівна обрана почесним професором НФаУ.

В університеті серед співробітників кафедри та працівників університету, студентів та молодих учених професор Ковальова А. М. користується надзвичайною любов'ю і заслуженою повагою. Крім високих професійних якостей їй притаманні людяність, доброта, порядність, бажання навчати і допомагати.

Алла Михайлівна магічним чином вміє надихати колег та своїх учнів на наукову та педагогічну діяльність, поряд з нею зростають професіонали, які день за днем удосконалюють свої знання та саморозвиваються; завдяки саме їй запалу ідеї та проекти швидко перетворюються на реальність.

**Колектив кафедри фармакогнозії, колеги та друзі щиро вітають Аллу Михайлівну Ковальову з ювілеєм, бажають їй міцного здоров'я і довголіття, невичерпної енергії та насаги для втілення нових і намічених планів, проектів у життя, великого сімейного щастя і добробуту!**

**Матеріали VII Національного конгресу  
патофізіологів України за міжнародною участю  
«Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції»  
5-7 жовтня 2016 р., м. Харків**

**Рецензенти рубрики:**

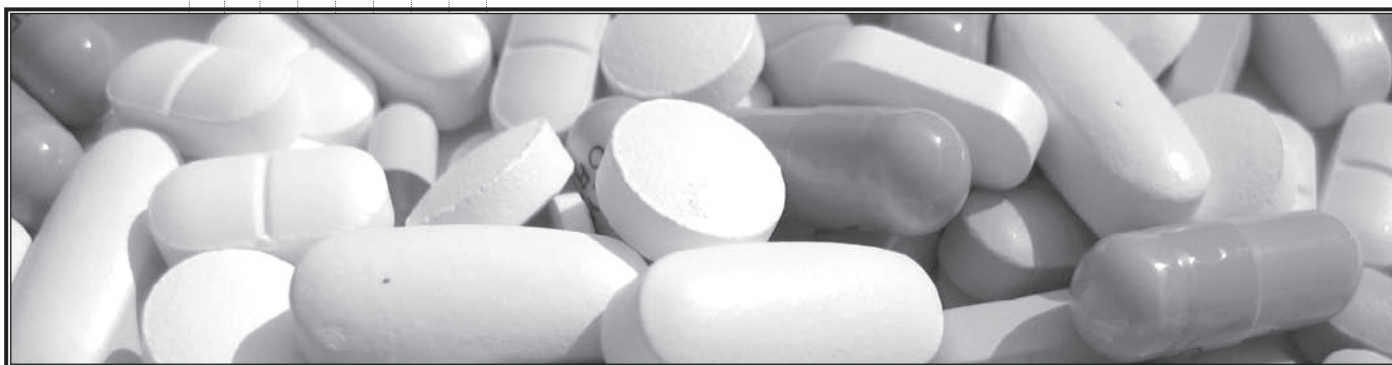
**Малоштан Л. М.,**  
*д. біол. н., професор*

**Загайко А. Л.,**  
*д. біол. н., професор*

**Малиновська І. Е.,**  
*д. мед. н., професор*

**Филимонова Н. І.,**  
*д. мед. н., професор*

**Кононенко Н. М.,**  
*д. мед. н., професор*



UDC 615.214:616.831-005.4+547.8

YU. S. BUKATARU, I. I. ZAMORSKII, S. V. KOLISNYK\*

*State Higher Educational Institution of Ukraine "Bukovina State Medical University"**\*National University of Pharmacy*

## EFFECT OF THE DERIVATIVE OF 2-BENZAMIDO-2-(2-OXOINDOLIN-3-ILIDEN) ACETIC ACID ON THE ACTIVITY OF FREE-RADICAL PROCESSES IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

*In experiments on adult laboratory rats the effect of the derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid under the symbol ZNM on the activity of the lipid and protein peroxidation and antioxidant system in blood plasma and brain, as well as on the activity of the key enzyme of energy metabolism succinate dehydrogenase in the brain of animals with a closed traumatic brain injury (TBI) of moderate severity in comparison with the reference drug mexidol was investigated. It was established that ZNM not significantly concedes to the action of mexidol in its cerebroprotective on antioxidant properties under the conditions of TBI, contributing to normalization of the prooxidant-antioxidant balance in the blood plasma and brain of rats, as well as improving the energy metabolism in the cells of the central nervous system.*

**Key words:** derivatives of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid; mexidol; traumatic brain injury; lipid and protein peroxidation; antioxidant system; energy metabolism

### INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is the most severe and serious pathological condition in the structure of traumatism. TBI continues to be the main cause of death (up to 60 % among injured) and disability of population (25 % of survived patients) in the age group of 20-40 years. Acute period of traumatic disease (TD) is a typical pathological process, called posttraumatic endogenous intoxication (traumatic toxicosis). In TBI brain is the main source of endotoxemia in the body [3, 4]. One of the main pathogenesis factors in acute period of TD in TBI is cerebral hypoxia, which leads to progressive brain tissue acidosis, intracellular edema and depletion of the macroergic compounds pool [10]. In its turn, the processes of an intensification of cell membranes damage initiates, primarily – by lipid peroxidation (LPO), free radical destruction of proteins, inactivation of enzymes and microcirculatory disorders [9].

During the screening studies of the 24 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid derivatives an antihypoxic activity of certain compounds under the conditions of acute hypobaric hypoxia was established [11]. Among the studied derivatives the most significant antihypoxic activity was observed when using compound number 15 (ZNM) [11, 12], which suggests the neuroprotective properties of this substance.

The aim of the study was to establish the impact of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid derivative ZNM on the activity of free radical processes in rats TBI.

### MATERIALS AND METHODS

The research was conducted on 32 white nonlinear mature male rats weighting 180-200 g, divided into 4 groups (n = 8): the first group was injected intraperitoneally the substance ZNM at a dose of 15 mg/kg in the form of an aqueous suspension stabilized by polysorbate 80 (Tween 80) prior the TBI of moderate severity modeling; the second group was administered prior the TBI the reference drug mexidol at a dose of 100 mg/kg; the third (control) group was administered an equivalent amount of solvent; the fourth group – intact control (ether anesthesia without TBI). TBI of moderate severity was modeled under the ether anesthesia with a standardized weight-drop device (0.0495 kg, 0.315 J) inducing a focal blunt injury over the unprotected parietal-occipital head area [2]. Drugs were administered in prophylactic and therapeutic regimen 3 days before (last – 30 minutes prior TBI) and 2 days after it, after which the animals were decapitated under the light ether anesthesia. The animals were kept under the standard vivarium conditions at a constant temperature and humidity with free access to food and water. All manipulations were carried out in accordance with European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

© Bukataru Yu. S., Zamorskii I. I., Kolisnyk S. V., 2016



Table 1

**INFLUENCE OF THE 2-BENZAMIDE-2-(2-OXOINDOLIN-3-ILIDEN) ACETIC ACID DERIVATIVE ZNM ON THE LEVEL OF LIPID AND PROTEIN PEROXIDATION PRODUCTS AND ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN BLOOD OF RATS WITH A CLOSED TRAUMATIC BRAIN INJURY ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ )**

Index	Control	Model pathology (TBI)	TBI + ZNM	TBI + Mexidol
MDA level, $\mu\text{mol/l}$	$9.17 \pm 0.45$	$19.92 \pm 0.56$ $p_1 \leq 0.01$	$11.79 \pm 0.27$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 \leq 0.01$	$15.4 \pm 1.82$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 \leq 0.05$ $p_3 > 0.05$
OMP level, o.d.u./ml	$0.82 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.01$ $p_1 \leq 0.05$	$0.86 \pm 0.03$ $p_1 > 0.05$ $p_2 \leq 0.05$	$0.98 \pm 0.08$ $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
CAT activity, $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{l})$	$24.76 \pm 1.05$	$9.62 \pm 0.14$ $p_1 \leq 0.01$	$12.70 \pm 0.28$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 \leq 0.01$	$11.95 \pm 0.23$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
CP level, mg/l	$156.3 \pm 2.73$	$176.4 \pm 1.17$ $p_1 > 0.05$	$141.9 \pm 7.77$ $p_1 > 0.05$ $p_2 \leq 0.05$	$150.7 \pm 4.34$ $p_1 > 0.05$ $p_2 \leq 0.01$ $p_3 > 0.05$
SH-groups level, $\mu\text{mol/ml}$	$4.33 \pm 0.02$	$1.64 \pm 0.06$ $p_1 \leq 0.01$	$2.7 \pm 0.04$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 \leq 0.01$	$3.4 \pm 0.23$ $p_1 \leq 0.01$ $p_2 \leq 0.01$ $p_3 > 0.05$

Note:  $p_1$  – index of significance comparing to control;  $p_2$  – index of significance comparing to model pathology;  $p_3$  – index of significance comparing to substance ZNM; o.d.u. – optical density units.

To study the free radical processes the plasma and homogenates of the animals' brain were used. Activity of lipid peroxidation was evaluated by the content of malone dialdehyde (MDA), determined by the reaction with 2-thiobarbituric acid and protein peroxidation – by the level of oxidatively modified proteins (OMB), determined by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form hydrazones of the characteristic absorption spectrum [1]. Antioxidant system (AOS) was evaluated by the activity of catalase (CAT) in the reaction with ammonium molybdate, ceruloplasmin level (CP) by the oxidation reaction of phenylenediamine and SH-groups level [7]. The degree of the cellular energy metabolism disturbances in brain was evaluated by the activity of succinate dehydrogenase (SDH) [5]. Statistical analysis of the results was performed using SPSS Statistics 17.0 and Microsoft Excel 2013. Statistical significance was evaluated using parametric Student's t-test (for normal distribution) and non-parametric Mann-Whitney U-test (in case of non-normal distribution). The critical level of significance was accepted with  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

It was experimentally established that TBI is accompanied by a decrease of the antioxidant brain defense, manifested by the deficiency of antioxidant enzymes and non-enzymatic components of AOS (Tab. 1, 2). Thus, in the model pathology (TBI) group a decreased activity of CAT by 2.6 times in plasma, and by 1.6 times – in the brain homogenates was registered. It was accompanied by the

increased level of lipid peroxidation product MDA in blood plasma by 2.2 times and in brain homogenates – by 1.5 times; and an analogous increase of protein peroxidation products (OMB) level both in blood plasma (by 2.2 times) and in brain homogenates (by 1.6 times). Blood level of SH-groups decreased by 2.6 times. The activity of succinate dehydrogenase (SDH) in brain homogenates was decreased by 8.5 times, indicating the significant disturbance of aerobic metabolism in the central nervous system cells, corresponding to expected changes by the literature data [3, 6, 8, 9].

However, in the group of rats administered with the substance ZNM, a normalization of free radical oxidation of macromolecules and AOS activity after TBI was observed. Use of ZNM significantly reduced the level of MDA both in plasma and in brain structures (by 40.8 % and 17.1 % respectively) and OMB level to the control indices. CP content in plasma decreased by 19.6 % and fit the control level, the content of SH-groups increased by 1.6 times. CAT activity increased in blood plasma and didn't differ significantly from that of control in brain homogenates. Under the influence of ZNM the SDH activity in brain structures increased by 2.5 times.

Thus, the substance ZNM with antihypoxic activity [11, 12] normalizes the state of prooxidant-antioxidant balance in the brain structures and in the whole organism of animals with TBI and improves energy metabolism in the cells of central nervous system. This suggests that the derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid ZNM has antioxidant and cerebroprotective properties.

Table 2

**INFLUENCE OF THE 2-BENZAMIDE-2-(2-OXOINDOLIN-3-ILIDEN) ACETIC ACID DERIVATIVE ZNM ON THE LEVEL OF LIPID AND PROTEIN PEROXIDATION PRODUCTS, CATALASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BRAIN OF RATS WITH A CLOSED TRAUMATIC BRAIN INJURY (M ± m, n = 8)**

Index	Control	Model pathology (TBI)	TBI + ZNM	TBI + Mexidol
MDA level, μmol/g of protein	24.3 ± 0.13	35.7 ± 0.69 p <sub>1</sub> ≤ 0.05	29.6 ± 0.68 p <sub>1</sub> ≤ 0.05 p <sub>2</sub> ≤ 0.01	21.9 ± 0.64 p <sub>1</sub> > 0.05 p <sub>2</sub> ≤ 0.01 p <sub>3</sub> ≤ 0.05
OMP level, o.d.u./g of protein	11.23 ± 0.46	17.73 ± 0.34 p <sub>1</sub> ≤ 0.05	12.87 ± 1.87 p <sub>1</sub> > 0.05 p <sub>2</sub> ≤ 0.05	15.84 ± 0.64 p <sub>1</sub> > 0.05 p <sub>2</sub> > 0.05 p <sub>3</sub> > 0.05
CAT activity, μmol/(min×mg of protein)	10.05 ± 2.50	6.30 ± 0.93 p <sub>1</sub> ≤ 0.01	8.54 ± 0.90 p <sub>1</sub> > 0.05 p <sub>2</sub> > 0.05	7.32 ± 0.64 p <sub>1</sub> > 0.05 p <sub>2</sub> > 0.05 p <sub>3</sub> > 0.05
SDH activity, nmol/(min×mg of protein)	9.67 ± 0.43	1.14 ± 0.14 p <sub>1</sub> ≤ 0.01	2.85 ± 0.19 p <sub>1</sub> ≤ 0.01 p <sub>2</sub> ≤ 0.01	3.15 ± 0.26 p <sub>1</sub> ≤ 0.01 p <sub>2</sub> ≤ 0.01 p <sub>3</sub> > 0.05

Note: The symbols are the same as in the Tab. 1.

The action of substance ZNM coincides to the effect of reference drug mexidol. Although the substance ZNM slightly concedes to antioxidant effect of mexidol in reduction of the lipid peroxidation in brain cells (Tab. 2), but exceeds the effect of mexidol in normalization of protein peroxidation in the cells of brain and MDA level in blood plasma. Concerning other investigated parameters in blood plasma and brain structures, any of significant difference between the actions of ZNM and mexidol wasn't revealed (Tab. 1, 2).

### CONCLUSIONS

1. The derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid ZNM exhibits antioxidant and cerebroprotective properties under the conditions of closed brain injury of moderate severity, contributing to normalization of the prooxidant-antioxidant balance in plasma and brain of rats and improving energy metabolism in cells of the central nervous system.
2. The derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid ZNM doesn't concede significantly to the effect of reference drug mexidol under the conditions of a closed traumatic brain injury of moderate severity in the normalization of energy metabolism in nerve cells of rats and prooxidant-antioxidant balance in plasma and brain.

### REFERENCES

1. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: [метод. рекоменд.] / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. – С.Пб.: Фолиант, 2000. – 53 с.
2. Ельский В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев. – Донецк: Новый мир, 2008. – 140 с.
3. Ельский В. Н. Перекисное окисление липидов при черепно-мозговой травме / [В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев, Е. Д. Якубенко и др.] // Общая реаниматол. – 2009. – Т. 4. – С. 24-30.
4. Зарубина И. В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов. – С.Пб.: Изд-во Н-Л, 2004. – 368 с.
5. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М., 2009. – 880 с.
6. Мерецький В. М. Порушення функціонального стану прооксидантної і антиоксидантної систем у крові тварин при черепно-мозковій травмі на тлі експериментального цукрового діабету // Шпитальна хірургія. – 2012. – № 3. – С. 65-69.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 272 с.
8. Шевчук О. В. Антиоксидантний профіль організму щурів із закритою черепно-мозковою травмою на тлі корекції А-ліпоевою кислотою // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Укр. мед. стоматол. академії. – 2007. – Т. 7, Вип. 1-2 (17-18). – С. 91-94.
9. Dash K. P. Biomarkers for the Diagnosis, Prognosis, and Evaluation of Treatment Efficacy for Traumatic Brain Injury / K. P. Dash, J. Zhao, G. Hergenroeder, N. A. Moore // Neurotherapeutics. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 100-114.
10. Ragaisis V. Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment / V. Ragaisis // Medicina. – 2002. – Vol. 38, № 3. – P. 243-249.

11. Zamorsky I. I. Screening of derivatives of 2-(benzoylamino)(1-r-2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid under the conditions of acute hypobaric hypoxia / [I. I. Zamorsky, Yu. S. Bukataru, E. L. Lenga et al.] // Вісник фармації. – 2016. – № 1 (85). – С. 67-70.
12. Zamorsky I. I. Activity definizione antihypoxants in derivati del 2-benzammide-2-(2-oksoindolin-3-ili-dene)-vinegary acido in acuta ipossia iperbarica / [I. I. Zamorsky, Yu. S. Bukataru, S. V. Kolesnik et al.] // Ital. Sci. Rev. – 2016. – № 1 (34). – P. 79-83.

**УДК 615.214:616.831-005.4+547.8****Ю. С. Букатару, І. І. Заморський, С. В. Колісник****ВПЛИВ ПОХІДНОГО 2-БЕНЗАМИДО-2-(2-ОКСОИНДОЛІН-3-ІЛІДЕН) ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЧЕРЕПНОМОЗКОВІЙ ТРАВМІ**

В експериментах на статевозрілих лабораторних щурах досліджено дію похідного 2-бензамідо-2(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти під умовною назвою ZNM на активність вільнорадикального окиснення ліпідів і білків та стан антиоксидантної системи в плазмі крові та головному мозку, а також активність ферменту енергетичного обміну сукцинатдегідрогенази в головному мозку при закритій черепномозковій травмі (ЧМТ) середньої тяжкості у порівнянні з антигіпоксантом мексидолом. Встановлено, що ZNM суттєво не поступається дії мексидолу при ЧМТ щодо антиоксидантних і церебропротекторних властивостей, сприяючи нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу в плазмі крові та головному мозку щурів, а також покращуючи енергетичний обмін у клітинах центральної нервової системи.

**Ключові слова:** похідне 2-бензамідо-2(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти; мексидол; черепномозкова травма; ліпідна і білкова пероксидація; антиоксидантна система; енергетичний обмін

**УДК 615.214:616.831-005.4+547.8****Ю. С. Букатару, І. І. Заморський, С. В. Колісник****ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО 2-БЕНЗАМИД-2(2-ОКСОИНДОЛИН-3-ИЛИДЕН) УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

В экспериментах на половозрелых лабораторных крысах исследовано действие производного 2-бензамид-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной кислоты под условным обозначением ZNM на активность липидной и белковой пероксидации и состояние антиоксидантной системы в плазме крови и головном мозге, а также активность фермента энергетического обмена сукцинатдегидрогеназы в головном мозге при закрытой черепномозговой травме (ЧМТ) средней тяжести по сравнению с антигипоксантом мексидолом. Установлено, что ZNM существенно не уступает действию мексидола при ЧМТ по антиоксидантным и церебропротекторным свойствам, способствуя нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса в плазме крови и головном мозге крыс, а также улучшая энергетический обмен в клетках центральной нервной системы.

**Ключевые слова:** производное 2-бензамид-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной кислоты; мексидол; черепномозговая травма; липидная и белковая пероксидация; антиоксидантная система; энергетический обмен

Адреса для листування:

58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2.

Тел. (0372) 55-37-54. E-mail: office@bsmu.edu.ua.

ДВНЗ України «Буковинський державний медичний університет»

Надійшла до редакції 08.04.2016 р.

UDC 617.7-07.681-092

I. N. MIKHEYTSEVA, V. N. YELSKIY

*The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine*

## OXIDATIVE STRESS CORRECTION WITH METABOLIC PREPARATIONS, NEW POSSIBILITIES OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN PRIMARY GLAUCOMA

*There were studied antioxidant action of water-soluble form of quercetin – corvutin and melatonin in rabbits with glaucoma model. It was shown intravenous injections of corvutin essentially decreased oxidative stress in animals with advanced stage of experimental glaucoma. Prophylactic-protective apply of melatonin on the basis of model induction in significant degree protected oxidative stress development.*

Key words: quercetin; melatonin; glaucoma; oxidative stress

### INTRODUCTION

Today it is known that mechanisms of free radical damage and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of primary glaucoma, contributing primarily formation of glaucomatous optic neuropathy [15, 22]. The formation of active atoms or molecules with unpaired electron in an outer orbit, so-called free radicals, in the body takes place continuously. However, under physiological conditions, the amount and rate of their formation is compensated by the speed of the elimination with antioxidants. Imbalance in the amount and activity of pro-oxidants and antioxidants leads to oxidative stress. This mechanism, in turn, can lead to damage of cell macromolecules, membrane degradation and change functions that contribute to making cell death.

According to some authors [17, 12] the formation of oxidative stress caused by unstable ocular blood flow is one of the main risk factors for glaucomatous optic neuropathy. As it states in repeated mild reperfusion, as a consequence of unstable blood flow, a large amount of free radicals is formed. Reperfusion injury occurs when the blood supply returns to the tissue after a period of ischemia. This mechanism is probably the most traumatic for the eye tissues, especially the nervous structures of the eye. Oxidative stress, which occurs in the conditions of reperfusion, the most severely damages the mitochondria. These organelles are present in large numbers in the optic nerve, as a structure with high energy consumption. The damage of the mitochondria disrupts the production of energy, leading to malnutrition and neural cell degeneration [11].

Besides effects on the nervous tissue, glaucoma oxidative stress may cause degeneration of the trabecular

meshwork and be thus trigger mechanism for raising intraocular pressure (IOP), changing the paths of outflow of intraocular fluid [21, 10]. The idea of a pathogenic role of oxidative stress in raising IOP is supported by a number of researchers. Thus, it was shown that patients with primary open angle glaucoma (POAG) had have a decrease in the total antioxidant activity of intraocular fluid, reduced glutathione levels [10, 13]. The use of antioxidants in an attempt to treat glaucoma was started by S.C. Evans. He used of large doses of vitamins A and C [9, 16]. It was assumed that vitamin A supports dehydrated status of collagen in the eye drainage system, and hydration of collagen structures in the outflow tract leading to increased IOP. High doses of vitamin C reduce IOP by osmotic effect, although this method is hardly practical use for the control of glaucoma in the present conditions.

In this regard, it is important that the treatment strategy of glaucoma gradually changes. It is receding into the past approach to doctoring it as a disease, not related to other organs and the organism as a whole. In search of strategies to treat this pathology as the suffering of “a sick organ in a sick body” the use antioxidants with systemic effects is reasonable. The use of the natural origin medication with minimal side effects, in our view, is the most appropriate. In this direction, carried out a study on the effectiveness of glaucoma treatment with the antioxidant effect drugs such as lipoic acid [6], pyridine derivative (an analogue of vitamin B6) emoksipin [1], carotenoids of ginkgo biloba extract and lutein [4, 20].

In the study of the possibility of increasing the effectiveness of antioxidant effects in primary glaucoma our focus attracted such biologically active substances with a very powerful antioxidant potential as quercetin and melatonin. The antioxidant properties of bioflavonoids quercetin are determined by its chemical structure, which

© Mikheyitseva I. N., Yelskiy V. N., 2016



allows it to counteract the damaging effects of reactive oxygen species and free radicals, i. e., are natural scavengers. In addition to the ability to be "free radical scavengers", quercetin prevents lipid peroxidation and chelating metal ions [14]. It's proved for Quercetin neuroprotective possibility in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, epilepsy, stroke) and cardioprotective effects in cardiovascular diseases. The mechanism of this protection is linked with the antioxidant activity of quercetin [3, 7, 23].

Melatonin is a synthesis product of a pineal gland (epiphysis) and other organs, including the retina, has been known mainly as a regulator of circadian rhythms in the body. Recently it became known antioxidant properties of melatonin. It has been identified as a direct scavenger of free radicals [19] and indirect antioxidant – regulator of antioxidant enzymes activity [18]. Melatonin is highly active endogenous antioxidant and its lipophilic properties allows it to diffuse into the various cell compartments and provide a protective effect against cytotoxic free radicals both in the cytoplasm and in the nucleus. Clinical trials have shown that the antioxidant properties of melatonin may be effective in the treatment of acute medical conditions (sepsis, asphyxia) or chronic diseases (metabolic and neurodegenerative diseases, cancers, inflammation) [8].

The purpose of our study was to investigate the antioxidant activity of melatonin and quercetin preparations on glaucoma model in rabbits.

#### MATERIALS AND METHODS

As a quercetin-containing preparation we used domestic product Corvutin for injection, which is a freeze-dried substance of quercetin with polyvinylpyrrolidone as a modifier of solubility. We also used domestic product Vita-melatonin. It is a synthetic analog of neuropeptide melatonin produced by the pineal gland.

The investigations were carried out on rabbits, which glaucoma was caused by systemic administration of adrenaline according to the developed scheme [5]. The study includes the following groups: control group – healthy animals; advanced glaucoma model (GM), a glaucoma model, treated with Corvutin (GMC); a reproducible of glaucoma model with introduction of melatonin (GMM).

In GMC group rabbits with developed experimental glaucoma obtained Corvutin as 10 daily intravenous infusions (2 % solution of the preparation in isotonic saline) at a dose of 10 mg/0.5 ml.

In GMM group rabbits obtained Melatonin in the form of an aqueous suspension per os at a dose of 0.3 mg for 4 months: the entire period of the modeling, as well as before and 2 weeks after the induction of the model.

Biochemical studies were conducted in animal blood plasma. Malonic dialdehyde (MDA) was determined by reaction with thiobarbituric acid, the total antioxidant activity of blood plasma (TAOA) – using a model system with linolenic acid. The statistical data processing was carried out using t-test.

Table

#### OXIDATIVE STRESS LEVELS IN RABBITS WITH GLAUCOMA MODEL UNDER ADMINISTRATION OF QUERCETIN- AND MELATONIN-CONTAINING PREPARATIONS

	Groups	Statistic Indices	Metabolic Indices	
			MDA (нМ/мл)	TAOA (%)
I	Control (n = 20)	M ± m	0.58 ± 0.02	52.3 ± 0.72
II	GM (glaucoma) (n = 23)	M ± m p <sub>1</sub> <	1.18 ± 0.03 0.001	34.0 ± 0.87 0.001
III	GMC (glaucoma + corvutin) (n = 15)	M ± m p <sub>1</sub> < p <sub>2</sub> <	0.71 ± 0.02 0.01 0.001	43.9 ± 0.92 0.001 0.001
IV	GMM (glaucoma + melatonin) (n = 21)	M ± m p <sub>1</sub> p <sub>3</sub> <	0.66 ± 0.03 > 0.05 0.001	45.4 ± 1.03 <0.01 0.001

Note: p<sub>1</sub> – comparing with control; p<sub>2</sub> – comparing III c II; p<sub>3</sub> – comparing IV c II.

#### RESULTS AND DISCUSSION

Our study of pro- and antioxidant status of animals with the induced glaucoma have confirmed our previous results [2] and found a high level of oxidative stress in animals of group GM. It has been manifested by an increase in the content of secondary product of lipid peroxidation MDA by 103 % (compared to control), and a decrease in antioxidant status, reflected in a reduction of 40 % TAOA in blood plasma (Table).

Introduction of Corvutin intravenous injections to GMC group rabbits with the ocular and metabolic functions disorders has largely hindered severity of oxidative stress in them. In this group MDA levels compared to the control was increased by 22 % and TAOA reduced by 16.1 %. Comparing the severity of oxidative stress in the GMC and GM groups it has been revealed that under the influence of Corvutin high MDA levels have been decreased by 39.2 % and TAOA has been increased by 40.3 % in blood of rabbits with developed glaucoma.

Under long-term administration of melatonin in GMM group has been largely prevented the development of oxidative stress in the simulation of glaucoma. Thus, the content of MDA in a month after the 4-months administration of melatonin has been increased by 13.7 % and TAOA – reduced by 13.2 % compared with the control. When comparing these results with the untreated GM group, MDA levels has been lower by 44.1 % and TAOA – above by 33.5 % under the action of melatonin.

Thus, the study of the activity of quercetin-containing Corvutin and melatonin in the experiment showed that both of these compounds with known antioxidant properties proved to be effective in the inducing of glaucoma in rabbits by means of chronic stressing adrenaline. Both of these substances expressed direct antioxidant property as scavengers of free radicals, which are indirectly judged by the decrease the level of secondary lipid peroxidation product in the blood of experimental animals. Furthermore, as quercetin and melatonin in our experi-



ment acted also as indirect antioxidants, activating anti-oxidant system, which we concluded to increase TAOA of blood. Wherein melatonin has been used long in prophylactically – tread mode, namely, during induction of the adrenaline glaucoma model, before and after the cessation of administration of epinephrine. It is possible to largely stop the development of oxidative stress, preventing a substantial increase in free-radical processes and activating the antioxidant defense system.

### CONCLUSIONS

1. Introduction of 10 intravenous injections of quercetin-containing Corvutin to rabbits with advanced stage of glaucoma model significantly reduced the severity of oxidative stress in them.
2. Preventive and treat administration of the stress protective hormone melatonin during 4 months in rabbits with reproducible adrenaline glaucoma model has largely prevented the formation of oxidative stress in them.
3. The experimental data, which showed significant anti-oxidant effects of Corvutin and melatonin in experimental glaucoma, can serve as a basis for recommending the use of these preparations in the clinic of primary glaucoma.

### REFERENCES

1. Краморенко Ю. С. Эмоксипин в лечении первичной глаукомы / Ю. С. Краморенко, Т. А. Добрица, З. А. Иманбаева, Е. А. Егоров // Вестник офтальмол. – 1992. – № 1. – С. 14-15, 17.
2. Михейцева И. Н. Оксидативный стресс и эндотелиальная дисфункция как патогенетические факторы в глаукомном процессе / И. Н. Михейцева // Патол. – 2008. – Т. 5, № 3. – С. 125-126.
3. Мойбенко А. А. Эффективность водорастворимой формы кверцетина (Корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST / А. А. Мойбенко, А. Н. Пархоменко, С. Н. Кожухов // Журн. НАМН України. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 361-370.
4. Мошетьова Л. К. Лютеин-комплекс в лечении глаукомной оптической нейропатии / Л. К. Мошетьова, И. Б. Алексеев, А. В. Ивашина // Клини. офтальмол. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 67-69.
5. Пат. України № 61478 А 61 К. Спосіб моделювання адреналін-індукованої глаукоми у кролів / І. М. Михейцева. – Опубл.: 25.07.11. – Бюл. № 14.
6. Филина А. А. Антиоксидантная терапия первичной глаукомы / А. А. Филина // Вестник офтальмол. – 1994. – Т. 110, № 1. – С. 33-35.
7. Ansari M. A. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease / [M. A. Ansari, H. M. Abdul, G. Joshi et al.] // J. Nutr. Biochem. – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 269-275.
8. Bonnefont-Rousselot D. Melatonin: action as anti-oxidant and potential applications in human disease and aging / D. Bonnefont-Rousselot, F. Collin // Toxicol. – 2010. – Vol. 278. – P. 55-67.
9. Evans S. C. Ophthalmic nutrition and prevention of eye disorder and blindness // Nutrition Metabolism. – 1977. – Vol. 21. – P. 268-272.
10. Ferreira S. M. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients / [S. M. Ferreira, S. F. Lerner, R. Brunzini et al.] // Am. J. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 137. – P. 62-69.
11. Flammer J. Glaucomatous optic neuropathy: a reperfusion injury // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. – 2000. – Vol. 218. – P. 290-291.
12. Flammer J. What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? / J. Flammer, M. Mozaffarieh // Surv. Ophthalmol. – 2007. – Vol. 52. – P. 162-173.
13. Gherghel D. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma / [D. Gherghel, H. R. Griffiths, E. J. Hilton et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol. 46. – P. 877-883.
14. Harwood M. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties / [M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J. F. Borzelleca et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2007. – Vol. 45. – P. 2179-2205.
15. Izzotti A. The role of oxidative stress in glaucoma / A. Izzotti, A. Bagnis, S. C. Sacca // Mutat. Res. – 2006. – Vol. 612. – P. 105-114.
16. Krishna S. M. Vitamin A and primary glaucoma / S. M. Krishna, P. K. Shukla // J. Glaucoma. – 1982. – Vol. 4. – P. 226-227.
17. Mozaffarieh M. Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma / M. Mozaffarieh, M. Grieshaber, J. Flammer // Mol. Vis. – 2008. – Vol. 14. – P. 224-233.
18. Reiter R. J. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging / R. J. Reiter, D. X. Tan, L. C. Manchester, M. R. El-Sawi // Ann. NY Acad. Sci. – 2002. – Vol. 959. – P. 238-250.
19. Reiter R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free radicals / R. J. Reiter // News Physiol. Sci. – 2000. – Vol. 15. – P. 246-250.
20. Ritch R. Potential role ginkgo biloba extract in the treatment of glaucoma / R. Ritch // Med. Hypotheses. – 2000. – Vol. 54, № 2. – P. 221-235.
21. Sacca S. C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress / S. C. Sacca, A. Izzotti, P. Rossi, C. Travasso // Exp. Eye Res. – 2007. – Vol. 84. – P. 389-399.
22. Tezel G. Oxidative stress in glaucoma neurodegeneration: mechanism and consequences // Prog. Retin Eye Res. – 2006. – Vol. 25, № 5. – P. 490-513.
23. Vauzour D. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects / [D. Vauzour, K. Vafeiadou, A. Rodriguez-Mateos et al.] // Genes Nutr. – 2008. – № 3. – P. 115-126.

**УДК 617.7-07.681-092****І. М. Михейцева, В. М. Єльський****КОРЕКЦІЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ МЕТАБОЛІЧНИМИ ЗАСОБАМИ, НОВІ МОЖЛИВОСТІ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ПЕРВИННІЙ ГЛАУКОМІ**

Вивчено на моделі глаукоми у кролів антиоксидантну дію водорозчинної форми кверцетину-корвітину та препарату мелатоніну. Показано, що курс внутрішньовенних введень корвітину суттєво знизив оксидативний стрес у тварин з розвитом стадією експериментальної глаукоми. Профілактично-протекторне введення мелатоніну на тлі індукції моделі значною мірою завадило розвитку оксидативного стресу.

**Ключові слова:** кверцетин; мелатонін; глаукома; оксидативний стрес

**УДК 617.7-07.681-092****И. Н. Михейцева, В. Н. Ельский****КОРРЕКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ СРЕДСТВАМИ, НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ГЛАУКОМЕ**

На модели глаукомы у кроликов изучено антиоксидантное действие водорастворимой формы кверцетина – корвитина и препарата мелатонина. Показано, что курс внутривенных инъекций корвитина существенно снизил оксидативный стресс у животных с развитой стадией экспериментальной глаукомы. Профилактически-протекторное длительное введение мелатонина на фоне индукции модели в значительной степени предотвратило развитие оксидативного стресса.

**Ключевые слова:** кверцетин; мелатонин; глаукома; оксидативный стресс

*Адреса для листування:*

65061, м. Одеса, Французький бульвар, 49/51.  
ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії  
ім. В. П. Філатова НАМН України»

Надійшла до редакції 11.04.2016 р.

UDC 616.12.008.331.1+616.153.96

L. S. MKHITARYAN, O. B. KUCHMENKO, O. G. KUPCHYNKA, I. N. IEVSTRATOVA,  
N. M. VASYLYNCHUK, M. P. MOSTOVYAK, T. F. DROBOTKO

National Scientific Centre "Strazhesko Institute of Cardiology" NAMS of Ukraine

## PROTEIN FACTORS OF OXIDATIVE STRESS AND ATHEROGENESIS IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

*The aim of this study was to evaluate the protein components of HDL in patients with arterial hypertension (AH). The study included 30 patients (mean age of  $47.4 \pm 3.3$  years) with AH 2 grade. The accumulation of carbonyl oxidation protein products in blood, HDL and LDL eventually results in oxidative modification of HDL and LDL, and loss of its functional properties. The activity of HDL-associated enzymes (PON1 and MPO) is the most informative indicator of functional state of HDL, and not the level of HDL-Cholesterol. Changes of MPO and PON1 activity may serve as a useful marker of dysfunctional HDL. Our evaluation showed a significant decrease of PON1 activity and increase of MPO activity that may contribute to the HDL oxidation, irrespective of HDL-Cholesterol levels. Demonstrated changes in the functional state of HDL, in our opinion, create a predisposition to development and progression of atherosclerosis in patients with AH.*

**Key words:** arterial hypertension; atherogenesis; oxidative stress; paraoxonase-1; myeloperoxidase

### INTRODUCTION

Arterial hypertension (AH) remains the one of the most significant problem due to its wide prevalence in the world. Over 40 % of the adult population of Ukraine has increased arterial pressure. On the other hand, AH is an important risk factor for major cardiovascular diseases and especially atherosclerosis. It is associated with high mortality and disability due to myocardium infarction, stroke and heart failure [1, 9]. It is known that systemic inflammation with the formation of oxidative stress and endothelial dysfunction are important in the development of AH [1, 11, 17, 18]. These factors are also known to be in the basis of development of atherosclerosis [3, 11, 18]. Numerous experimental and clinical studies have shown that free radical modification of LDL and VLDL on a background of inflammation and oxidative stress underlie increased blood atherogenic potential; and potentiate the mechanisms of initiation and progression of atherogenesis.

In the assessment of lipid metabolism in patients with AH the quantitative indexes of lipoproteins and level of lipoprotein cholesterol are usually taken into account. These indexes are used in clinical practice to assess the treatment efficiency, especially in order to employ the lipid-lowering drugs in the complex treatment. According to modern studies the qualitative status of lipoproteins and their atherogenic or antiatherogenic properties are determined by corresponding proteins – apoproteins and

enzymes. The activity of these enzymes is more important than indicators of their blood levels or lipoprotein cholesterol content [3, 9, 12, 13]. Atheroprotective activities of HDL are thought to be mediated in part by both ApoA1 within the core lipoprotein particle and an assortment of HDL-associated proteins. HDL particle enriched in paraoxonase-1 (PON1) (EC 3.1.8.1), an atheroprotective protein, have been linked to the antioxidant, anti-inflammatory, and lipid cargo-carrying functions of HDL. PON1 has been shown to help HDL prevent the accumulation of lipid peroxides in oxidized LDL (low-density lipoproteins), inactivate bioactive oxidized phospholipids, stimulate HDL-mediated eNOS-dependent NO production, and enhance cholesterol efflux from cholesterol-laden macrophages [3, 9, 14, 16]. Myeloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7), like PON1, both binds to HDL and is mechanistically linked to oxidative stress and atherosclerosis. MPO is released from activated leukocytes in the activation of the inflammatory reaction. Excessive activation of MPO can lead to oxidative modification of LDL and HDL, inactivation of PON1, and oxidative modification of different macromolecules, contributing to the development of atherogenesis. MPO plays an important role in the vascular damage mediated by leukocytes [4, 5, 12, 16]. In this regard, according to many studies, MPO can act as a marker of determination of character of the inflammation, the intensity of oxidative stress and development of endothelial dysfunction [5, 12]. The aim of this study was to evaluate the qualitative status of the main classes of lipoproteins together with the activity of corresponding enzymes in patients with AH.

© Group of authors, 2016

Table 1

**CONTENT OF CARBONYL PRODUCTS OF PROTEIN OXIDATION, FREE RADICAL OXIDATION LIPID PRODUCTS, AND ACTIVITY OF PON1, CATALASE, SUPEROXIDEDISMUTASE AND MPO IN PATIENTS WITH AH (M ± m)**

Indexes	Control group (healthy persons), n = 15	Patients with AH, n = 30
PON1 activity, kU/l	5.66 ± 0.93	2.02 ± 0.34*
TBA-positive products, U/l	9.11 ± 0.21	11.06 ± 0.14*
Catalase activity, U/l	9.11 ± 0.44	7.78 ± 0.51*
Superoxide dismutase activity, U/l	1281 ± 121	1708 ± 140*
Carbonyl products of protein oxidation in serum, conv.u./ml	4.13 ± 0.16	5.55 ± 0.22*
Carbonyl products of protein oxidation in LDL + VLDL fraction, conv.u. × mg <sup>-1</sup> of lipids	0.57 ± 0.05	0.81 ± 0.06*
Carbonyl products of protein oxidation in HDL fraction, conv.u./ml	1.82 ± 0.07	2.04 ± 0.09*
Degree of oxidative modification of LDL+VLDL, conv.u./mg of lipids	2.41 ± 1.10	3.49 ± 0.30*
MPO activity, conv.u./min	0.00242 ± 0.0005	0.0031 ± 0.0004*

Note: \* – The difference with Control group is statistically significant; P ≤ 0.05.

### MATERIALS AND METHODS

The study included 30 patients (mean age of 47.4 ± 3.3 years) with AH 2 grade, who received basic therapy according to the Recommendation of the European Society of Cardiology and the Association of Cardiologists of Ukraine. All patients were subjected to a set of necessary general and functional diagnostic methods. As control group we enrolled 15 healthy persons (mean age of 49.2 ± 2.1 years).

Blood biochemistry assays were performed in all subjects. Level of carbonyl oxidation protein products in serum, HDL and LDL + VLDL fractions was evaluated spectrophotometrically after [2]. Level of TBA-positive products in serum was assayed after [19]. The degree of oxidative modification of LDL + VLDL was determined spectrophotometrically after [7]. Activity of catalase and superoxide dismutase in serum were assayed spectrophotometrically and spectrofluorometrically after [8] and [15], correspondingly. Activities of PON1 in serum and MPO in plasma were assayed after [14] and [5] correspondingly. Serum lipid parameters were measured, such as total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol. The differences were considered to be statistically significant at P < 0.05.

### RESULTS AND DISCUSSION

We found that arylesterase activity of PON1 decreases by 65 % in patients with AH compared with the control group (Tab. 1). PON1 hydrolyses lipid peroxides and promotes elimination of oxidized LDL, cholesterol biosynthesis inhibition and stimulation of HDL-mediated cholesterol efflux from macrophages [3, 9]. PON1 protects HDL from oxidation and together with other HDL-associated proteins and enzymes determines antioxidant, anti-inflammatory and antiatherogenic properties of HDL [9]. Decrease of arylesterase activity of PON1 correlates with increase of content of lipid peroxidation products, including the TBA-positive products in serum by 21 % if compared with control (Tab. 1). Activation of free radical pro-

tein oxidation is higher in patients with AH. This is evidenced by increase of carbonyl products of protein oxidation in serum by 35 %. The increase of carbonyl products of protein oxidation in HDL and LDL + VLDL fractions by 20 % and 41 %, correspondingly, is noticeable in comparison with healthy persons (Tab. 1). This may indicate oxidative modification of these particles. These changes, together with accumulation of TBA-positive products in HDL and LDL + VLDL fractions are the basis for formation of high blood atherogenic potential. These changes are taking place against a background of reduced enzyme activity level of antioxidant protection system. Thus, the activity of superoxide dismutase and catalase in serum of patients with AH decreases by 33 % and 15 %, correspondingly (Tab. 1). These changes reflect the general reaction of the organism and indicate the formation of oxidative stress involving both lipid and protein factors, and inhibition of antioxidant defense mechanisms aimed against increase in content of ROS and free radical oxidation products of macromolecules.

MPO activity increases in plasma of patients with AH by 27 % compared with healthy persons (Tab. 1). Today there is much evidence of the important role of leukocytes in the vascular lesions. In particular, the activation of leukocytes can serve as an alternative risk factor for atherosclerosis. MPO contained in azurophilic granules of neutrophils and released into the extracellular space in the activation of these cells [10, 11, 12]. The demonstrated increased MPO activity in patients with AH indicates the presence of inflammatory response.

In circulation MPO forms a complex with HDL-associated enzyme PON1. PON1 partially inhibits the activity of MPO, while MPO is able to inactivate PON1, oxidizing the tyrosine-71 residue, which leads to disruption of interaction between the enzyme molecule and HDL. As a result of the leukocytes activation MPO produces a number of reactive oxygen species, which can lead to damage to lipoprotein particles. MPO can bind to endothelium and aggravate the local inflammation of blood vessels [6, 16].



Table 2

**THE CONTENT OF LIPIDS IN BLOOD OF PATIENTS  
WITH AH (M ± m)**

Parameter	Control group (healthy persons), n = 15	Patients with AH, n = 30
Cholesterol, μmol/l	4.45 ± 0.15	4.93 ± 0.36
Triglycerides, μmol/l	1.45 ± 0.17	1.88 ± 0.13*
Cholesterol-HDL, μmol/l	1.12 ± 0.09	1.22 ± 0.08
Cholesterol-LDL, μmol/l	2.10 ± 0.19	2.70 ± 0.21*
Coefficient of atherogeneity	2.70 ± 0.35	2.88 ± 0.29

Note: \* – The difference with Control group is statistically significant; P ≤ 0.05.

The results of quantitative determination of component content of lipids in patients with AH are shown in Tab. 2. Our studies demonstrate no significant differences in lipid status in patients with AH in comparison to control group, with the exception of triglycerides and LDL cholesterol, which are respectively 29 % and 28 % above the reference value.

It should be noted that despite the relative normalization of content of lipids, activation of free radical oxidation reactions, as indicated by significantly higher levels of lipid and protein oxidation product in serum remains in patients with AH.

Catalase and superoxide dismutase activities are decreased in patients with AH in comparison to control. These changes indicate the presence of imbalance between pro- and antioxidant systems. Noteworthy, the degree of oxidative modification of LDL + VLDL is increased by 45 % in patients with AH (Tab. 1). Content of carbonyl products of protein oxidation in HDL fraction also increases by 20 % compared with the control group. This may be due to inhibition of PON-1 activity, which is responsible for protecting HDL, and activation of MPO activity, which is aimed at peroxidation of lipoprotein particles and other macromolecules that participate in the processes of atherogenesis and progression of the pathological process in atherogenesis.

### CONCLUSIONS

1. The accumulation of carbonyl products of protein oxidation in blood, HDL and LDL eventually results in oxidative modification of HDL and LDL, and loss of their functional properties.
2. Our evaluation showed a significant increase of MPO activity and decrease of PON1, catalase and superoxide dismutase activity in patients with AH.
3. Changes of MPO and PON1 activity may serve as a useful marker of dysfunctional HDL. The ratio "MPO/PON1" can be used as a predictor of inflammatory response and atherosclerotic process and to evaluate the effectiveness of treatment.
4. The activity of HDL-associated enzymes (PON1 and MPO) is the most informative indicator of functional state of HDL, and not the level of HDL-cholesterol.

5. Demonstrated changes in the functional state of HDL, in our opinion, create a predisposition to development and progression of atherosclerosis in patients with AH.

### REFERENCES

1. Dinh Q. N. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension / Q. N. Dinh, G. R. Drummond, C. G. Sobey, S. Chrissobolis // *Bio-med. Res. Int.* – 2014. Doi: 10.1155/2014/406960.
2. Dubinina E. E. Oxidative modification of serum proteins. A method of determination it / E. E. Dubinina, S. O. Burmistrov, D. A. Khodov, I. G. Porotov // *Vopr. Med. Khim.* – 1995. – Vol. 41, № 1. – P. 24-26.
3. Eren E. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis / E. Eren, N. Yilmaz, O. Aydin // *Cholesterol.* – 2013. – Article ID 792090. – 10 p.
4. Fu X. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase / X. Fu, S. Y. Kassim, W. C. Parks, J. W. Heinecke // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 44. – P. 41279-41287.
5. Gorudko I. V. Increased myeloperoxidase activity is a risk factor for ischemic heart disease in patients with diabetes mellitus / [I. V. Gorudko, V. A. Kostevich, A. V. Sokolov et al.] // *Biomed. Khim.* – 2012. – Vol. 58, № 4. – P. 475-484.
6. Huang Y. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex / [Y. Huang, Zh. Wu, M. Riwaneto et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123, № 9. – P. 3815-3828.
7. Ievstratova I. N., Mkhitarian L. S. A method of diagnosis of progressive atherosclerosis, Patent of Ukraine № 30972 A, № 2, 2000.
8. Koroluk M. A. A method of determination of catalase activity / M. A. Koroluk, M. I. Ivanova // *Laboratornoe delo.* – 1988. – № 1. – P. 16-18.
9. Kovalenko V. M. Molecular and genetic peculiarities of the paraoxonase functioning and importance in the development of cardiovascular pathology / V. M. Kovalenko, O. B. Kuchmenko, L. S. Mkhitarian // *The Ukr. J. of Cardiol.* – 2014. – № 5. – P. 105-116.
10. Kubala L. The potentiation of myeloperoxidase activity by the glycosaminoglycan-dependent binding of myeloperoxidase to proteins of the extracellular matrix / [L. Kubala, H. Kolářová, J. Vítěček et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, № 10. – P. 4524-4536.
11. Libby P. Fanning the flames: inflammation in cardiovascular diseases / P. Libby // *Cardiovascular Res.* – 2015. – Vol. 107. – P. 307-309.
12. Loria V. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes / V. Loria, I. Dato, F. Graziani, L. M. Bisucci // *Mediators Inflamm.* – 2008. – P. 135625.



13. Mangge H. Beyond cholesterol – new cardiovascular biomarkers // Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser. – 2016. – Vol. 84. – P. 81-88.
14. Manolescu B. N. Effect of the nutritional supplement ALAnerv® on the serum PON1 activity in post-acute stroke patients / B. N. Manolescu, M. Berteau, D. Cinteza // Pharmacological Reports. – 2013. – Vol. 65. – P. 743-750.
15. Misra H. P. Role of Superoxide anion in the autooxidation of epinephrine. A simple assay for superoxide dismutase / H. P. Misra, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, № 10. – P. 3170-3175.
16. Razavi A. E. Association between HDL particles size and myeloperoxidase/paraoxonase-1 (MPO/PON1) ratio in patients with acute coronary syndrome / A. E. Razavi, G. Basati, J. Varshosaz, S. Abdi // Acta Medica Iranica. – 2013. – Vol. 51, № 6. – P. 365-371.
17. Sinha N. Oxidative stress and antioxidant in hypertension – a current review / N. Sinha, P. K. Dadla // Curr. Hypertens. Rev. – 2015. – Vol. 11, № 2. – P. 132-142.
18. Solak Y. Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease / [Y. Solak, B. Afsar, N. D. Vaziri et al.] // Hypertens. Res. – 2016. – Apr. 7. Doi: 10.1038/hr.2016.35.
19. Stalnaya I. D., Garischvili T. G. A method of MDA determination with help of TBA. Modern methods in biochemistry. – M.: Medicina, 1977. – P. 66-68.

### УДК 616.12.008.331.1+616.153.96

Л. С. Мхітарян, О. Б. Кучменко, О. Г. Купчинська, І. Н. Євстратова, Н. М. Васи́лінчук, М. П. Мостов'як, Т. Ф. Дроботько

#### БІЛКОВІ ФАКТОРИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І АТЕРОГЕНЕЗУ У ПАЦІЄНТІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

Метою даної роботи було вивчення якісного стану основних класів ліпопротеїнів та активності асоційованих з ними білків-ферментів у крові пацієнтів з артеріальною гіпертензією (АГ). В дослідження були включені 30 пацієнтів з АГ II стадії (середній вік –  $47,4 \pm 3,3$  років). У пацієнтів з АГ зберігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення білків, що супроводжується переокисненням ЛПНП, ЛПДНГ і ЛПВГ із збільшенням їх індексу переокисної модифікації і атерогенного потенціалу крові. У пацієнтів з АГ встановлено зростання активності МПО на фоні зниження активності антиоксидантних ферментів – ПОН-1, каталази і супероксиддисмутази. Зміна активності МПО і ПОН-1 може бути використана в якості предиктора активності запальної реакції за участі нейтрофільних лейкоцитів і прогресування атеросклеротичного процесу, а також для оцінки ефективності лікування. Для оцінки якісного стану ліпопротеїнів крові і ступеня їх атерогенності інформативними показниками слід вважати активність ліпопротеїн-асоційованих білків-ферментів (ПОН-1 і МПО), а не тільки рівень холестеролу в них.

**Ключові слова:** артеріальна гіпертензія; атерогенез; оксидативний стрес; параоксоназа-1; міелопероксидаза

### УДК 616.12.008.331.1+616.153.96

Л. С. Мхітарян, Е. Б. Кучменко, Е. Г. Купчинская, И. Н. Евстратова, Н. Н. Васи́линчук, М. П. Мостовьяк, Т. Ф. Дроботько

#### БЕЛКОВЫЕ ФАКТОРЫ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И АТЕРОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Целью данной работы было изучение качественного состояния основных классов липопротеинов и активности ассоциированных с ними белков-ферментов в крови пациентов с артериальной гипертензией (АГ). В исследование были включены 30 пациентов с АГ II стадии (средний возраст –  $47,4 \pm 3,3$  лет). У пациентов с АГ сохраняется интенсификация процессов свободнорадикального окисления белков, что сопровождается переокислением ЛПНП, ЛПОНП и ЛПВП с увеличением индекса их переокисной модификации и атерогенного потенциала крови. У пациентов с АГ установлено возрастание активности МПО на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов – ПОН-1, каталазы и супероксиддисмутази. Изменение активности МПО и ПОН-1 может быть использовано в качестве предиктора активности воспалительной реакции с участием нейтрофильных лейкоцитов и прогрессирования атеросклеротического процесса, а также для оценки эффективности лечения. Для оценки качественного состояния липопротеинов крови и степени их атерогенности информативными показателями следует считать активность липопротеин-ассоциированных белков-ферментов (ПОН-1 и МПО), а не только уровень холестерина в них.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия; атерогенез; оксидативный стресс; параоксоназа-1; миелопероксидаза

Адреса для листування:

03151, м. Київ, вул. Народного ополчення, 5.

Тел. (067) 309-99-52. E-mail: kuchmeh@yahoo.com.

Національний науковий центр «Інститут кардіології ім. академіка М. Д. Стражеска» НАМН України

Надійшла до редакції 15.04.2016 р.

UDC 616.61 – 001:615.31:547.466.64] – 092.9

V. M. DRACHUK, I. I. ZAMORSKII, O. M. GOROSHKO

*State Higher Educational Institution of Ukraine "Bukovina State Medical University"*

## THE INFLUENCE OF GLUTATHIONE ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT ACTIVITY IN KIDNEYS AND BLOOD OF RATS WITH RHABDOMYOLYTIC MODEL OF ACUTE KIDNEY INJURY

*The influence of glutathione on the prooxidant-antioxidant balance in rats' kidneys and blood under the conditions of rhabdomyolytic model of acute kidney injury was studied in the experiment. It is observed that intraperitoneal administration of glutathione in dose 30 mg/kg normalizes the prooxidant-antioxidant balance, confirmed by the reduction of lipid and protein peroxidation intensity, normalization of catalase and glutathione peroxidase activity, SH-groups and ceruloplasmin content.*

*Key words:* acute kidney injury; glutathione; prooxidant-antioxidant balance

### INTRODUCTION

Rhabdomyolysis is a life-threatening clinical syndrome caused by the destruction of skeletal muscle with release of large amount of myoglobin into the blood and development of acute kidney injury (AKI). The causes of rhabdomyolysis include muscular trauma, use of narcotics and some medicines, influence of toxins, infections, hyperthermia, seizures and electrolyte disturbances causing lysis of cells due to ischemia or acidosis. There are three pathogenetic mechanisms of rhabdomyolytic AKI: renal vasoconstriction, ischemia and oxidative stress, initiating cellular damage with disturbances of energy supply and metabolism.

It is estimated that 15 % of AKI cases in the intensive care units are induced by rhabdomyolysis [11, 2, 14]. Therefore the search of remedies with nephroprotective properties able to prevent and correct this clinical syndrome is an important task of the modern medicine.

In this connection a potent antioxidant glutathione, providing the function of glutathione antioxidant system of the organism, have attracted our attention [1, 15]. Glutathione is an oligopeptide consisting of glutamate, cysteine and glycine, and functioning as a hydrogen donor and cofactor of antioxidant enzymes, e.g. glutathione peroxidase.

The aim of research was to study out the influence of single glutathione administration on the processes of lipid and protein peroxidation under the conditions of rhabdomyolytic model of AKI.

### MATERIALS AND METHODS

Research was conducted on 21 non-linear adult white rats weighting 180-220 g. Animals were divided into 3 groups (n = 7): I group – control, II group – pathology model. Animals of the III group received a glutathione after the modeling of rhabdomyolytic AKI. Pathology model was induced by intramuscular injection of 50 % glycerol (10 ml/kg) [10]. Glutathione (TAD 600, "Biomedica Foscam", Italy) was administered intraperitoneally at a dose of 30 mg/kg 40 min after glycerol injection. 24 h after the AKI modeling animals were decapitated under the ether anesthesia, blood and kidney samples were collected. Research was conducted accordingly to "European Convention on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasbourg, 1986).

Malondialdehyde (MDA) level in blood plasma and kidney tissue was determined by the reaction with 2-thio-barbituric acid [9], catalase (CAT) activity – by the reaction with ammonium molybdate [4], glutathione peroxidase (GPX) activity – by the amount of oxidized glutathione formed from reduced glutathione during the neutralization of hydrogen peroxide [1]. Ceruloplasmin (CP) level was estimated using the reaction of phenylenediamine oxidation [3]. Oxidatively modified proteins (OMP) level in kidney tissue was determined by formation of hydrazones by the interaction of the 2,4-dinitrophenylhydrazine with carbonyl groups [6]. SH-groups level in blood was estimated by the interaction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Ellman's reagent) with free SH-groups and formation of thionitrophenyl anion [7].

Statistical analysis was performed with Statistica 10.0 software. Group means were compared using parametric

© Drachuk V. M., Zamorskii I. I., Goroshko O. M., 2016

Table

**THE INFLUENCE OF GLUTATHIONE ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT ACTIVITY IN KIDNEYS  
AND BLOOD OF RATS WITH RHABDOMYOLYTIC ACUTE KIDNEY INJURY ( $M \pm m$ ,  $n = 7$ )**

Index	Control	AKI	AKI + TAD 600 (30 mg/kg)
MDA level in kidney tissue, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein	$57.5 \pm 1.50$	$75.9 \pm 2.19$ $p_1 \leq 0.001$	$66.7 \pm 1.54$ $p_2 \leq 0.05$
MDA level in blood erythrocytes, $\mu\text{mol}/\text{l}$	$15.9 \pm 0.57$	$22.3 \pm 0.90$ $p_1 \leq 0.001$	$18.9 \pm 0.85$ $p_2 \leq 0.05$
OMP level in kidney tissue, o.d.u./g of protein	$15.2 \pm 0.16$	$24.5 \pm 0.24$ $p_1 \leq 0.001$	$17.1 \pm 0.29$ $p_2 \leq 0.001$
OMP level in blood, o.d.u./ml	$0.79 \pm 0.09$	$1.20 \pm 0.01$ $p_1 \leq 0.01$	$0.93 \pm 0.08$ $p_2 \leq 0.05$
CAT activity in kidney, $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg}$ of protein)	$5.7 \pm 0.07$	$6.2 \pm 0.11$ $p_1 \leq 0.01$	$5.2 \pm 0.27$ $p_2 \leq 0.05$
CAT activity in blood, $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{l})$	$32.3 \pm 0.07$	$36.9 \pm 0.11$ $p_1 \leq 0.001$	$31.3 \pm 0.23$ $p_2 \leq 0.001$
GPx activity in kidney tissue, $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{l})$	$272.1 \pm 9.54$	$158.4 \pm 3.86$ $p_1 \leq 0.001$	$221.3 \pm 8.69$ $p_2 \leq 0.001$
GPx activity in blood, $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg}$ of protein)	$123.4 \pm 2.13$	$92.1 \pm 4.76$ $p_1 \leq 0.001$	$118.5 \pm 3.26$ $p_2 \leq 0.01$
CP level in blood, mg/l	$154.4 \pm 3.66$	$112.7 \pm 8.43$ $p_1 \leq 0.01$	$133.6 \pm 1.48$ $p_2 \leq 0.05$
SH-groups level in blood, $\mu\text{mol}/\text{ml}$	$3.55 \pm 0.05$	$2.16 \pm 0.06$ $p_1 \leq 0.001$	$2.90 \pm 0.07$ $p_2 \leq 0.001$

Note:  $p_1$  – index of significance comparing to control;  $p_2$  – index of significance comparing topathology model group.

Student's *t*-test (for normal distribution) and non-parametric Mann-Whitney *U*-test (in case of non-normal distributions). The level of significance was accepted with  $p \leq 0.05$ .

### RESULTS AND DISCUSSION

MDA is a main product of lipid peroxidation allowing an estimating the intensity of this process. An increase of its level by 1.3 times ( $p \leq 0.001$ ) in kidney tissue and by 1.4 times ( $p \leq 0.001$ ) in blood erythrocytes was observed in animals from pathology model group comparing to control (Table). Use of glutathione resulted in the decrease of MDA level by 12 % ( $p \leq 0.05$ ) in kidney tissue and by 15 % ( $p \leq 0.05$ ) in blood erythrocytes comparing to untreated animals.

Cytosolic proteins are the main targets for free radicals. Reduced glutathione and cysteine play important role in prevention of oxidative proteins modification, as their sulfhydryl groups are oxidized first. Due to the primary damaging effect and subsequent generation of active oxygen species OMP level in pathology model group was also increased by 1.6 times ( $p \leq 0.001$ ) in kidney tissue and by 1.5 times ( $p \leq 0.001$ ) in blood plasma. Glutathione decreased OMP level in kidney tissue by 1.4 times ( $p \leq 0.001$ ) comparing to pathology model group. In blood plasma OMP level was reduced by 1.3 times ( $p \leq 0.05$ ) and restored to the control level.

Antioxidant system controls and inhibits all of the stages of free radicals reaction. Under the conditions of AKI a vasoconstriction and renal ischemia cause energy depletion and deficiency of energetic substrates for an-

tioxidant enzymes, affecting the efficacy of protective systems. As previously stated, the glutathione system directly neutralizes active forms of oxygen and is especially important under the conditions of oxidative stress [8]. GPx activity depends on reduced glutathione content, which intracellular concentration is maintained by glutathione reductase. In its turn, glutathione reductase activity is determined by the reduced nicotinamide cofactors content [5]. In our research a significant decrease of GPx activity by 1.7 times ( $p \leq 0.001$ ) in kidney tissue and by 1.3 times ( $p \leq 0.001$ ) in blood plasma of rats from the II group was observed. In the group of animals undergoing the correction of AKI by glutathione a significant increase of enzymatic activity by 1.4 times ( $p \leq 0.001$ ) in kidney tissue and by 1.3 times ( $p \leq 0.01$ ) in blood plasma comparing to pathology model group was established.

Acompensatory increase of CAT activity by 8 % ( $p \leq 0.01$ ) in kidneys and by 14 % ( $p \leq 0.001$ ) in blood plasma was observed in pathology model group. In animals treated with glutathione CAT activity restored to the control indices and was decreased by 16 % ( $p \leq 0.05$ ) in kidney tissue and by 15 % ( $p \leq 0.001$ ) in blood comparing to untreated pathology group.

Non-enzymatic part of antioxidant defense was estimated by the levels of ceruloplasmin and SH-groups in blood plasma. It was established that glutathione caused an increase in CP level by 19 % ( $p \leq 0.05$ ), SH-groups level – by 34 % ( $p \leq 0.01$ ).

Thereby, use of glutathione with the aim of AKI correction caused a restoration of the antioxidant system activity and normalization of some indices.

Research results testify to the protective effect of glutathione under the conditions of AKI. It is primarily provided by the potent antioxidant effect as glutathione is a key link in the three out of four existing antioxidant systems of the body [15].

### CONCLUSIONS

1. An experimental rhabdomyolytic AKI is accompanied by an activation of the lipid and protein peroxidation in blood and kidney tissue.
2. Use of glutathione restores the prooxidant-antioxidant balance in rats with rhabdomyolytic AKI, causing a reduction of lipid peroxidation as well as protein free radical oxidation against the background normalization of antioxidant defense activity.

### REFERENCES

1. Геруш І. В. Стан глутатіонової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастроуденальної зони та дії настійки ехінацеї пурпурової / І. В. Геруш, І. Ф. Мешишен // Вісник проблем біол. та медицини. – 1998. – № 7. – С. 10-15.
2. Ермоленко В. М. Острая почечная недостаточность: [руководство] / В. М. Ермоленко, А. Ю. Николаев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 40-49.
3. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Мн: Беларусь, 1982. – С. 311.
4. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / [М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
5. Кулинський В. І. Ферментативное и неферментативное звено тиол-дисульфидной системы в головном мозге экспериментальных животных с церебральной ишемией: эффекты селеназы // Бюл. ВСНЦт СО РАМН. – 2005. – Т. 1, № 39. – С. 63-65.
6. Мешишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) / І. Ф. Мешишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156-158.
7. Мешишен І. Ф. Метод кількісного визначення SH-груп у крові / І. Ф. Мешишен, Н. П. Григор'єва // Бук. мед. вісник. – 2002. – Т. 6, № 2. – С. 190-192.
8. Сибірна Н. О. Дослідження окремих біохімічних показників за умов окисдативного стресу: [навч.-метод. посіб.] / Н. О. Сибірна, О. М. Маєвська, М. Л. Барська. – Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2006. – С. 60.
9. Стальная Л. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Л. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
10. Штриголь С. Ю. Методи експериментального моделювання ураження нирок при фармакологічних дослідженнях: [метод. рекомендації ДФЦ України] / [С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець та ін.]. – К., 2009. – С. 9-10.
11. Bosch X. Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury / X. Bosch, E. Poch, J. Grau // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361. – P. 62-72.
12. Halliwell B. Free radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, M. C. Gutteridge. – Oxford: Clarendon Press, 1989. – P. 320.
13. Ramani G. Oxidative stress and its association with cardiovascular risk in acute renal failure / G. Ramani, G. Kavitha, P. K. Dhass, R. Mary // Aruna Pharm. Bio Sci. – 2011. – Vol. 2, Iss. 3. – P. 329-334.
14. Vanholder R. Rhabdomyolysis / R. Vanholder, M. S. Sever, E. Ereke, N. Lameire // J. Am. Soc. Nephrol. – 2000. – Vol. 11. – P. 1553-1561.
15. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – Vol. 29. – P. 916-921.



**УДК 616.61 – 001:615.31:547.466.64] – 092.9****В. М. Драчук, І. І. Заморський, О. М. Горошко****ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ ГЛУТАТІОНУ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У НИРКАХ ТА КРОВІ ЩУРІВ ПРИ РАБДОМІОЛІТИЧНІЙ МОДЕЛІ ГОСТРОГО ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК**

В експерименті досліджений вплив препарату глутатіону на прооксидантно-антиоксидантний баланс у нирках та крові щурів за умов рабдоміолітичної моделі гострого пошкодження нирок. При дії препарату спостерігали, що внутрішньоочеревинне введення глутатіону в дозі 30 мг/кг маси тіла тварин нормалізує баланс прооксидантно-антиоксидантних показників, що проявляється зменшенням інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів і білків, нормалізацією активності каталази, глутатіонпероксидази, вмісту SH-груп та церулоплазміну.

**Ключові слова:** гостре пошкодження нирок; препарат глутатіону; прооксидантно-антиоксидантний баланс

**УДК 616.61 – 001:615.31:547.466.64] – 092.9****В. М. Драчук, І. І. Заморський, А. М. Горошко****ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ГЛУТАТИОНА НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ПОЧКАХ И КРОВИ КРЫС ПРИ РАБДОМИОЛИТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК**

В эксперименте исследовано влияние препарата глутатиона на прооксидантно-антиоксидантный баланс в почках и крови крыс в условиях рабдомиолитической модели острого повреждения почек. При действии препарата наблюдали, что внутрибрюшинное введение глутатиона в дозе 30 мг/кг массы тела животных нормализует баланс прооксидантно-антиоксидантных показателей, что проявляется уменьшением интенсивности пероксидного окисления липидов и белков, нормализацией активности каталазы, глутатионпероксидазы, содержания SH-групп и церулоплазмينا.

**Ключевые слова:** острое повреждение почек; препарат глутатиона; прооксидантно-антиоксидантный баланс

*Адреса для листування:*

58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2.

Тел. (0372) 55-37-54. E-mail: office@bsmu.edu.ua.

ДВНЗ України «Буковинський державний медичний університет»

Надійшла до редакції 19.04.2016 р.



УДК 616-092:612.017.083.3

А. М. Гольцев, Т. Г. ДУБРАВА, Н. М. БАБЕНКО, Ю. О. ГАЄВСЬКА,  
О. Д. ЛУЦЕНКО, М. В. ОСТАНКОВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

## ПАТОГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ РОЗВИТКУ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЇХ ЛІКУВАННЯ

*На експериментальних моделях патологій аутоіммунного генезу обґрунтована можливість і доведена ефективність застосування продуктів фетоплацентарного комплексу. Продемонстрована їхня здатність до активації Т-регуляторної ланки імунітету і нормалізації клінічних показників експериментальних тварин. Показано більш виражений імунокоригуючий потенціал кріоконсервованого матеріалу на клітинному і молекулярному рівнях.*

**Ключові слова:** продукти фетоплацентарного комплексу; аутоіммунні захворювання; Трег-клітини; ген *ido*

### ВСТУП

Можливість використання експериментальних моделей, адекватних стану організму людини при розвитку аутоіммунних захворювань (АІЗ), ґрунтується на існуванні загальних етіологічних факторів, що викликають вказані захворювання, механізмах їх розвитку, методах діагностики, терапевтичних підходах та ін. Не викликає сумніву мультифакторіальність розвитку АІЗ, але найбільш значущим патогенетичним фактором їхнього розвитку є порушення стану імунної системи, а саме, зрив її природної толерантності до власних антигенів. Фундаментальні розробки експериментальної імунології останніх 25-30 років продемонстрували, що ключовим фактором розвитку АІЗ є порушення процесу формування, зниження кількості та функціональної активності Т-регуляторних клітин (Трег) з фенотипічними маркерами CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> і транскрипційним фактором FOXP3 [13]. Ці клітини володіють високою супресорною активністю щодо клітин, які індукують і підтримують імунозапальний процес. Розробка засобів управління станом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>-клітин є найбільш перспективним підходом у загальному спектрі методів імуномодуючої терапії АІЗ. Слід особливо підкреслити, що розвиток АІЗ викликає дисгармонію взаємодії систем нейро-імун-ендокринного блоку. Виходячи з цього, при лікуванні АІЗ є очевидною необхідність використання препаратів надсистемної регуляції, тобто з поліфункціональною активністю. Повною мірою до таких можна віднести препарати клітинної і тканинної терапії, одним з векторів дії яких є імуномодуюча активність [1, 9].

Препарати клітинної та тканинної терапії, в тому числі і фетального походження, застосовуються при

лікуванні ряду патологічних станів організму людини. Проте до теперішнього часу залишається нез'ясованим ряд питань біоетичного профілю, що відносяться до юридичної бази їхнього використання. На думку багатьох лікарів-клініцистів, представників фундаментальної науки, служителів Феміди і т. п. «напруженість» у вирішенні багатьох з цих нез'ясованих питань може бути мінімізована переконливими результатами експериментальних досліджень.

Відомо, що в реалізації супресорного ефекту Трег-клітин бере участь фермент ідоламін-2,3-діоксигеназа (ІДО) [12], який ініціює деградацію L-триптофану, катаболіти якого власне і активують ці клітини. Висока його активність властива продуктам фетоплацентарного комплексу (ПФПК), а саме – клітинам плаценти, фетальної печінки і фетальним нервовим клітинам [10, 11]. У загальному технологічному процесі застосування ПФПК у клінічній практиці обов'язковим компонентом є кріоконсервування [1, 9], яке здатне модифікувати, в тому числі й активувати метаболічні процеси у клітинах [9].

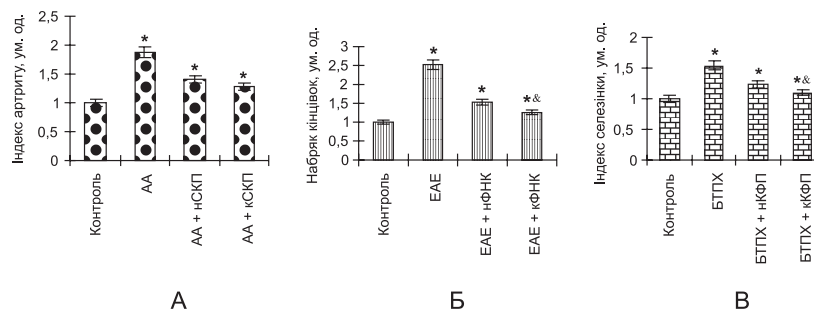
Виходячи з вищенаведеного, в цій роботі була проведена порівняльна оцінка імунокоригуючої дії кріоконсервованих ПФПК при різних формах експериментальних АІЗ з метою обґрунтування можливості їхнього застосування в клінічній практиці.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (European convention, Strasburg, 1986), та схвалених І Національним конгресом України з біоетики (Київ, 2004).

Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей лінії СВА/Н методом [5]. Набряк суглоба оцінювали

© Колектив авторів, 2016



**Рис. 1.** Клінічні ознаки розвитку АІЗ до і після введення нативних або кріоконсервованих ПФПК: А – АА+ СКП; Б – ЕАЕ + ФНК; В – ХТПХ + КФП.

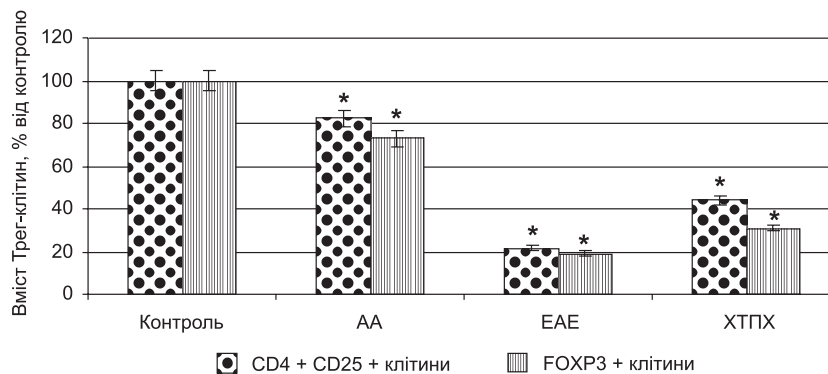
Примітка: за «1» прийняті клінічні ознаки здорових тварин (контроль); \* – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи без лікування кожної патології, & – щодо групи з введенням нативних клітин ( $p < 0,05$ ).

як відношення діаметра досліджуваного суглоба до інтактного суглоба і визначали у вигляді індексу артриту (ІА). Суспензію клітин плаценти (СКП) отримували на 18-ту добу гестації і кріоконсервували її під захистом 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) [1] та вводили внутрішньовенно на 7 добу розвитку АА в дозі  $1 \times 10^6$  клітин на мишу. Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) індукували у щурів методом [2]. Тяжкість клінічної картини захворювання оцінювали за п'ятибальною шкалою Жаботинського Ю. М. [4]. Фетальні нервові клітини (ФНК) мозку щурів ембріонів 11 діб гестації заморожували під захистом 10 % ДМСО [6] і вводили на 14 добу розвитку ЕАЕ внутрішньовенно в дозі  $5 \times 10^6$  клітин на 100 г маси тіла тварини. Хворобу «трансплантат проти господаря» (ХТПХ) індукували у летально опромієних мишей (СВА/Н $\times$ С57В)F<sub>1</sub> внутрішньовенним введенням  $5 \times 10^6$  на мишу напівалогенних відносно реципієнта клітин кісткового мозку (СВА/Н) разом з клітинами лімфовузлів мишей цієї ж лінії (3 : 1). Розвиток патології констатували за ознаками розвитку спленомегалії і її показником – індексом селезінки (ІС) на 14 добу після індукції ХТПХ [8]. Клітини фетальної печінки (КФП) 18-ої доби гестації мишей лінії СВА/Н кріоконсервували під захистом 10 % ДМСО [9] і вводили внутрішньовенно в дозі  $5 \times 10^5$  клітин/мишу на наступну добу після індукції патології. Вміст транс-

криптів гена *ido* в нативних і кріоконсервованих ПФПК визначали методом ЗТ-ПЛР [7]. Результати співвідносили до показників експресії гена  $\beta$ -actin (ген house-keeping). Вміст Трег-клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup>) в селезінці тварин з АІЗ до і після введення ПФПК визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) з використанням відповідних моноклональних антитіл – МАТ (BD Pharmingen, Abcam). Введення ПФПК і атестацію їхнього терапевтичного потенціалу визначали в різний час в залежності від виду патології. Так, при АА введення СКП здійснювали на 7 добу розвитку патології, атестацію – на 28 добу; при ЕАЕ введення ФНК на 14 добу, атестацію – на 28 добу; при БТПХ введення КФП через 1 добу після індукції патології, атестацію – на 14 добу, що обґрунтовано специфікою розвитку кожної патології і особливостями дії фетальних препаратів. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою U-критерію Манна-Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пік розвитку експериментальних патологій супроводжувався збільшенням їхніх клінічних ознак при АА (7 доба) – у 1,87; при ЕАЕ (14 доба) – у 2,52; при БТПХ (14 доба) – у 1,54 рази в порівнянні з контролем (рис. 1), що корелювало зі зниженням вмісту Трег-клітин (рис. 2).



**Рис. 2.** Вміст Трег-клітин у селезінці тварин з АІЗ.

Примітка: за 100 % прийнято вміст Трег-клітин у здорових тварин (контроль); \* – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи здорових тварин (контроль).

Таблиця

**ВМІСТ ТРЕГ-КЛІТИН У СЕЛЕЗИНЦІ РЕЦИПІЄНТІВ З АІЗ ДО І ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ НАТИВНИХ АБО КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПФПК**

Патологія	Терапевтичний матеріал	Вид матеріалу, який вводився	Вміст, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -клітин, % від контролю (здорові тварини)	Кратність збільшення CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> клітин	Вміст Foxp3 <sup>+</sup> -клітин, % від контролю (здорові тварини)	Кратність збільшення Foxp3 <sup>+</sup> -клітин	Кратність зниження клінічних ознак АІЗ
АА	Без лікування	–	<b>83,22 ± 1,82</b>	–	<b>74,39 ± 2,83</b>	–	–
	Суспензія клітин плаценти	натив	138,46 ± 3,65*	1,66	87,53 ± 6,8	1,18	1,1
		кріо	95,8 ± 4,78*&	1,15	96,07 ± 4,44	1,29	1,2
ЕАЕ	Без лікування	–	<b>21,53 ± 3,32</b>	–	<b>19,08 ± 1,72</b>	–	–
	Фетальні нервові клітини	натив	78,22 ± 6,34*	3,63	50,34 ± 4,45*	2,64	1,6
		кріо	80,07 ± 5,23*	3,72	72,13 ± 5,34*&	3,78	2,0
ХТПХ	Без лікування	–	<b>44,12 ± 3,6</b>	–	<b>31,03 ± 2,45</b>	–	–
	Клітини фетальної печінки	натив	98,43 ± 5,8*	2,23	62,07 ± 4,50*	2,00	1,2
		кріо	77,7 ± 6,20*&	1,76	75,86 ± 3,72*&	2,44	1,4

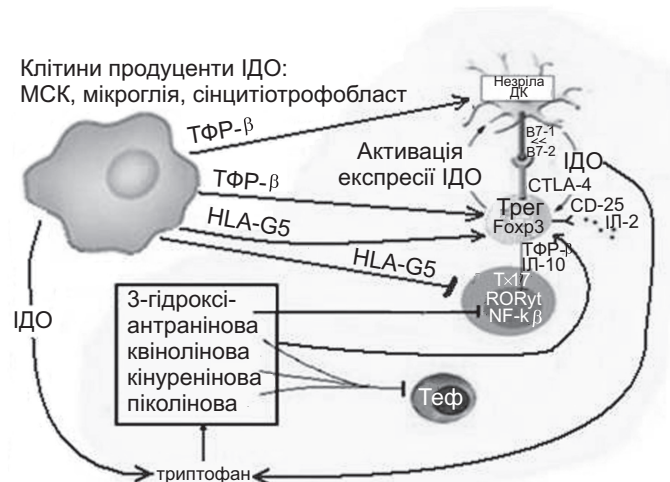
Примітка: за 100 % прийнято вміст Трег-клітин у здорових тварин (контроль); \* – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи без лікування кожної патології; & – щодо групи при лікуванні нативними клітинами (p < 0,05).

Так, вміст CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup>-клітин на 28 добу розвитку АА знижувався в 1,2 і 1,34 рази відповідно в порівнянні з контролем. Розвиток ЕАЕ супроводжувався більш істотним зниженням кількості як CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, так і FOXP3<sup>+</sup>-клітин (в 4,6 і 5,3 рази відповідно) на 28 добу після індукції патології. На 14 добу розвитку ХТПХ відзначалося зниження вмісту CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup> клітин в 2,3 і 3,2 рази відповідно в порівнянні з контролем.

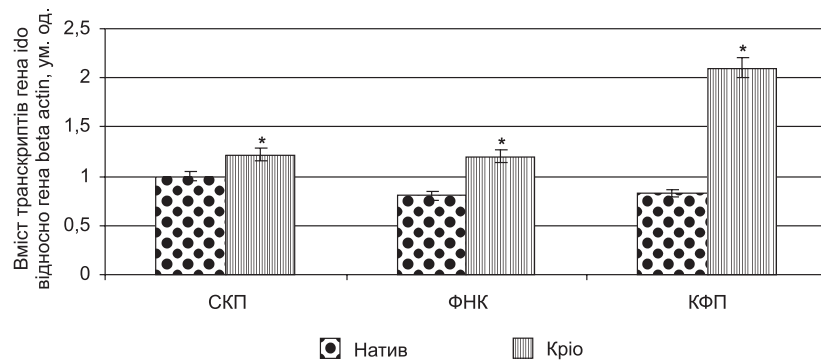
Всі види ПФПК, які вводилися тваринам з АІЗ, продемонстрували виражений імуномодуючий ефект щодо Трег-клітин з поліпшенням клінічних ознак розвитку патологій (рис. 1, таблиця). Показано, що кріоконсервовані матеріал володів більш вираженим стимулюючим потенціалом щодо Трег-клітин. Так, при використанні як нативної, так і кріоконсервованої СКП в терапії АА відзначено зниження індексу артриту в 1,1 і 1,2 рази при збільшенні вмісту як CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, так і FOXP3<sup>+</sup>-клітин в 1,66 і 1,18 рази (нативСКП) і в 1,29 і 1,15 рази відповідно (кріоСКП) (таблиця). Засто-

сування нативних і кріоконсервованих ФНК при ЕАЕ сприяло зниженню клінічних ознак патології в 1,6 і 2,0 рази відповідно. Це обумовлено різким підвищенням вмісту Трег-клітин більш ніж в 3 рази після введення як нативних, так і кріоконсервованих ФНК. Аналогічну дію нативних і кріоконсервованих КФП відзначено в моделі ХТПХ, а саме, встановлено підвищення вмісту CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup>-клітин в середньому в 2 рази в порівнянні з контролем. Кріоконсервовані КФП сприяли максимальному поліпшенню клінічних ознак ХТПХ, судячи за зниженням показника індексу селезінки в 1,4 рази в порівнянні з відповідним показником у тварин без лікування.

Цілеспрямоване збільшення вмісту Трег-клітин в організмі реципієнта з АІЗ можливе завдяки наявності в ПФПК як клітин-продуцентів протизапальних цитокінів (ІЛ-10, ТРФ-β), так і ферменту ІДО (рис. 3). В якості таких продуцентів виступають мезенхімальні стовбурові клітини (КФП, плацента), клітини мікроглії



**Рис. 3.** Схема можливих механізмів активації Трег-клітин в організмі реципієнта після введення ПФПК.



**Рис. 4.** Вміст транскриптів гена *ido* в нативних і кріоконсервованих клітинах ПФПК.

Примітка: \* – результати мають статистично значущі відмінності щодо показника нативного матеріалу,  $p < 0,05$ .

(ФНК) і клітини синцитіотрофобласту (плацента) [9, 10, 11]. Активація експресії ІДО цими клітинами здійснюється під впливом прозапальних цитокінів, зокрема ІФ- $\gamma$  [12].

Завдяки роботі ферменту ІДО відбувається киснева деградація триптофану з утворенням 3-гідроксіантранілової, кінуренинової, піколінової, квінолінової кислот, які безпосередньо стимулюють утворення Трег і вироблення ними ІЛ-10, ТРФ- $\beta$ , що і визначає їхній імуносупресивний ефект [14]. Протизапальні цитокіни ІЛ-10, ТРФ- $\beta$  здатні реалізувати клітинно-контактну (за участю в міжклітинній взаємодії СТЛА4 / В7, LAG3, TGF- $\beta$ , цАМФ, гранзимів) і медіаторно-опосередковану супресію (ТРФ- $\beta$ , ІЛ-10, ІЛ-35) [10].

Всі види ПФПК були здатні до певного фонового вмісту ферменту ІДО, про що свідчить наявність транскриптів гена *ido*, відповідального за його продукцію (рис. 4). Кріоконсервування призводило до активації його експресії в ПФПК, але різного ступеня, а саме: у СКП – в 1,2 рази, у ФНК – в 1,5 рази і у КФП – у 2,5 рази в порівнянні з нативом. Таким чином, можна припустити, що кріоконсервовані ПФПК з підвищеним ступенем експресії гена *ido* можуть володіти значним потенціалом активації Т-регуляторної ланки імунітету в терапії АІЗ.

Проведені дослідження дають підставу вважати, що стимуляція Т-регуляторної ланки імунітету у тварин з експериментальними АІЗ (АА, ЕАЕ і ХТПХ) після введення ПФПК здійснюється ІДО-залежним молекулярним механізмом. Даний факт підтверджено результатами представлених досліджень, в яких проводили лікування БТПХ введенням КФП, що передоброблялися специфічним інгібітором ІДО – 1-метилтриптофаном. При цьому, судячи з клінічних ознак ХТПХ, терапевтичний ефект такого матеріалу був відсутній [3].

#### ВИСНОВКИ

1. На експериментальних моделях патологій аутоімунного генезу, а саме АА, ЕАЕ, ХТПХ обґрунтована можливість і доведена ефективність застосування продуктів фетоплацентарного комплексу (СКП, ФНК, КФП) для їхнього лікування.

2. Результати проведених досліджень дають підстави вважати, що терапевтичний імуносупресивний ефект ПФПК при лікуванні експериментальних АІЗ (АА, ЕАЕ і ХТПХ) реалізується по молекулярному ІДО-залежному механізму.
3. Всі види ПФПК, які вводилися тваринам з АІЗ, продемонстрували можливість активації Т-регуляторної ланки імунітету, причому кріоконсервований матеріал мав більш виражений імунорегулюючий ефект.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гольцев А. Н. Действие различных режимов криоконсервирования на проявление иммуномодулирующей активности плаценты при развитии адьювантного артрита / А. Н. Гольцев, Е. Д. Луценко, М. В. Останков // Пробл. криобиол. – 2008. – № 4. – С. 456-459.
2. Давыдова Г. С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. – Мн: Наука и техника, 1969. – С. 32-37.
3. Дімітров О. Ю. Дослідження ІДО-залежного механізму імунорегулюючої дії клітин фетальної печінки мишей / [О. Ю. Дімітров, О. В. Сафранчук, Т. Г. Дубрава та ін.] // Матер. міжнар. наук. конф.: [«Молодь та поступ біології»], 16-19 квітня 2013 р. – Львів. – С. 410.
4. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. – Л.: Медицина, 1975. – 150 с.
5. Міщенко О. Я. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів / О. Я. Міщенко, А. А. Котвіцька // Вісник фармації. – 2001. – № 3. – С. 124-125.
6. Пат. № 59206, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / А. М. Гольцев, Є. О. Порожан, Н. М. Бабенко, М. В. Останков; Заявник: ІПКіК НАН України. – Заявл.: 04.10.2010. Опубл.: 10.05.2011. – Бюл. № 9.



7. Херрингтон С., Дж. Макги Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
8. Шевелев А. С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976. – 237 с.
9. Goltsev A. N. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation / [A. N. Goltsev, E. D. Lutsenko, A. Yu. Dimitrov et al.] // Cryolett. – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 543-544.
10. Guillemain G. J. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes and neurons / G. J. Guillemain, G. Smythe, O. Takikawa, B. J. Brew // Glia. – 2005. – Vol. 49, № 1. – P. 15-23.
11. Honig A. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance / [A. Honig, L. Rieger, M. Kapp et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2004. – Vol. 61, № 2. – P. 79-86.
12. King N. J. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase / N. J. King, S. R. Thomas // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 39, № 12. – P. 2167-2172.
13. Sakaguchi S. Immiinologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases / [S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 155, № 3. – P. 1151-1164.
14. Shevach E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression // Immunity. – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 636-645.

### УДК 616-092:612.017.083.3

**А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, Е. Д. Луценко, М. В. Останков**  
**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ЛЕЧЕНИЮ**

На экспериментальных моделях патологий аутоиммунного генеза обоснована возможность и доказана эффективность применения продуктов фетоплацентарного комплекса. Продемонстрирована их способность к активации Т-регуляторного звена иммунитета и нормализации клинических показателей экспериментальных животных. Показан более выраженный иммунокорректирующий потенциал криоконсервированного материала на клеточном и молекулярном уровнях.

**Ключевые слова:** продукты фетоплацентарного комплекса; аутоиммунные заболевания; Трег-клетки, ген *ido*

### UDC 616-092:612.017.083.3

**A. M. Goltsev, T. G. Dubrava, N. N. Babenko, Yu. A. Gaevskaya, E. D. Lutsenko, M. V. Ostankov**  
**PATHOGENETIC FACTORS OF DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES. CURRENT APPROACHES TO THEIR TREATMENT**

In experimental models of pathologies of autoimmune genesis, the possibility was grounded and the efficiency of using the products of fetoplacental complex was confirmed. Their ability to activate T-regulatory immunity link and normalize cell indices in experimental animals were tested. More pronounced immune correcting potential of cryopreserved material has been shown at cell and molecular levels.

**Key words:** fetoplacental complex products; autoimmune diseases; Treg-cells; *ido* gene

Адреса для листування:  
61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.  
Тел. (057) 373-41-43.  
E-mail: anatoliy.goltsev@gmail.com.  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України

Надійшла до редакції 20.04.2016 р.



УДК 615.262+322+454.1

Л. В. ГАЛУЗІНСЬКА, А. Л. ЗАГАЙКО

Національний фармацевтичний університет

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КРЕМУ «ЕНОПСОР» НА ПЕРЕБІГ АЛЕРГІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ ШКІРИ, ВИКЛИКАНОГО 2,4-ДИНІТРОХЛОРОБЕНЗОЛОМ

*Проведене вивчення антиалергічної дії нового крему «Енопсор», до складу якого входять поліфеноли винограду. Отримані дані свідчать про те, що крем «Енопсор» проявив високу ефективність на моделі алергічного запалення шкіри, викликаного 2,4-динітрохлоробензолом, та за фармакологічною активністю перевищував ефект препаратів порівняння.*

**Ключові слова:** алергічний дерматит; 2,4-динітрохлоробензол; поліфеноли; виноград культурний

### ВСТУП

Дерматит – це патологічне ураження шкіри, яке виникає від дії хімічних (концентрованих кислот, лугів), фізичних (високої або низької температури, променевого впливу), механічних (тиску, тертя) і біологічних факторів. Відомо, що шкіра як орган займає виняткове місце в проявах реакцій гіперчутливості негайного та уповільненого типів. Крім того, на думку ряду авторів шкіра є імунним органом, що підтверджується наявністю в ній лімфоїдних центрів, які залучаються до реакції гіперчутливості, і бере участь у формуванні в ній вогнищ запалення імунної природи. В основі контактного алергічного дерматиту лежить різновид гіперчутливості уповільненого типу, так званої контактної гіперчутливості [1, 6].

Одним із головних компонентів комплексного лікування алергічних дерматитів була і залишається зовнішня терапія з її унікальною можливістю безпосереднього впливу на вогнище ураження. Починаючи з 1952 р, коли М. Sulzberger і V. Witten вперше заявили про успішний досвід зовнішнього лікування дерматитів ацетатом гідрокортизону; глюкокортикостероїди посіли провідне місце в арсеналі найбільш ефективних лікарських препаратів для лікування запальних захворювань шкіри [2].

Використання рослинних препаратів найчастіше має переваги перед гормональними, що пов'язано, насамперед, з безпечністю рослинної терапії. Важливою проблемою є також невеликий асортимент природних антиалергенних препаратів, що потребує пошуку та створення нових ефективних засобів для лікування захворювань алергічного ґенезу [5, 8].

Відомо, що фенольні сполуки рослин володіють протизапальною, антиоксидантною, мембраностабі-

лізуючою активністю. Поліфеноли називають «природними біологічними модифікаторами реакції» через здатність змінювати реакцію організму на алергени, віруси та канцерогени [9, 11]. Про це свідчать їх протизапальні, антиалергічні, антивірусні та антиканцерогенні властивості [5].

Багатим джерелом поліфенолів є Виноград культурний [7]. Доведено, що у виноградних кісточках міститься велика кількість активних речовин, поліфенолів, які мають унікальну здатність зв'язувати вільні радикали, що утворюються в організмі під дією сонячних променів, сигаретного диму, стресу, забрудненого повітря [5]. Масло виноградних кісточок добре зволожує шкіру [7]. Екстракти винограду і виноградної лози, продукти ферментації винограду сприяють виробництву колагену, підвищують еластичність шкіри, звільняючи її від вільних радикалів, перешкоджають старінню. Покращуючи кровообіг і підвищуючи кількість імунокомпетентних клітин, повертають їй сяйво молодості [9, 10].

Метою цього дослідження було вивчення антиалергенної дії нового крему «Енопсор», до складу якого входять поліфеноли винограду.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

З огляду на встановлену в попередніх дослідженнях здатність крему «Енопсор» пригнічувати активність флогогенних медіаторів при гострому ексудативному запаленні доцільно було вивчити його ефективність на моделі алергічного запалення шкіри, викликаного 2,4-динітрохлоробензолом (ДНБХ) [3]. Серед відомих експериментальних алергічних уражень шкіри модель алергічного запалення шкіри, індукованого ДНБХ, є однією з добре відтворюваних. ДНБХ – сильний алерген, має високу проникаючу здатність при нанесенні на шкіру і викликає розвиток вираженої

Таблиця

**ВПЛИВ КРЕМУ «ЕНОПСОР» НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ДЕРМАТИТУ  
У МОРСЬКИХ СВИНОК (N = 6)**

Показники	Од- вим.	n	Умови досліджу	Доба спостереження					
				1	3	5	7	9	11
Тяжкість шкірних проявів	бал	6	Контроль	1,1 ± 0,15	4,8 ± 0,25	3,9 ± 0,23	2,3 ± 0,15	1,1 ± 0,13	0,5 ± 0,13
		6	крем «Енопсор»	1,0 ± 0,13	2,8 ± 0,25	2,0 ± 0,21	1,6 ± 0,13*	0,5 ± 0,16*	0,1 ± 0,13
		6	Олія обліпихи	1,0 ± 0,13	3,3 ± 0,25	2,4 ± 0,21	1,7 ± 0,13*	0,9 ± 0,16*	0,2 ± 0,13
		6	«Камагель»	1,0 ± 0,13	3,8 ± 0,25*	3,2 ± 0,21*	2,0 ± 0,13	0,9 ± 0,16	0,2 ± 0,13
Товщина шкірної складки	мм	6	Контроль	6,5 ± 0,22	7,8 ± 0,13	8,8 ± 0,18	8,4 ± 0,13	7,3 ± 0,12	6,1 ± 0,18
		6	крем «Енопсор»	6,5 ± 0,18	6,3 ± 0,21*	7,1 ± 0,14*	5,7 ± 0,16*	4,9 ± 0,1*	4,6 ± 0,15*
		6	Олія обліпихи	6,3 ± 0,18	6,5 ± 0,21*	7,7 ± 0,14*	6,3 ± 0,16*	5,5 ± 0,1*	4,9 ± 0,15
		6	«Камагель»	6,3 ± 0,18	7,5 ± 0,21*	7,9 ± 0,14*	6,9 ± 0,16*	6,1 ± 0,1*	5,4 ± 0,15*

Примітка: \* – відхилення достовірне відносно групи «нелікованих» тварин,  $p \leq 0,05$ .

запальної реакції алергічної природи, яка за клінічними показниками є адекватною основним проявам алергодерматитів у людини. Алергічні реакції легко відтворюються в шкірі в умовах експерименту (Кулага, 1997). Шкіра морських свинок дуже близька за будовою до шкіри людини, тому на цих тваринах можна моделювати різні дерматологічні захворювання (Веремейчик). Експериментальний алергічний контактний дерматит (АКД) широко використовується як модель для вивчення різних ланок перебігу алергічного дерматозу.

В експерименті використовували 20 морських свинок масою тіла 300-350 г. Для відтворення експериментального алергічного контактного дерматиту – реакції уповільненого типу тварин сенсibilізували за методом Залкан і Ієвлева [3]. Як алерген використовували 2, 4-динітрохлоробензол, який застосовували у вигляді 5 % спиртово-ацетонового розчину. Осередок сенсibilізації створювали на ділянці спини морських свинок (9 см<sup>2</sup>), з якого попередньо видаляли шерсть. ДНХБ втирали в шкіру спини 1 раз на добу протягом 3-х днів (1935). У розвитку сенсibilізації у морських свинок з клінічної та морфологічної картини шкіри розрізняли 2 етапи. Перший етап – первинно-контактна реакція (через 24 години) у вигляді обмеженого набряку і гіперемії. Ця реакція має риси неспецифічного запалення з деякими ознаками початку розвитку сенсibilізації. Другий етап (на 8 добу) – спонтанна запальна реакція (реакція займання) з тотальним некрозом епідермісу (АКД) і утворенням великих субепідермальних бульбашок. Ця реакція розвивається на імунній основі, і обов'язковим компонентом при цьому є інфільтрація з наявністю базофілів.

Про тяжкість дерматиту судили за загальним станом і поведінкою тварин. За змінами шкірного покриву спостерігали впродовж 11 днів. Тяжкість місцевих шкірних проявів позначали в умовних одиницях (балах):

- 0 – відсутність реакції;
- 0,5 – поява ізольованих червоних плям;
- 1 – дифузна помірна гіперемія;
- 2 – чітка гіперемія і набряклість;
- 3 – різке почервоніння і набряк;
- 4 – утворення невеликих ерозій;
- 5 – утворення геморагічної кірки і великих виразок.



Крім того, вимірювали величину шкірної складки. Досліджуваний крем «Енопсор» наносили на шкіру в дозі 2 мг/кг через 2-3 години після першої з трьох серійних аплікацій ДНХБ. Маніпуляцію проводили щодня 2 рази на добу до зникнення місцевих проявів. В якості препаратів порівняння використовували олію обліпихи і гель «Камагель». Оцінку терапевтичної ефективності проводили по тяжкості шкірних проявів та визначення товщини шкірної складки. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми STATISTICA (StatSoft Inc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента [4].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з таблиці, вже на першу добу після одноразової нашкірної аплікації розчину 2,4-ДНХБ у всіх контрольних тварин з'явилася помірна гіперемія (1-1,3 бали) і у частини з них набряк тканин, які підтверджували розвиток контактного дерматиту. Після кожного наступного нанесення 2,4-ДНХБ тяжкість місцевих проявів збільшувалася.

До 3-4-го дня захворювання відзначалося різке пошкодження шкірних покривів з утворенням геморагічної кірки (4-5 балів).

Дерматит, викликаний 2,4-ДНХБ, супроводжувався й іншими не менш істотними змінами шкірного покриву. Результати визначення товщини шкірної складки показали, що через добу цей показник збільшився на 2,3 мм. Далі, протягом усього експерименту товщина шкірної складки зменшувалася і поступово досягала вихідних значень.

У групі тварин, лікованих кремом «Енопсор», спостерігалися достовірні зміни в показниках у порівнянні з групою тварин з контрольною патологією.

Лікування алергічного контактного дерматиту кремом «Енопсор» показало його високу ефективність. При нанесенні досліджуваного крему ефект настав на 3 день; до 9-го дня вихідні параметри шкірного покриву відновлювалися, гострота дерматиту характеризувалася  $0,5 \pm 0,16$  балами. Новоутворена до 7-го дня лікування скоринка відторгалася, і з'явився повноцінний шкірний покрив.

Лікування кремом «Енопсор» також призводило до зменшення товщини шкірної складки на 20 % на 5 день експерименту, в той час коли товщина шкірної складки в групі контрольної патології мала максимальне значення. При лікуванні препаратами порівняння Олією обліпихи та «Камагелем» також спостерігалось достовірне зменшення ураження шкірних покривів, а також зменшення товщини шкірної складки.

### ВИСНОВКИ

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що крем «Енопсор» проявив високу ефективність на моделі алергічного запалення шкіри, викликаного 2,4-динітрохлоробензолом та за фармакологічною активністю перевищував ефект препаратів порівняння. Це є підставою для подальшого вивчення фармакологічної дії на інших моделях пошкоджень шкіри.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Белоусова Т. А. Современные представления о структуре и функции кожного барьера и терапевтические возможности коррекции его нарушений / Т. А. Белоусова, М. В. Горячкина // Рос. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 18. – С. 1082-1085.
2. Гребенюк В. Н. Наружные кортикостероиды в лечении атопического дерматита / В. Н. Гребенюк // Consilium Medicum. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 120-123.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / Под ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
4. Лапач С. М. Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Excel / С. М. Лапач, А. В. Чубенко, П. М. Бабіч. – К.: Моріон, 2001. – 408 с.
5. Поканевич В. В. Фітотерапія в Україні / В. В. Поканевич // Ліки. – 1998. – № 1. – С. 101-105.
6. Степаненко В. І. Рациональність застосування топічних негалогенізованих кортикостероїдних препаратів у лікуванні алергодерматозів / В. І. Степаненко, Б. Г. Коган, Л. В. Сологуб // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. – 2004. – № 1. – С. 36-37.
7. Сторожок Н. Н. Биологическое действие природных антиоксидантов / Н. Н. Сторожок // Провизор. – 1998. – № 2. – С. 50-52.
8. Тихонов О. І. Перспективи створення гомеопатичного лікарського засобу у формі мазі для лікування алергічних дерматитів / О. І. Тихонов, Н. А. Чорна, О. А. Красильнікова // Вісник фармації. – 2007. – Т. 50, № 2. – С. 24-28.
9. Тюкавкина Н. А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки / Н. А. Тюкавкина, И. А. Руленко, Ю. А. Колесник // Вопросы питания. – 1996. – № 2. – С. 33-38.
10. Barriocanal L. A. Intracellular signalling and inflammation / L. A. Barriocanal // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 145, № 11. – P. 4985-4990.
11. Chalopin M. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium / [M. Chalopin, A. Tesse, M. C. Martínez et al.] // PLoS One. – 2010. – Jan 1, 5 (1). – P. 8554.

**УДК 615.262+322+454.1****Л. В. Галузинская, А. Л. Загайко****ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРЕМА «ЭНОПСОР» НА ТЕЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ КОЖИ, ВЫЗВАННОГО 2,4-ДИНИТРОХЛОРБЕНЗОЛОМ**

Проведено изучение антиаллергического действия нового крема «Энопсор», в состав которого входят полифенолы винограда. Полученные данные свидетельствуют о том, что крем «Энопсор» проявлял высокую эффективность на модели аллергического воспаления кожи, вызванного 2,4-динитрохлорбензолом, и по фармакологической активности превышал эффект препаратов сравнения.

**Ключевые слова:** аллергический дерматит; 2,4-динитрохлорбензол; полифенолы; Виноград культурный

**UDC 615.262 + 322 + 454.1****L. V. Galuzinska, A. L. Zagayko****THE STUDY OF THE IMPACT OF CREAM "ENOPSOR" ON THE COURSE OF ALLERGIC INFLAMMATION OF THE SKIN CAUSED BY 2,4-BENZENE-DINITROHLOR**

In this paperwork we have studied the antiallergenic activity of a new cream "Enopsor", which includes grape polyphenols. The obtained data suggest that the cream "Enopsor" has shown a high efficacy in a model of allergic inflammation of the skin caused by a 2,4-dinitrochlorbenzole and exceeded the effect of the medications of comparison according to a pharmacological activity.

**Key words:** allergic dermatitis; 2,4 dinitrochlorbenzole; polyphenols; grape culture

Адреса для листування:  
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 25.04.2016 р.



УДК 615.322:577.126:616.08

А. Л. Загайко, О. І. Чумак, В. П. Филимоненко

Національний фармацевтичний університет

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТІВ З ЛИСТЯ СТЕВІЇ ТА ЧОРНИЦІ НА ПОКАЗНИКИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ, ІНДУКОВАНОГО ВИСОКОФРУКТОЗНОЮ ДІЄТОЮ З ДОДАВАННЯМ ІН'ЕКЦІЙ ДЕКСАМЕТАЗОНУ

Досліджено вплив екстрактів з листя стевії і чорниці на розвиток інсулінорезистентності. Утримання лабораторних тварин на високофруктозній дієті викликає комплекс метаболічних порушень, характерних для СД 2-го типу. Виявлено виражену гіпоглікемічну і слабку антиоксидатну дію екстракту з листя стевії, в той час як застосування екстракту з листя чорниці при однакових експериментальних умовах проявляється в більш вираженій антиоксидатній дії. Рекомендовано спільне застосування досліджених екстрактів у комплексному лікуванні ЦД 2-го типу.

**Ключові слова:** екстракт з листя чорниці (*Vaccinium myrtillus*); екстракт з листя стевії (*Stevia rebaudiana* Bertoni); цукровий діабет 2-го типу; інсулінорезистентність, дексаметазон

### ВСТУП

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД 2) є метаболічним захворюванням, що характеризується хронічною гіперглікемією, яка розвивається в результаті порушення секреції інсуліну або механізмів його взаємодії з клітинами тканин. Відомо, що головною причиною у розвитку серцево-судинних ускладнень є гіперглікемія. Остання призводить до інтенсивного утворення вільних радикалів, які є тригерами процесів ліпопероксидації, що, у свою чергу, спричиняє розвиток атеросклерозу.

На фармацевтичному ринку України зареєстровано ряд синтетичних лікарських препаратів, що використовуються для корекції стану та лікування хворих на ЦД. Проте з'ясовано, що синтетичні препарати мають ряд побічних ефектів, серед яких є активація вільнорадикальних процесів окиснення. На сьогодні фітотерапія стає важливою складовою частиною лікування та профілактики метаболічних порушень. Вона може використовуватись за певних стадій ЦД як монотерапія у комбінації з дієтотерапією, а також при сумісному застосуванні з цукрознижувальними засобами та/або інсуліном. Досліджено, що рослинні глікозиди та флавоноїди можуть виявляти гіпоглікемічну та антиоксидатну дію.

Стевія (*Stevia rebaudiana* Bertoni) є багаторічною рослиною з родини Айстрові (*Asteraceae*). Відомо, що

листя даної рослини містить дитерпенові глікозиди, які майже у 40 разів солодші за сахарозу. Стевіол є основним структурним компонентом глікозиду стевії. В ряді країн стевію використовують в якості цукрозамінника [10]. Стевіозид, компонент листя стевії, володіє гіпоглікемічною, протизапальною та гіпертензивною дією, що виявляється у зниженні рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну крові у пацієнтів з цукровим діабетом [16, 11]. Стевія входить до складу типових зборів, збагачених мікроелементами, для хворих на ЦД 2-го типу [9, 14].

Чорниця звичайна (*Vaccinium myrtillus* L.) є багаторічною рослиною з родини Вересових (*Ericaceae*). У листі чорниці звичайної переважають флавоноїди, протоантоціанідини, тритерпени, а також фенольні сполуки, зокрема, полімірилін, який використовують у водних настоях для лікування початкових стадій ЦД [1, 2]. Експериментально доведено, що препарати з листя чорниці звичайної також використовують у складі рослинних зборів для зниження рівня цукру крові при ЦД [6].

Метою даної роботи було дослідження впливу сухих екстрактів з листя стевії та чорниці на розвиток метаболічних порушень у щурів при експериментальному цукровому діабеті, спричиненому дексаметазоном на фоні високофруктозної дієти.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проводили на самцях щурів лінії Wistar вагою 160-200 г, яких утримували в умовах

Таблиця 1

**ВМІСТ ГЛІКОЗИЛЬОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ, ФРУКТОЗАМІНУ, РІВЕНЬ БАЗАЛЬНОЇ ГЛІКЕМІЇ, ПГК, ІРІ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ ВВЕДЕННІ ДЕКСАМЕТАЗОНУ (ДЕКС) ТА ЕКСТРАКТІВ СТЕВІЇ АБО ЧОРНИЦІ ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Показник	Інтакт	Дексаметазон	Декс + стевія	Декс + чорниця
Глікозильований гемоглобін, %	7,5 ± 0,5	9,6 ± 0,7*	8,6 ± 0,7**	8,4 ± 0,6**
Фруктозамін, ммоль/л	1,91 ± 0,12	3,6 ± 0,29*	3,1 ± 0,26*	2,45 ± 0,24**
Базальна глікемія, ммоль/л	4,04 ± 0,11	13,42 ± 0,38*	5,06 ± 0,27*	12,08 ± 0,24*
ПГК, ммоль/л/мин	625,44 ± 16,56	2092,25 ± 60,48*	700 ± 17,66*	1100 ± 61,56**
Глюкоза, ммоль/л	4,6 ± 0,1	11,2 ± 0,2*	7,3 ± 0,2**	8,2 ± 0,1**
ІРІ, пмоль/л	221,74 ± 20,79	317,97 ± 39,72*	280 ± 21,81	302 ± 36,70*

Примітка: \* – різниця достовірна відносно інтактної групи тварин ( $p \leq 0,05$ ); # – різниця достовірна відносно дексаметазону ( $p \leq 0,05$ ).

природної зміни режиму освітлення, температури та вологості повітря за стандартами віварію НФаУ на високофруктозній дієті з введенням низьких доз дексаметазону, як описано у роботі [19]. Дослідні тварини були розділені на групи: 1) інтактні тварини, які утримувалися на стандартному раціоні віварію; 2) тварини, яким поряд з високофруктозною дієтою (2 г фруктози на 100 г ваги тіла на добу) підшкірно щодня вводили дексаметазон у дозі 2 мг/100 г маси тіла протягом 6-ти тижнів; 3) тварини, яким протягом 2-х тижнів на фоні введення дексаметазону внутрішньошлунково вводили сухий екстракт з листя стевиї у дозі 9 мг/100 г маси тіла; 4) тварини, яким протягом 2-х тижнів на фоні введення дексаметазону внутрішньошлунково вводили сухий екстракт з листя чорниці у дозі 9 мг/100 г маси тіла.

Тварини були декапітовані під хлоразоло-уретановим наркозом. Об'єктом дослідження була сироватка крові та печінка тварин. При виконанні експериментів дотримувалися «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), гармонізованих з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [15].

В сироватці крові визначали концентрацію глікозильованого гемоглобіну (HbA1C) імунотурбідиметричним методом, рівень фруктозаміну – спектрофотометричним методом з використанням тетразолію нітросинього, площу під глікемічними кривими (ПГК) при проведенні ВЧТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми Mathlab, вміст глюкози – з використанням стандартних наборів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна), рівень імунореактивного інсуліну (ІРІ) – з використанням стандартних наборів фірми «РІО-ІПС-ПГ». Показники ліпопероксидації визначали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) та ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РАП) за реакцією з тіобарбітуровою кислотою спектрофотометричним методом [7], стан антиоксидантної системи оцінювали шляхом визначення концентрації відновленого глутатіону (GSH) – спектрофотометрично за реакцією з алоксаном, а також глутатіонредуктазою (ГР) [8]. Глюкозний гомеостаз у експериментальних і контрольних тварин оці-

нювали в різні терміни після відтворення моделі (7, 14 і 21 день) за показниками базальної глікемії і внутрішньоочеревинного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ, 3 г/кг маси тіла). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми STATISTICA (StatSoft Inc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали за t-критерієм Стюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення лабораторним тваринам низьких доз дексаметазону викликає комплекс порушень, які характерні для метаболічного синдрому та діабету 2-го типу. Так, як наведено в табл. 1, за вказаних умов у сироватці крові щурів спостерігається підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну, концентрації фруктозаміну, вмісту глюкози, рівня базальної глікемії, збільшення площі під глікемічними кривими. Це, ймовірно, може пояснюватися зниженням утилізації глюкози периферичними тканинами внаслідок пригнічення дексаметазоном експресії транспортерів глюкози GLUT 1 GLUT4 [12].

Рівень HbA1C є інформативним показником ефективності контролю рівня глюкози у крові. Швидкість синтезу глікозильованого гемоглобіну залежить від величини гіперглікемії, а нормалізація його рівня спостерігається через 1-1,5 міс. після досягнення еуглікемії [4], тому вміст HbA1C є адекватним показником компенсації вуглеводного обміну у хворих на діабет протягом тривалого часу, а збільшення рівня даного показника може відображати розвиток ретинопатії, нефропатії та інших ускладнень ЦД [17, 18]. Крім того, окрім гемоглобіну неферментативному глікозильованню у плазмі крові підлягає також альбумін, внаслідок чого утворюється фруктозамін.

Підвищення концентрації фруктозаміну та рівня базальної глікемії (табл. 1) в сироватці крові експериментальних тварин може свідчити про порушення регуляції глікемії інсуліном [3].

При введенні сухих екстрактів стевиї та чорниці на фоні їхнього сумісного введення з дексаметазоном спостерігається нормалізуючий вплив цих речовин на показники, що досліджуються (табл. 1, 2). Так, за

Таблиця 2

**ВМІСТ ТБК-АП, ДК, GSH І ГР В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ДЕКСАМЕТАЗОНУ (ДЕКС)  
ТА ЕКСТРАКТІВ СТЕВІЇ АБО ЧОРНИЦІ (M ± m, n = 6)**

Показник	Інтакт	Дексаметазон	Декс + стевія	Декс + чорниця
ТБК-АП, нмоль/г	0,96 ± 0,27	3,56 ± 0,41*	2,74 ± 0,32	0,98 ± 0,39*
ДК, нмоль/л	22,30 ± 1,42	28,5 ± 0,94*	27,1 ± 0,98	26,9 ± 0,96
GSH, ммоль/г	0,25 ± 0,01	0,12 ± 0,02*	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,03
ГР, нмоль/хв*мг білка	18,56 ± 0,64	14,20 ± 1,06*	15,2 ± 0,73*	17,9 ± 0,98

Примітка: \* – різниця достовірна відносно інтактної групи тварин (p ≤ 0,05); # – різниця достовірна відносно дексаметазону (p ≤ 0,05).

вказаних умов значно знижується концентрація глікозильованого гемоглобіну, фруктозаміну, рівень глюкози, площа під глікемічними кривими, а також рівень імунореактивного інсуліну. Останнє може бути пов'язано з високим вмістом у листі чорниці ряду фенольних сполук, для яких характерна гіпоглікемічна та антиоксидатна дія. Механізм гіпоглікемічної дії поліфенолів пов'язаний з їх впливом на процес транспорту глюкози у клітину. Головна роль у гіпоглікемічній дії екстракту з листя чорниці належить міртиліну, що являє собою суміш ефірів дельвінідину і мальвінідину, які підвищують чутливість клітин до інсуліну [5], а екстракту з листя стевії – стевіозид, компонент листя стевії, введення якого знижує рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну крові у пацієнтів з цукровим діабетом [14, 11].

Отже, встановлені ефекти досліджених екстрактів, ймовірно, пояснюються високим вмістом глікозидів екстракту з листя стевії та поліфенолів з листя чорниці, а також їхньою сумісною дією.

Доведено, що гіперглікемія супроводжується активацією вільнорадикальних процесів, що обтяжує пошкодження органів і тканин. У табл. 2 показано, що при введенні щурам низьких доз дексаметазону в печінці тварин спостерігається зростання вмісту ТБК-АП та ДК (первинних продуктів ліпопероксидації), яке корелює зі зменшенням вмісту GSH та ГР, що вказує на збільшення вмісту показників ліпопероксидації та зменшення вмісту показників антиоксидатного статусу. Введення сухих екстрактів стевії та чорниці на фоні їхнього сумісного введення з дексаметазоном спричиняє нормалізацію показників ліпопероксидації та антиоксидатного статусу організму досліджуваних лабораторних тварин, що, вірогідно, обумовлене антиоксидантними властивостями екстрактів з листя чорниці та стевії, причому дані ефекти більш виразно виявляються при введенні екстрактів з листя чорниці.

### ВИСНОВКИ

Використання сухих екстрактів з листя стевії та чорниці виявляє нормалізуючу дію на показники глікозильовання, рівень глюкози, показники ліпідного обміну в сироватці крові щурів при цукровому діабеті 2-го типу. Показана більш виражена антиоксидатна

дія екстракту з листя чорниці та гіпоглікемічна дія екстракту з листя стевії. Це свідчить про доцільність сумісного застосування екстрактів з листя стевії та чорниці з метою створення на їх основі лікарських засобів для корекції метаболічних порушень.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Барчук О. З. Визначення вмісту БАР в екстрактах з листя чорниці звичайної / О. З. Барчук, Л. В. Вронська // Фармакол. часопис. – 2012. – № 1. – С. 60-63.
2. Зворська О. Чорниця звичайна (*Vaccinium myrtillus* L.) – перспективна речовина для одержання лікарських засобів / О. Зворська, Т. Грошовий // Фармакол. часопис. – 2009. – № 3. – С. 29-33.
3. Ивашкин В. Т. Липотоксичность и метаболические нарушения при ожирении // Гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2010. – Т. 2, № 1. – С. 4-13.
4. Ильин А. В. Гликозилированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом / А. В. Ильин, М. И. Арбузова, А. П. Князева // Сахарный диабет. – 2008. – № 2. – С. 60-64.
5. Макарова М. Н. Антидиабетическая активность флавоноидов и их комбинаций с антиоксидантами / М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 30-32.
6. Рязанова Т. К. Фармакологическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной // Фундаментальные исследования. – 2013. – Ч. 5, № 8. – С. 1136-1140.
7. Стальная И. Д. Метод определения ТБК-АП с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // В кн.: Современные методы в биологии; под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
8. Строев Е. А. Макарова В. Г. Практикум по биологической химии. – М.: Высш. шк., 1986. – 231 с.
9. Энциклопедия народной медицины / Укл. і відп. ред. О. Михайлевський. – Львів: Вид-во «Сполом», 2005. – Т. 1. – 1284 с.
10. Artoni S. Effects of stevia, aspartate, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels / [S. D. Artoni, C. K. Martin, H. Han et al.] // Appetite. – 2010. – Vol. 55, № 1. – P. 37-43.

11. Baby Joseph. In sight the hypoglycaemic effect of traditional indian herbs used the treatment of diabetes / Joseph Baby, D. Jini Rjamp // IJPT. – 2011. – Vol. 4. – P. 352-375.
12. Buren J. Dexamethasone decreases GLUT 1 and GLUT4 content in primary cultured rat adipocytes / J. Buren, J. Ereksso // Diabetol. – 1999. – Vol. 42, № 1. – P. 170.
13. Chen T. H. Mechanism of the hypoglycemic effects of stevioside, a glycoside of stevia rebaudiana / [T. H. Chen, S. C. Chen, P. Chan et al.] // Planta Med. – 2005. – Vol. 71, № 2. – P. 108-113.
14. Edwin J. Diabetology and Herbal Medicine / J. Edwin, B. Siddaheswar, C. Dharam // IJPT. – 2008. – Vol. 7. – P. 97-108.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes – Strasbourg: Council of Europe, 1986. – 53 p.
16. Gregersens S. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects / S. Gregersens, P. B. Jeppesen, J. J. Holst // Metabolism. – 2004. – Vol. 53, № 1. – P. 73-76.
17. Reddy K. J. The role of the insulin resistance in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases: an updated review // J. of Cardiovasc. Med. – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 633-647.
18. Salamar M. R. Relationships among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardio-metabolic risk / M. R. Salamar // Diabetes and Cardiovasc. Dis. Res. – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 109-116.
19. Severino C. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance / [C. Severino, P. Brizzi, A. Solinas et al.] // Amer. J. of Physiol. – 2012. – Vol. 283, № 2. – P. 367-373.

**УДК 615.322:577.126:616.08****А. Л. Загайко, Е. И. Чумак, В. П. Филимоненко****ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ И ЧЕРНИКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫСОКОФРУКТОЗНОЙ ДИЕТОЙ С ДОБАВЛЕНИЕМ ИНЪЕКЦИЙ ДЕКСАМЕТАЗОНА**

Исследовано влияние экстрактов из листьев стевии и черники на развитие инсулинорезистентности. Содержание лабораторных животных на высокофруктозной диете вызывает комплекс метаболических нарушений, характерных для СД 2-го типа. Выявлено выраженное гипогликемическое и слабое антиоксидантное действие экстракта из листьев стевии, в то время как применение экстракта из листьев черники при одинаковых экспериментальных условиях проявляется в более выраженном антиоксидантном действии. Рекомендовано совместное применение исследованных экстрактов в комплексном лечении СД 2-го типа.

**Ключевые слова:** экстракт из листьев черники (*Vaccinum myrtillus*); экстракт из листьев стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*); сахарный диабет 2-го типа; инсулинорезистентность; дексаметазон

**UDC 615.322:577.126:616.08****A. L. Zagayko, O. I. Chumak, V. P. Filimonenko****RESEARCH OF INFLUENCE OF EXTRACT OF LEAVES OF STEVIA AND BILBERRY ON THE PERFORMANCE OF DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL DIABETES INDUCED BY HIGH FRUCTOSE DIET BY MEANS OF ADDING OF INJECTIONS OF DEKSAMITHAZON**

The study of the investigation of influence of extract from leaves of stevia and bilberry on the expression of insulin resistance. Keeping animals on high-calorie diet with the addition of fructose causes complex metabolic disorders specific to metabolic syndrome for type 2 diabetes. It was found that the antioxidation action and hypoglycemic effect of the extract from of stevia leaves, while the use of extract from bilberry under identical experimental condition, is manifested in more antioxidation action. Recommended joint use of the studied extracts in the complex treatment of diabetes 2-type.

**Key words:** stevia leaf extract (*Stevia rebaudiana Bertoni*); bilberry leaf extract (*Vaccinum myrtillus*); type 2 diabetes; insulin resistance; dexamethazone

Адреса для листування:  
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 25.04.2016 р.

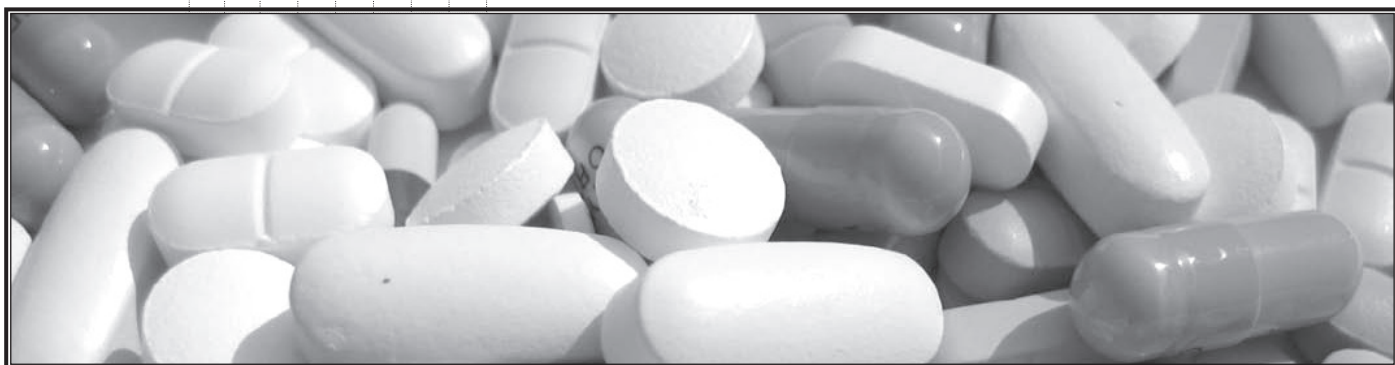


# ***Оглядові статті***

**Рецензенти рубрики:**

**Набока О. І.,**

*д. біол. н., професор*



UDC 577.125.8:616.005

D. A. DOROVSKY, A. L. ZAGAYKO

National University of Pharmacy

## LIPOPROTEIN LIPASE AS AN ATTRACTIVE TARGET FOR CORRECTING DYSLIPIDEMIA AND REDUCTION OF CVD RESIDUAL RISK

*Lipoprotein lipase has long been known to hydrolyse triglycerides from triglycerides-rich lipoproteins. It also the ability to promote the binding of lipoproteins to the wide variation of lipoprotein receptors. There are some studies that suggest the possible atherogenic role of lipoprotein lipase. In theory, lipoprotein lipase deficiency should help to clarify this question. However, the rarity of this condition means that it has not been possible to conduct epidemiological studies. During the last decade it became obvious that elevated plasma TG and low HDL-cholesterol are part of CVD residual risk. Thus LPL is an attractive target for correcting dyslipidemia and reduction of CVD residual risk.*

*Key words: Lipoprotein lipase; atherosclerosis; lipoproteins*

### INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL) is synthesized and secreted in several tissues, such as skeletal muscle, adipose tissue, cardiac muscle and macrophages (M), binding to the vascular endothelial cell surface of the capillary through heparan sulphate.

Lipoprotein lipase (LPL) plays a central role in lipoprotein metabolism by catalyzing hydrolysis of triglycerides (TG) in very low-density lipoprotein (VLDL) particles and chylomicrons [10, 24, 32]. It has been noted that besides its function of catalytic enzyme, LPL also acts as a mediator facilitating binding and/or incorporation of series of lipoproteins through either heparan sulfate proteoglycans or lipoprotein receptors [4, 5, 22, 25, 51] into several lines of cells. In clinical studies, post-heparin plasma (PHP) is usually used as a material for the measurement of LPL mass and activity. Several groups of researchers [2, 11, 15, 40, 41, 45, 46, 47] have shown the clinical significance of LPL protein mass measuring in plasma or serum by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) without the heparin injection (simply put as serum or plasma LPL mass). In recent years, the measurement of serum or plasma LPL mass has been conducted to clarify the pathophysiology of more common metabolic disorders. [40, 41]. The study by Watanabe et al. [11] has shown that serum LPL mass is lower in conditions where TG catabolism is disturbed, such as hypertriglyceridemia and individuals with increased remnant lipoproteins.

#### **Studies which indicate that LPL is proatherogenic LPL is expressed in atherosclerotic lesions**

It was first reported in the 1990s that LPL in atherosclerotic lesions was derived from macrophages (M);

differences in M expression of LPL contributed to differences in the development of atherosclerotic plaque formation. Concentrations of LPL protein, activity and mRNA in atherosclerosis-prone mice were found to be several-fold higher than in atherosclerosis-resistant counterparts. Ichikawa et al. compared atherosclerotic lesions in wild-type strains with lesions in rabbits with over-expressed M-specific human lipoprotein lipase, after giving both groups food containing 0.3 % cholesterol. Serum lipids were comparable but atherosclerotic lesions were more prominent in the former than in the latter. In a similar vein, peritoneal M from M-specific LPL / mice crossed with apo E / mice showed less susceptibility to foam cell formation compared to those from apo E / mice, suggesting that M LPL may contribute to the atherosclerosis development.

#### **LPL mass and activity in post-heparin plasma in subjects with advanced atherosclerosis**

##### **Biochemical Properties of Pre-Heparin LPL**

It has been shown that LPL activity in plasma increased about as high as 170-fold, whereas LPL mass increased only about 9-fold after heparin injection [41]. Most of the LPL protein in plasma elutes as an early peak from heparin-Sepharose, corresponding to the position for inactive monomeric lipoprotein lipase and is demonstrated to be full-length LPL, which is bound to plasma lipoproteins [45]. Therefore, it is unlikely that the measured plasma LPL mass directly catalyze the hydrolysis of triglycerides in TG-rich lipoproteins in the plasma. Several researchers have shown that this inactive protein may act as a ligand promoting lipoprotein binding to cell surfaces and receptors [47].

#### **Correlation of Serum LPL to Post-Heparin Plasma (PHP) LPL Mass**

It has been reported that serum LPL mass had a positive correlation with PHP- 4 LPL mass [11, 29, 46].

© Dorovsky D. A., Zagayko A. L., 2016

It should be noted that Hirano et al. [16] have shown that the delta LPL concentration was strongly related to the post-heparin plasma LPL concentration. This study suggests that the optimal cut off point of serum LPL mass for predicting visceral fat accumulation could be around 40 ng/ml.

#### **LPL is involved in the formation of atherogenic lipoproteins**

LPL hydrolyses TG from VLDL and chylomicrons forming VLDL remnants and chylomicron remnants. These are rich in cholesterol esters that become incorporated into M in vitro. The free fatty acids formed by this LPL action are being reesterified, promoting cholesterol ester accumulation in M, which leads to the transformation of M into M. foam cells. Lipoprotein lipase also converts VLDL into intermediate density lipoproteins (IDL), which then being converted into the low density lipoproteins (LDL) by the action of hepatic lipase. LDL is oxidized in vascular subendothelium, incorporated into M through the scavenger receptor, again resulting the formation of foam cells [37].

#### **LPL is produced by monocytes, macrophages, and smooth muscle cells in the atherosclerotic lesions**

Foam cells in atherosclerotic lesions are mainly derived from M, and LPL secretion by these cells may therefore have a direct effect on the atherosclerotic lesions formation. LPL may induce the retention and/or uptake of atherogenic lipoproteins by cells in the arterial wall, promoting the atherosclerotic process. Furthermore, LPL has been demonstrated to increase the retention of VLDL and LDL by proteoglycans of the subendothelial matrix in the arterial wall, facilitate proteoglycan-mediated monocyte adhesion to the endothelium, and increase the permeability of the endothelium by formation of lipolysis products.

#### **Studies which indicate that LPL is antiatherogenic LPL deficiency and atherosclerosis**

In LPL deficiency, plasma LDL cholesterol concentrations are reduced, and the elevated lipoproteins such as chylomicrons are too large to penetrate into the vascular endothelium; as a result, development of atherosclerosis is attenuated. Furthermore, in heterozygous LPL deficiency, reduced LPL activity is associated with premature atherosclerosis [28, 48] or the onset of familial combined hyperlipidemia [3]. Finally, Hu et al. [14] reported in a meta-analysis that lipoprotein lipase Asn291Ser mutations were associated with the low HDL levels, high TG and high rates of coronary artery disease. Conversely, LPL mutations leading to the increased LPL activity were protective against the development of coronary artery disease in another meta-analysis [30]. Zhang et al. [24] studied LPL-deficient mice, where human LPL gene was introduced at birth with adenoviral vectors. The mice exhibited the low HDL-C and marked hypertriglyceridaemia on a normal chow diet. Although at four months of age there were no atherosclerotic lesions of the aorta in the LPL-deficient mice but at 15 months of age more advanced

atherosclerotic lesions were observed compared with those in wild-type or with heterozygous LPL deficiency. These results suggest that as individuals with LPL deficiency age, atherosclerotic lesions may progress.

#### **Atherosclerosis in animal models over-expressing LPL**

In animal models, over-expressing human LPL is associated with improved serum lipid profile [7, 33, 34]. Tsutsumi et al. [44] found that NO-1886, a compound that increases LPL activity, was associated with reduced TG and elevated HDL-C. He also found that its long-term (90-day) administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with the experimental atherosclerosis. Shimada et al. [34] found that over-expression of human LPL in LDL receptor / mice was associated with the decreases in TG and remnants in plasma, as well as, significant reduction of aortic atherosclerotic lesions compared with LDL receptor / mice without human LPL overexpression. Fan et al. [7] found that when transgenic rabbits expressing human LPL were fed a cholesterol-rich diet, the development of hypercholesterolaemia and aortic atherosclerosis was dramatically suppressed. Therefore, systemically increased LPL activity plays a crucial role in plasma lipoprotein conversion and plasma TG hydrolysis and affects the metabolism of all classes of lipoproteins. Over-expression of lipoprotein lipase appears to protect against diet-induced atherosclerosis and hypercholesterolaemia.

#### **Studies suggesting serum LPL protein concentration is a useful biomarker predicting cardiovascular disease**

In clinical practice, LPL used to be quantified by measuring its activity in post-heparin plasma (PHP) using isotope-labelled substrate. In 1993, it has been established a sandwich enzyme-linked immunoassay (EIA) system for quantifying LPL protein concentration in PHP, using antibovine milk LPL polyclonal antibody and antibovine milk LPL monoclonal antibody [16]. Subsequently, the clinical significance of measuring lipoprotein lipase concentrations in serum rather than PHP was clarified [17, 18]. Hitsumoto et al. [12, 13] found that men with coronary atherosclerosis had significantly lower pre-heparin lipoprotein lipase mass than healthy men. LPL mass appears to be an independent determinant of coronary artery disease [12, 13] even after adjusting for the metabolic parameters, including serum HDL-C and TG. The correlation of intima-media thickness (IMT) of the carotid artery was examined by the ultrasonography and serum LPL concentration in the patients with dyslipidemia. There was an inverse correlation between IMT and serum LPL concentration, independent of body mass index, age, gender, HDL-C, LDL-C, and TG. Shirakawa et al. [36] developed a new LPL measurement system using two different antihuman LPL monoclonal antibodies. They found that remnant-like particles associated with triglycerides (RLP-TG) or cholesterol (RLP-C) and RLP-TG/RLP-C ratio correlated inversely with the serum LPL protein concentrations.

Given that RLP-TG/ RLP-C ratio reflects the particle size of the RLP, this raises the possibility that LPL may play an important role in remnant metabolism [27].

#### **Effect of LPL Activator NO-1886 on LPL, Lipid Metabolism and Atherosclerosis**

The synthetic compound NO-1886 (ibrolipim, [4-(4-bromo-2-cyano-phenylcarbamoyl)-benzyl]-phosphonic acid diethyl ester; CAS 133208-93-2) is a LPL-promoting agent that increases high-density lipoprotein cholesterol levels, decreases plasma triglyceride levels, and prevents fat accumulation in high fat-fed rats.

Single doses of NO-1886 dose-dependently and significantly increased post-heparin plasma lipoprotein lipase activity in normal rats [43]. NO-1886 administration for 7 days also significantly increased HDL-C and decreased plasma TG concentrations in hamsters and rabbits [42]. NO-1886 resulted in increased plasma total cholesterol concentrations and plasma HDL-C in rats, but this phenomenon was not observed in hamsters, monkeys or rabbits. NO-1886 caused a marked elevation of plasma HDL-C, especially HDL2-C. Previous reports have clearly demonstrated that enhanced lipolysis of TG-rich lipoproteins resulted an increase in HDL2 particles, and therefore, could be a precursor-product relationship exists between the two [39]. The transfer of cholesterol from newly formed HDL2 particles to VLDL is mediated by cholesterol ester transfer protein (CETP) [38]. However, rats, dogs and mice lack CETP [15]. Because of this, the number of HDL particles following enhanced VLDL degradation by lipoprotein lipase was increased and accumulated in the circulation, resulting in a marked elevation of HDL-C. The increases in plasma total cholesterol are obviously a result of the increases in HDL2, as there was no change in cholesterol in the LDL fraction after NO-1886 administration. Rabbits, monkeys and hamsters have CETP, and therefore plasma total cholesterol did not increase. These results indicate that NO-1886 may not increase plasma total cholesterol levels in humans because of the presence of CETP [8].

Endothelial function is impaired before the development of initial lesions in hypercholesterolemic animals and closely related to the development of atherosclerosis [35]. Aging is associated with the progressive development of insulin resistance, dyslipidemia and obesity, all of which are the risk factors for cardiovascular diseases and atherosclerosis [20]. It is known that endothelium-dependent relaxation decreases with age [23]. Hara et al. reported that NO-1886 ameliorated the aging-related deterioration of the endothelium-dependent relaxation in 10-month-old male rats thoracic aorta [9]. Kusunoki et al. reported that NO-1886 prevented the development of impaired endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta in 2-year-old male rats [19]. These research groups speculated that NO-1886 might have improved the endothelium-dependent relaxation by elevating plasma HDL-C, which possesses antioxidant effects and is very important for such old rats due to the elevated

plasma lipid peroxide levels caused by exercises [26]. Tsutsumi et al. reported that there was a significant reduction in the incidence of coronary arteriosclerosis following administration of NO-1886 for 90 days in rats on the atherosclerogenic rodent diet, describing that the multivariate analysis identified elevation of serum HDL-C as a main factor inhibiting the development of arteriosclerosis.

In a study reported by Chiba and his colleagues, an elevation of the plasma HDL-C level, decrease of the plasma TG level, and inhibition of the aortic atheromatous plaque deposition were evident following 20-week treatment with NO-1886 in rabbits on a highcholesterol diet [6]. These reports indicate that it is possible to suppress the development of atherosclerosis by raising the activity of LPL, increasing the plasma HDL-C level and lowering the plasma TG level, even if the plasma cholesterol level is not lower than normal.

#### **A novel Lipoprotein lipase (LPL) agonist rescues the enzyme from inhibition by angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)**

Recently, ANGPTL4 and other members of ANGPTL family have emerged as the physiological regulators of lipoprotein lipase activity *in vivo*. ANGPTL4 has been shown to potently inhibit LPL activity. Inhibition of LPL activity by ANGPTL4 and 3, results in the poor lipid profile and an elevated TG levels in the bloodstream [21, 31, 49]. ANGPTL4 deficiency has been shown to improve total triglyceride, cholesterol and reduce foam cell formation which had a protective effect against atherosclerosis [1]. Thus antagonism of ANGPTL4 inhibition of LPL is a promising new strategy in management of cardiovascular diseases. A novel agonist of LPL was identified, using an established *in vitro* assay, as well as its structural analog that are both more potent than NO-1886 in LPL agonism. They also afford a unique advantage over this agonist with respect to their effect on ANGPTL4 inhibition of LPL. An in-house library of 24 compounds was screened in an *in vitro* lipoprotein lipase activity assay using a 384 well plate. Compound C10 was considered the most active, which showed the greatest increase in the lipoprotein lipase activity. The next steps of the study clarified a dose response on the compound C10. A dose-dependent increase in lipoprotein lipase activity was observed in the presence of compound C10, with a maximum effect determined at 324 % of control LPL activity. A pilot structure activity relationship (SAR) study was initiated for the lead compound C10. In the same experiment the maximum induction of lipoprotein lipase activity (E-max) was compared between C10, its structural analogs and NO-1886. C10 showed greater activation of lipoprotein lipase compared to NO-1886. Further, analogs C10a, C10b and C10c exhibited a decrease in LPL agonism activity compared to C10. However, compound C10d showed a dramatic increase in activity compared to NO-1886 and C10. ANGPTL4 when added at the concentration of 0.2 lg/well inhibited the LPL activity by



greater than 50 %. We observed that both compounds C10d and C10 were able to stop lipoprotein lipase inhibition by ANGPTL4 in a dose dependent manner with C10d showing the greater efficacy than C10. NO-1886 failed to stop the LPL inhibition. According to the research, compounds C10 and C10d are the first small molecules that shown this activity of reversing ANGPTL4 inhibition of lipoprotein lipase. This activity is a unique advantage of these compounds over the known agonist – NO-1886.

### CONCLUSIONS

This review has summarized various strands of evidence examining the relationship between LPL and atherosclerosis. Large-scale prospective cohort studies of the relationship between serum lipoprotein lipase concentration and cardiovascular disease in various populations may help to clarify this question. Among drug targets for hypolipidemic therapy, LPL holds a significant promise. NO-1886 has been shown to possess potent lipoprotein lipase agonist activity. Random screening identified a compound designated C10, showing greater LPL agonist activity than NO-1886, a known LPL agonist. These compounds have promise as lead structures for the development of treatments of elevated triglycerides in of metabolic syndrome.

### REFERENCES

1. Adachi H. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis / H. Adachi, Y. Oike, E. Araki // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – P. 379, 806.
2. Auwerx J. H. Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency / J. H. Auwerx, S. P. Babirak, J. D. Brunzell // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 19. – P. 433-437.
3. Babirak S. P. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency / S. P. Babirak, P. H. Iverius, W. Y. Fujimoto // *Arteriosclerosis.* – 1989. – Vol. 9. – P. 326-334.
4. Beisiegel U. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low-density lipoprotein receptor-related protein / U. Beisiegel, W. Weber, G. Bengtsson-Olivecrona // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 8342-8346.
5. Chappell D. A. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. Cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is induced by the C-terminal domain of lipoprotein lipase / D. A. Chappell, I. Inoue, G. L. Fry // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 18001-18006.
6. Chiba T. Antiatherogenic effects of novel lipoprotein lipase-enhancing agent in cholesterol-fed New Zealand White rabbits / T. Chiba, R. Uetsuka, I. Tomita // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 2601-2608.
7. Fan J. Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis / J. Fan, H. Unoki, N. Kojima // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 40071-40079.
8. Ha Y. C. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species / Y. C. Ha, P. J. Barter // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1982. – Vol. 71. – P. 265-269.
9. Hara T. A lipoprotein lipase activator, NO-1886, improves endothelium-dependent relaxation of rat aorta associated with aging / T. Hara, K. Okada, S. Sakamoto // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 350. – P. 75-79.
10. Havel R. J. Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high-density lipoproteins during alimentary lipemia in man / R. J. Havel, J. P. Kane, M. L. Kashyap // *J. Clin. Invest.* – 1973. – Vol. 52. – P. 32-38.
11. Hirano T. Measurement of the serum lipoprotein lipase concentration is useful for studying triglyceride metabolism: Comparison with postheparin plasma / T. Hirano, F. Nishioka, T. Murakami // *Metabolism.* – 2004. – Vol. 53. – P. 526-531.
12. Hitsumoto T. Association between preheparin serum lipoprotein lipase mass and acute myocardial infarction in Japanese men / T. Hitsumoto, K. Yoshinaga, K. Aoyagi // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2002. – Vol. 9. – P. 163-169.
13. Hitsumoto T. Preheparin serum lipoprotein lipase mass is negatively related to coronary atherosclerosis / T. Hitsumoto, H. Ohsawa, T. Uchi // *Atherosclerosis.* – 2000. – Vol. 153. – P. 391-396.
14. Hu Y. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases / Y. Hu, W. Liu, R. Huang // *J. Lipid. Res.* – 2006. – Vol. 47. – P. 1908-1914.
15. Kern P. A. Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia / P. A. Kern, I. J. Goldberg, J. M. Ong // *J. Lipid. Res.* – 1990. – Vol. 31. – P. 17-26.
16. Kobayashi J. Lipoprotein lipase mass and activity in severe hypertriglyceridemia / J. Kobayashi, H. Hashimoto, I. Fukamachi // *Clin. Chim. Acta.* – 1993. – Vol. 216. – P. 113-123.
17. Kobayashi J. Pre-heparin plasma lipoprotein lipase mass: correlation with intra-abdominal visceral fat accumulation / J. Kobayashi, K. Saito, I. Fukamachi // *Horm. Metab. Res.* – 2001. – Vol. 33. – P. 412-416.
18. Kobayashi J. Serum lipoprotein lipase mass: clinical significance of its measurement / J. Kobayashi, A. No-hara, M. A. Kawashiri // *Clin. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 378. – P. 7-12.
19. Kusunoki M. A lipoprotein lipase activator, NO-1886 prevents impaired endothelium-dependent relaxa-

- tion of aorta caused by exercise in aged rats / M. Kusunoki, K. Tsutsumi, T. Nakamura // *Exp. Gerontol.* – 2002. – Vol. 37. – P. 891-896.
20. Lakatta E. G. Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms / E. G. Lakatta, F. C. Yin // *Am. J. Physiol.* – 1982. – Vol. 242. – P. 927-941.
21. Mandard S. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity / S. Mandard, M. Muller, S. Kersten // *J. Biol. Chem.* – 2006. – P. 281.
22. Merkel M. Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs *in vivo* / M. Merkel, Y. Kako, H. Radner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 13841-13846.
23. Moritoki H. Age-associated decrease in histamine-induced vasodilation may be due to reduction of cyclic GMP formation / H. Moritoki, T. Iwamoto, Y. Ishida // *Br. J. Pharmacol.* – 1988. – Vol. 95. – P. 1015-1022.
24. Nilsson-Ehle P. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism / P. Nilsson-Ehle, A. S. Garfinkel, M. C. Schotz // *Ann. Rev. Biochem.* – 1980. – Vol. 49. – P. 667-693.
25. Nykjaer A. A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and 12 inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells / A. Nykjaer, M. Nielsen, A. Lookene // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 31747-31755.
26. Ohta T. Protective effect of lipoproteins containing apolipoprotein A-I on Cu<sup>2+</sup> catalyzed oxidation of human low density lipoprotein / T. Ohta, K. Takata, S. Horiuchi // *FEBS. Lett.* – 1989. – Vol. 257. – P. 435-438.
27. Okazaki M. Relation between RLP-triglyceride to RLP-cholesterol ratio and particle size distribution in RLP-cholesterol profiles by HPLC / M. Okazaki, S. Usui, N. Tada // *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 296. – P. 135-149.
28. Reymer P.W.A. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis / P. W. A. Reymer, E. Gagne, B. E. Groenemeyer // *Nature Genet.* – 1995. – Vol. 10. – P. 28-34.
29. Rip J. Serum lipoprotein lipase concentration and risk for future coronary artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study / J. Rip, M. C. Nierman, N. J. Wareham // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 637-642.
30. Sagoo G. S. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis / G. S. Sagoo, I. Tatt, G. Salanti // *Am. J. Epidemiol.* – 2008. – Vol. 168. – P. 1233-1246.
31. Sanderson L. M. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver / L. M. Sanderson, M. Muller, S. Kersten // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 6257.
32. Scriver C. R. The metabolic and molecular basis of inherited disease / C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly // New York: Mc. Graw-Hill Inc. – 2001. – Vol. 2001. – P. 2789-2816.
33. Shimada M. Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia / M. Shimada, H. Shimano, T. Gotoda // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 17924-17929.
34. Shimada M. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase / M. Shimada, S. Ishibashi, T. Inaba // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 7242-7246.
35. Shimokawa H. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis / H. Shimokawa, P. M. Vanhoutte // *Circ. Res.* – 1989. – Vol. 64. – P. 900-914.
36. Shirakawa T. Comparison of the effect of post-heparin and pre-heparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase on remnant lipoprotein metabolism / T. Shirakawa, K. Nakajima, Y. Shimomura // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – Vol. 440. – P. 193-200.
37. Steinberg D. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity / D. Steinberg, S. Parthasathary, T. E. Carew // *New Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 320. – P. 915-924.
38. Tall A. R. Plasma lipid transfer proteins // *Ann. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 235-257.
39. Taskinen M. R. High density lipoprotein subfractions in relation to lipoprotein lipase activity of tissues in man – evidence for reciprocal regulation of HDL2 and HDL3 levels by lipoprotein lipase / M. R. Taskinen, E. A. Nikkilä // *Clin. Chim. Acta.* – 1981. – Vol. 112. – P. 325-332.
40. Tornvall P. High-density lipoprotein: Relations to 13 metabolic parameters and severity of coronary artery disease / P. Tornvall, F. Karpe, A. Proudler // *Metabolism.* – 1996. – Vol. 45. – P. 1375-1382.
41. Tornvall P. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin injection / P. Tornvall, A. Hamsten, T. Olivecrona // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1995. – Vol. 15. – P. 1086-1093.
42. Tsutsumi K. The novel compound NO-1886 elevates plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in hamsters and rabbits by increasing lipoprotein lipase without any effect on cholesteryl ester transfer protein activity / K. Tsutsumi, Y. Inoue, T. Murase // *Metabolism.* – 1997. – Vol. 46. – P. 257-260.

43. Tsutsumi K. The novel compound NO-1886 increase lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and long-term administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis / K. Tsutsumi, K. Iwasaki, M. Kawamura // J. Clin. Invest. – 1993. – V. 92. – P. 411-417.
44. Tsutsumi K. The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and long-term administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis / K. Tsutsumi, Y. Inoue, A. Shima // J. Clin. Invest. – 1993. – Vol. 92. – P. 411-417.
45. Vilella E. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins / E. Vilella, J. Joven, M. Fernandez // J. Lipid. Res. – 1993. – Vol. 34. – P. 1555-1564.
46. Watanabe H. Preheparin serum lipoprotein lipase mass level: The effects of age, gender and type of hyperlipidemia / H. Watanabe, Y. Hiroh, K. Shirai // Atherosclerosis. – 1999. – Vol. 145. – P. 45-50.
47. Williams K. J. Mechanism by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein (a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins: Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulphate proteoglycans / K. J. Williams, G. M. Fless, T. L. Swenson // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 13284-13292.
48. Wittrup H. H. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease / H. H. Wittrup, A. Tybjorg-Hansen, S. Abildgaard // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99. – P. 1606-1613.
49. Yoshida K. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase / K. Yoshida, M. Ono, H. Furukawa // J. Lipid. Res. – 2002. – Vol. 43. – P. 1770.
50. Zhang X. Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet / X. Zhang, R. Qi, X. Xian // Circ. Res. – 2008. – Vol. 102. – P. 250-256.
51. Zheng C. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans / C. Zheng, J. D. Brunzell, F. M. Sacks // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2006. – Vol. 26. – P. 891-896.

**УДК 577.125.8:616.005****Д. А. Доровський, А. Л. Загайко****ЛІПОПРОТЕЇНЛІПАЗА ЯК МІШЕНЬ ДЛЯ КОРЕГУВАННЯ ДИСЛІПІДЕМІЇ І СКОРОЧЕННЯ ЗАЛИШКОВОГО РИЗИКУ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Ліпопротеїнліпаза – фермент, що гідролізує тригліцериди тригліцеридзбагачених ліпопротеїнів. Вона також відповідає за приєднання ліпопротеїнів до широкого ряду ліпопротеїнових рецепторів. Існують дані про можливу атерогенну роль ліпопротеїнліпази. У теорії дефіцит ліпопротеїнліпази має допомогти роз'яснити це питання. Однак рідкість цього стану означає неможливість проведення епідеміологічних досліджень. Протягом минулого десятиліття стало очевидним, що підвищений рівень тригліцеридів у плазмі крові і низький рівень холестеролзбагачених ліпопротеїнів високої щільності є факторами ризику для розвитку кардіоваскулярних захворювань. Таким чином, ліпопротеїнліпаза – важлива мішень для вирішення проблем дисліпідемії і кардіоваскулярних захворювань.

**Ключові слова:** ліпопротеїнліпаза; атеросклероз; ліпопротеїни

**УДК 577.125.8:616.005****Д. А. Доровский, А. Л. Загайко****ЛИПОПРОТЕИНЛИПАЗА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ КОРРЕКТИРОВКИ ДИСЛИПИДЕМИИ И СОКРАЩЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Липопротеинлипаза – фермент, который гидролизует триглицериды триглицеридобогащенных липопротеинов. Она также отвечает за присоединение липопротеинов к широкому ряду липопротеиновых рецепторов. Существуют данные о возможной атерогенной роли липопротеинлипазы. В теории дефицит липопротеинлипазы должен помочь разъяснить этот вопрос. Однако нераспространенность этого состояния означает невозможность проведения эпидемиологических исследований. На протяжении прошлого десятилетия стало очевидным, что повышенный уровень триглицеридов в плазме крови и низкий уровень холестеролобогащенных липопротеинов высокой плотности являются факторами риска для развития кардиоваскулярных заболеваний. Таким образом, липопротеинлипаза – важная мишень для решения проблем дислипидемии и кардиоваскулярных заболеваний.

**Ключевые слова:** липопротеинлипаза; атеросклероз; липопротеины

Адреса для листування:  
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.  
Національний фармацевтичний університет

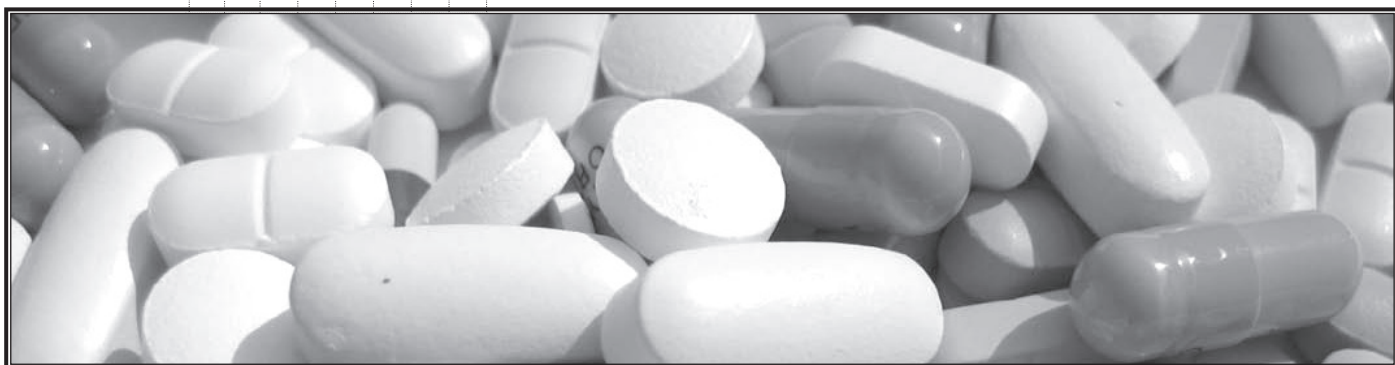
Надійшла до редакції 16.05.2016 р.



# ***Біофармацевтичні дослідження***

**Рецензенти рубрики:**

**Рубан О. А.,**  
*д. фарм. н., професор*



УДК 615.453.62:615.074:615.077

К. С. Бурдак<sup>1</sup>, Т. Г. Ярних<sup>2</sup>, М. І. Борщевська<sup>1</sup>, В. А. Коноваленко<sup>1</sup><sup>1</sup>ПАТ «Фармак»<sup>2</sup>Національний фармацевтичний університет

## ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВІ СУБСТАНЦІЇ АДЕМЕТІОНІНУ 1,4-БУТАНДИСУЛЬФОНАТУ

*Невід'ємною частиною розробки складу та технології лікарського засобу є дослідження його стабільності. Це дозволяє підтвердити або спростувати правильність підбору допоміжних речовин, способу і умов одержання лікарського препарату, встановити оптимальні параметри і термін його зберігання. За допомогою методу Карла Фішера (ДФУ\*, 2.5.12) та рідинної хроматографії (ДФУ\*, 2.2.29) було встановлено, що оптимальним середовищем отримання таблеток на основі адеметіоніну 1,4-бутандисульфонату є температура 20 °С та вологість не вище 20 %. Саме такі умови дозволяють зберегти стабільність лікарського препарату за такими показниками як вміст води, визначення супровідних домішок, кількісне визначення та вміст S,S-ізомера протягом 12 місяців.*

**Ключові слова:** адеметіоніну 1,4-бутандисульфонат; стабільність; термін зберігання; оптимальні умови

### ВСТУП

Лікарські засоби являють собою складні хімічні речовини як неорганічної, так і органічної природи, для контролю якості яких використовують комплекс аналітичних методів аналізу. Такі системи являють собою сукупність методів прямого потокового контролю, що дозволяє збільшити ефективність фармацевтичного виробництва і зменшити затрати [3, 9].

Аналітичні методи контролю починають застосовуватися на стадії розробки препаратів та продовжують використовуватися при серійному випуску лікарських засобів [5, 6]. Проте для забезпечення якості кінцевого продукту перевірку його відповідності специфікації необхідно здійснювати не тільки протягом усього виробничого циклу, а й у процесі дослідження стабільності [4, 7]. Саме постійний моніторинг якості лікарського засобу на всіх етапах виробництва дозволяє підібрати оптимальні умови його виробництва. Особливо якщо ми маємо справу з речовинами, чутливими до впливу вологості, температури тощо [1].

З літературних джерел відомо, що адеметіоніну 1,4-бутандисульфонат – речовина гігроскопічна [8]. Вологість середовища – це параметр, який визначає технологічний процес таблетування і є критичним показником при отриманні таблеток із гігроскопічних речовин, що чинить суттєвий вплив на основні параметри, всі стадії переробки і транспортування

порошків лікарських речовин. Вологість значно впливає на сипучість і, отже, точність дозування, здатність до пресування, продуктивність, довговічність таблетпресу [9].

В зв'язку з цим **метою нашої роботи** було вивчення стабільності таблеток на основі субстанції адеметіоніну 1,4-бутандисульфонату. В ході проведення даного дослідження перед нами були поставлені наступні **завдання**:

- дослідити вплив вологості середовища, температури та вмісту води в одержаних зразках таблеток на їх фармакотехнологічні і хімічні властивості;
- вивчити стабільність таблеток впродовж 12 місяців зберігання при різних умовах у порівнянні з референтним препаратом.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Вивчали серії 20515 (зразок № 1), серії 10314 (зразок № 2), серії 10513 (зразок № 3) та серії 11113 (зразок № 4) та референтний препарат «Гептрал» фірми Abbott, Італія.

Вміст води в досліджуваних зразках визначали методом Карла Фішера (ДФУ\*, 2.5.12). Визначення проводили з 10 розтертих таблеток. Зважували 60,0 мг зразка і розчиняли в суміші формамід Р-метанол Р (1 : 1).

Визначення супровідних домішок проводили методом рідинної хроматографії (ДФУ\*, 2.2.29). Прилад для вимірювання Agilent 1200 із спектрофотометричним детектором [2] (рис. 1).

© Бурдак К. С., Ярних Т. Г., Борщевська М. І.,  
Коноваленко В. А., 2016

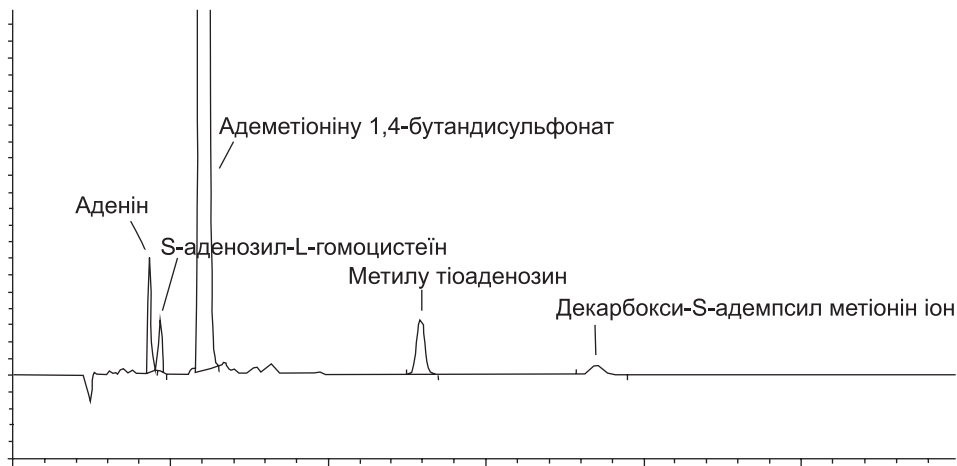


Рис. 1. Типова хроматограма випробовуваного розчину.

Загальну суму домішок визначали за сумою ідентифікованих та неідентифікованих домішок. Вміст домішок має бути наступним:

- Аденін – не більше 0,5 %.
- Метил тіоаденозин – не більше 1,5 %.
- S-Аденозил-L-гомоцистеїн – не більше 0,5 %.
- Декарбокси-S-адемпсилметіонін іон – не більше 1,5 %.
- Домішка з відносним часом утримування близько 1,2 – не більше 0,5 %.
- Кожної неідентифікованої домішки – не більше 0,1 %.
- Сума домішок – не більше 3,0 %.

Кількісне визначення також проводили методом рідинної хроматографії (ДФУ\* 2.2.29) [2]. Прилад для вимірювання Agilent 1200 із спектрофотометричним детектором (рис. 2).

Вміст S,S-ізомера має бути не менше 65 %. Вміст адеметіоніну 1,4-бутандисульфату в одній таблетці має бути від 380 мг до 420 мг в перерахунку на середню масу таблетки.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Так як вологість середовища при виробництві та залишкова вологість у препараті відіграє ключову роль у збереженні хімічних та біологічних властивостей препарату та його стабільності, було проведено ви-

значення кількості води при різних технологічних умовах отримання таблеток (табл. 1). Оскільки кількість води у досліджуваних зразках при заданій вологості та при зміні температурного режиму практично не змінювалася, нижче представлені результати, одержані за різної вологості.

Як бачимо, чим менша вологість середовища на момент виготовлення таблеток, тим менший вміст води у таблетці як на початку, так і протягом 12 місяців дослідження стабільності. Дані аналізу інших показників якості таблеток представлені нижче (табл. 2).

З наведених вище результатів бачимо, що зразки № 1 та № 2 одержані при вологості 15 % і 20 % відповідно і найбільш наближені до референтного препарату (зразок № 5). Це свідчить про те, що саме такі умови є оптимальними, за яких кількісний вміст, S,S-ізомер, вміст води у таблетці та сума домішок як на момент виготовлення, так і протягом 12 місяців знаходяться у встановлених межах. Що стосується інших зразків, то вологість середовища вище 20 % при одержанні препарату негативно впливає на стабільність лікарського засобу. Адже вона призводить до збільшення вмісту води у таблетці, що є, в свою чергу, причиною падіння кількісного вмісту та збільшення кількості домішок.

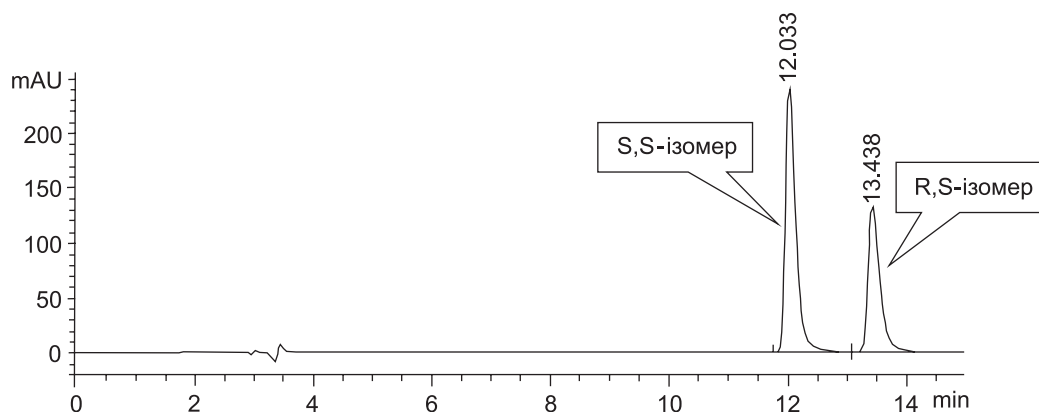


Рис. 2. Типова хроматограма випробовуваного розчину.

Таблиця 1

**ВПЛИВ ВОЛОГОСТІ СЕРЕДОВИЩА ОДЕРЖАННЯ ТАБЛЕТОК НА ВМІСТ ВОДИ  
ТА ЗОВНІШНІЙ ВИГЛЯД ПРЕПАРАТУ**

Зразок, №	Серія препарату	Вологість середовища	Вміст води у досліджуваному зразку на момент виготовлення	Вміст води у досліджуваному зразку в процесі дослідження стабільності				Зовнішній вигляд досліджуваного зразка через 12 міс. зберігання
				3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	
1	20515	15 %	3,5 %	3,7 %	3,8 %	3,8 %	–	Таблетка вкрита плівковою оболонкою від світло-жовтого до жовтого кольору овальної форми, без тріщин, ушкоджень та набухання.
2	10314	20 %	4,2 %	4,3 %	4,3 %	4,4 %	4,4 %	Таблетка вкрита плівковою оболонкою від світло-жовтого до жовтого кольору овальної форми, без тріщин, ушкоджень та набухання.
3	10513	30 %	5,0 %	5,5 %	5,7 %	5,7 %	5,9 %	Таблетка вкрита плівковою оболонкою світло-жовтого кольору з помітними тріщинами на поверхні, всередині – однорідна в'язка маса жовтуватого відтінку.
4	11113	40 %	5,7 %	5,9 %	6,0 %	6,3 %	6,4 %	Таблетка вкрита плівковою оболонкою світло-жовтого кольору з помітними тріщинами на поверхні, всередині – однорідна в'язка маса коричневого кольору.

Таблиця 2

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ДОСЛІДЖУВАНИХ ЗРАЗКІВ ІЗ РЕФЕРЕНТНИМ  
ПРЕПАРАТОМ ГЕПТРАЛ**

Зразок, №	Серія препарату	Кількісне визначення адеметіоніну (від 380 мг до 420 мг) і S,S-ізомера (не менше 50 %)					Супровідні домішки (сума домішок) не більше 3,0 %				
		на момент виготовлення	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	на момент виготовлення	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.
1	20515	410,0 70,0	405,0 69,0	400,6 68,5	396,0 65,7	–	1,5	1,7	1,9	2,2	-
2	10314	411,1 70,7	410,0 63,3	400,0 63,4	395,0 62,0	392,0 55,0	1,82	1,9	2,0	2,2	2,5
3	10513	402,0 60,0	400,0 57,0	397,0 52,1	393,0 49,2	387,0 47,3	2,0	2,4	2,5	2,7	2,9
4	11113	400,0 60,0	403,0 55,0	385 52,0	380 47,0	380 45,0	2,2	2,4	2,6	2,9	3,0
5	Гептрал	407,0 72,0	405,0 70,0	405,0 69,0	403,0 67,0	400,0 65,0	1,5	1,7	1,8	1,9	2,0

**ВИСНОВКИ**

Вивчена стабільність таблеток із адеметіоніну 1,4-бутандисульфатом протягом 12 місяців у порівнянні з референтним препаратом «Гептрал».

Встановлено, що вологість середовища та вміст води у препараті впливають на інші показники якості

таблеток – кількісний вміст адеметіоніну, S,S-ізомер, сума домішок.

Доведено, що оптимальними умовами одержання таблеток є температура 20 °С та вологість, не вище 20 %. Саме за цих умов як на момент виготовлення, так і в процесі зберігання вміст води у таблетці,



кількісний вміст адеметіоніну, S,S-ізомер, сума домішок знаходяться в межах норм, зазначених вище.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Георгиевский В. П. Руководство по качеству 42-3.3 : 2004. Лекарственные средства. Испытания стабильности / В. П. Георгиевский, Н. А. Ляпунов. – К.: Морион, 2004.
2. Державна фармакопея України. – Х.: PIPEГ, 2001. – Вид. 1. – 532 с.
3. Спектральные методы для контроля качества фармацевтических производств // Фармац. отрасль. – 2011. – № 3 (26). – С. 72-76.
4. Bajajh S. Stability Testing of Pharmaceutical Products / S. Bajajh, D. Singla, N. Sakhuja // J. of Applied Pharmac. Sci. – 2012. – № 2. – С. 129-138.
5. Khan W. Characterization, thermal stability studies, and analytical method development of Paromomycin for formulation development / W. Khan, K. Neeraj // Drug Test Analysis. – 2011. – № 3. – С. 363-372.
6. Perumal O. Role of Preformulation in Development of Solid Dosage Forms [Електронний ресурс] / O. Perumal, S. Podaralla // John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. – 2010. – Режим доступу до ресурсу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470571224.pse363/abstract>.
7. Stability testing of active substances and pharmaceutical products [Електронний ресурс] // World Health Organization. – 2006. – Режим доступу до ресурсу: [http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS06\\_179\\_StabilityGuidelineSept06.pdf](http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS06_179_StabilityGuidelineSept06.pdf).
8. World Intellectual Property Organization International Bureau A61K 9/28 Process for the preparation of tablets comprising s-adenosylmethionine / V. Mancini; International Filing Date: 18.10.2002. International Publication Date: 30.05.2003.
9. Zanolwiak P. Pharmaceutical Dosage Forms [Електронний ресурс] / P. Zanolwiak, V. Loyd // Wiley-VCH. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a19\\_241.pub2/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a19_241.pub2/abstract).

**УДК 615.453.62:615.074:615.077****Е. С. Бурдак, Т. Г. Ярних, М. И. Борщевская, В. А. Коноваленко****ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ СУБСТАНЦИИ АДЕМЕТИОНИНА****1,4-БУТАНДИСУЛЬФОНАТА**

Неотъемлемой частью разработки состава и технологии лекарственного средства является исследование его стабильности. Это позволяет подтвердить или опровергнуть правильность подбора вспомогательных веществ, способа и условий получения лекарственного препарата, установить оптимальные параметры и срок его хранения. С помощью метода Карла Фишера (ГФУ\* 2.5.12) и жидкостной хроматографии (ГФУ\* 2.2.29) было установлено, что оптимальной средой получения таблеток на основе адемeтионина 1,4-бутандисульфоната является температура 20 °С и влажность не выше 20 %. Именно такие условия позволяют сохранить стабильность лекарственного препарата по таким показателям как содержание воды, определение сопроводительных примесей, количественное определение и содержание S, S-изомера в течение 12 месяцев.

**Ключевые слова:** адемeтионина 1,4-бутандисульфонат; стабильность; срок хранения; оптимальные условия

**UDC 615.453.62:615.074:615.077****K. S. Burdak, T. H. Yarnykh, M. I. Borshchevska, V. A. Konovalenko****STUDYING OF STABILITY OF TABLETS ON THE BASIS OF THE SUBSTANCE ADEMETIONINE****1,4-BUTANDISULFONATE**

The essential part of development of composition and technology of medicines is research of its stability. It allows to assert and to overbear accuracy of choosing of adjuncts, ways and conditions of getting a medicinal drug, to lay down definitive parameters and expiry date. By using the Karl Fischer method (SPhU\* 2.5.12) and liquid chromatography (SPhU\* 2.2.29) it was found that the optimal environment for production of tablets on the basis of ademetonine 1,4-butandisulfonate is 20 °C and the humidity must be no more than 20 %. These very conditions make possible to save the stability of medicinal drug according to such parameters as water contents, determination of accompanying impurities, quantitative determination and contents of S,S-isomere within 12 months.

**Key words:** ademetonine 1,4-butandisulfonate; stability; optimum conditions

Адреса для листування:

61118, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

Національний фармацевтичний університет

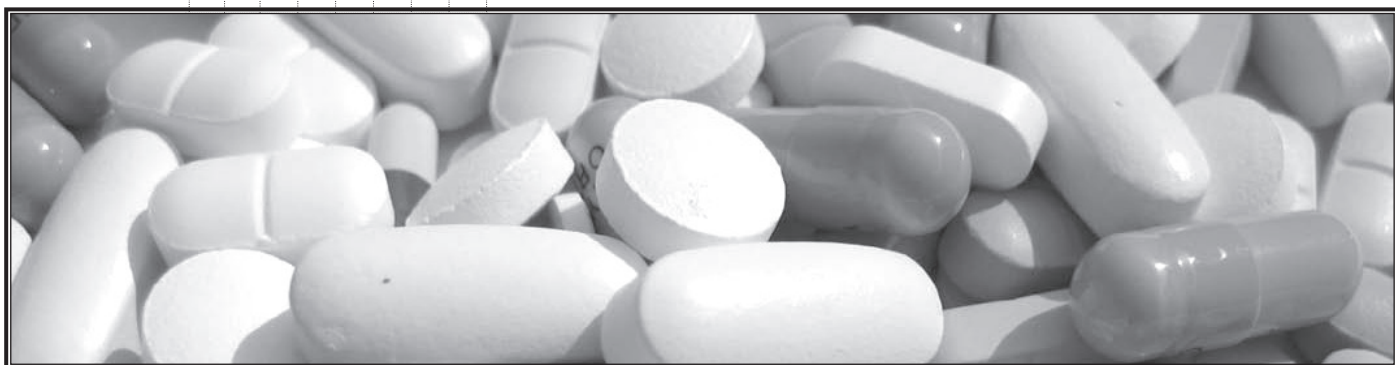
Надійшла до редакції 17.05.2016 р.

# **Фармацевтична хімія та фармакогнозія**

**Рецензенти рубрики:**

**Комісаренко А. М.,**  
*д. фарм. н., професор*

**Євтіфєєва О. А.,**  
*д. фарм. н., професор*



UDC 615.322: 582.998.16: 633.85: 54.061 / .062

O. V. BARASHOVETS, N. V. POPOVA

National University of Pharmacy

## THE MINERAL COMPOSITION OF HERBAL DRUG OF SAFFLOWER (*CARTHAMUS TINCTORIUS*. L.)

*Study of the mineral composition of plant material of safflower, flowers, seeds and herb was carried out. Atomic emission spectrographic method was used and contents of 15 elements were determined. The experimental data indicate quite diverse and abundant element content in safflower material that determines its therapeutic effect. The results of analysis show elements of content that safflower herb contains the largest amount, and the seeds lowest. The total amount of all elements of the studied material of safflower (mg/100 g) as follow herbs: 6827.08; flowers: 3507.01; seeds: 1160.56.*

**Key words:** safflower; mineral composition; atomic emission spectrophotometry; ash; macro- and microelements

### INTRODUCTION

Pharmacological effects of plants are the result of systemic effects on the body of separate biologically active substances (BAS) and it is combination. Besides herbs have very diverse chemical composition, it is a natural source of mineral compounds in which mineral are most available shape for absorption for the body and biologically available concentrations, and therefore have a higher physiological activity compared with synthetic analogs [7].

This responsible role of chemical elements are explained because they are part of the respiratory pigments, vitamins, hormones, enzymes and coenzymes, secondary substances involved in the regulation of life processes [12, 15].

In practical point of view information about the chemical composition of food and medicinal plants are very important for balanced nutrition, prevention and treatment of diseases [9, 11, 13, 14].

Natural herbal compounds and drugs based on occupation of a significant place in modern medicine. To date, for the treatment of diseases are used about 600 types of herbal drugs. One of these plants is safflower (lat. *Carthamus tinctorius*. L.) – annual plant of the family Asteraceae or Compositae [8, 9, 12].

Safflower is widely used in many industries, different countries have it's own traditions and culture use – food, pharmaceutical, cosmetic, feed. But mainly it is known as oilseeds, because seeds contain 32 to 39 % semi-drying oil (in the nucleus 50-56 %). The product contains polyunsaturated fatty acids (linoleic, linolenic and other omega acids), which protect the body from atherosclerotic plaques, fat-soluble vitamins E and C, derivatives of serotonin (a substance sometimes called "hormone of joy or satisfaction"), and some glycosides [10].

Safflower contains in its composition inulin which helps to normalize blood glucose levels, showing choleric, diuretic, regulates thyroid function [6, 7, 9, 12].

The flowers, in addition, contain a red pigment carthamin (or carthamus red) and yellow carthamus A and B (saflomin A and B), carthamidin, iso-carthamin, polysaccharides, essential oil, lignans.

Safflower flowers are used for coloring all shades of yellow and orange colors, including food.

Safflower is used to treat wounds and burns, pyoderma and pemphigus of different forms. In Chinese medicine, safflower flowers are widely prescribed in gynecological diseases. Infusion of flowers has choleric and laxative effect.

The aim is to study the mineral composition of safflower materials, which take into account when developing indexes for the draft of pharmacopoeia monograph of plant material [2, 3, 5, 9].

### MATERIALS AND METHODS

Seeds were harvested in the period of full maturity in 2014 at the experimental area of the botanical garden of NPhU, flowers and herb – during flowering time.

Study of the mineral composition of different plant materials: flowers, seeds and herb was carried out. For this it has been used sophisticated methods of analysis – atomic emission spectrographic method based on evaporation plant's ash in the arc discharge, photographic registration decomposed into a spectrum of radiation and measuring the intensity of the spectral lines of certain elements [11].

Preparing samples for analysis consisted of careful carbonization plant material when heated in a muffle furnace ( $t^\circ$  up to 500  $^\circ\text{C}$ ) with pre-treatment samples by diluted sulfuric acid. Evaporation of tests conducted with

© Barashovets O. V., Popova N. V., 2016



craters graphite electrodes in arc discharge of alternating current (source excitation spectra of type IVS-28) at a current 16 A and 60 seconds exposure. To obtain spectra and their registration plate used in spectrograph DFS-8 with a diffraction grating 600 shtr/mm and trilenz system coverage gap. Determination of intensity of the lines in the spectra of analyzed samples and calibration samples (GF) was performed using microphotometer MF-1.

Photographing the spectra were carried out in the following conditions: amperage stream arc AC – 16A, the ignition phase – 60 °C, frequency pulse ignited – 100 bits per second; analytical gap – 2 mm, width of the slit of the spectrograph – 0.015 mm; exposure – 60 seconds. Photographed spectra in the wavelength range 230-330 nm. Using standard samples metal salt solutions (ISORM-23-27) in the range of measurable concentrations built calibration curve, which determined regarding each element of its ash contents. The contents of minerals was calculated using the following expression, (%):

$$X = \frac{a \cdot m}{M},$$

where: m – mass of ash, g; M – mass of safflower material / extract, g; a – the contents of the element in the ash, %.

## RESULTS AND DISCUSSION

Ash is residue of inorganic substances obtained after burning and calcining materials. There are a total ash and ash insoluble in hydrochloric acid solution. The study was carried out in accordance with requirement of Ukrainian State Pharmacopoeia [2, 3].

Total ash is composed of minerals safflower material and foreign mineral impurities (earth, sand, stones) caught in raw materials when cleaning and drying.

Determination of total ash was carried out in the scientific and technological complex "Institute of Monocrystals" NAS of Ukraine (Kharkov). The results are shown in Tab. 1.

Results of the analysis of the elemental composition of flowers, herb and safflower seeds are represented in Tab. 2. In the studied material, 15 minerals were found, among which 5 belong to macroelements and 10 to microelements (Tab. 2).

The results show that safflower herb contains the largest amount of elements, seeds – smallest. According to the result it can be establish a pattern for the content of elements in the herb safflower: K > Ca > Si > Mg > P > Na > Fe > Al > Sr > Mn > Zn. For flowers, it has the following view: K > Ca > Si > Mg > P > Na > Fe > Al > Zn > Sr > Mn, and for seed as follow: K > Ca > Si > Mg > P > Na > Al > Zn > Mn > Fe > Cu. Total sum of all elements of the studied material (mg/100 g) are herb: 6827.08; flower: 3507.01; seeds: 1160.56.

It should be noted that safflower material contains a number of important elements (mg/100 g), potassium – herb-4110, 2040-flower seeds, 630; calcium – herb-1090 flowers-680 seeds, 170; magnesium – herb-410, flowers-205

Table 1

### ASH CONTENT OF SAFFLOWER PLANT MATERIAL

Plant material	Ash, %
Safflower herb	13.74
Safflower, flowers	6.84
Safflower seeds	2.11

Table 2

### THE MINERAL COMPOSITION OF SAFFLOWER'S HERB, FLOWERS AND SEEDS

Element	Element contents, mg/100 g		
	Safflower herb	Safflower flowers	Safflower seeds
Sodium (Na)	140	54	31
Potassium (K)	4110	2040	630
Calcium (Ca)	1090	680	170
Magnesium (Mg)	410	205	85
Phosphorus (P)	275	135	52
Silicon (Si)	685	410	150
Iron (Fe)	48	24	6.3
Aluminum (Al)	34	17	21
Zinc (Zn)	2.1	6.8	13.7
Copper (Cu)	0.68	0.68	1.0
Manganese (Mn)	6.8	3	11
Molybdenum (Mo)	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Lead (Pb)	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Nickel (Ni)	0.10	0.07	0.14
Strontium (Sr)	13.7	3.4	1.0

seeds, 84; iron – herb-48, 24-flower seeds-63, sodium – herb-140, 54-flower seeds-31.

Safflower material has a great interest as a source of important elements - potassium and calcium.

The contents of harmful elements (Co, Cd, As, Hg) in safflower material meets the requirement of Ukrainian State Pharmacopoeia [2, 3].

## CONCLUSIONS

1. By the method of atomic emission spectrophotometry, the elemental composition of safflower material was determined. 15 macro- and microelements were identified in objects that were investigated.
2. The experimental data indicate quite diverse and abundant element contents in safflower material that determines its therapeutic effect. Five macroelements (Na, K, Ca, Mg, P) and 10 micro-elements (Fe, Si, Al, Mn, Pb, Ni, Mo, Cu, Zn, Sr) were identified.
3. The contents of micro- and macro mineral of safflower material situated in sequence and with different amount of elements: herb – 6827.08; flower – 3507.01; seeds – 1160.56.

## REFERENCES

1. Горницький К. С. Заметки об употреблении в народном быту некоторых дикорастущих и разво-

- димых растений украинской флоры. – Х., 1987. – 220 с.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – 520 с.
  3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доп. 3. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.
  4. Драгомирецкий Ю. Целебные свойства жиров и масел: [учеб.]. – Донецк: Сталкер, 1997. – 347 с.
  5. Котов А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної фармакопеї України // Фармаком. – 2009. – № 1. – С. 5-19.
  6. Куркин А. В. Флавоноиды фармакопейных растений. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
  7. Полежаева И. В. Аминокислотный и минеральный состав вегетативной части *Chamerionangustifolium* (L.) Holub / И. В. Полежаева, Н. И. Полежаева, Л. Н. Меньяло // Хим.-фарм. журн. – 2007. – № 3. – С. 27-29.
  8. Попова Н. В. Лекарственные растения мировой флоры / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко. – Х.: СПДФО Мосякин В. Н., 2008. – 510 с.
  9. Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини: [навч. посіб.] / [В. М. Ковальов, С. М. Марчишина, О. П. Хворост та ін.]; за ред. В. М. Ковальова, С. М. Марчишин. – Тернопіль: ТДМУ, 2014. – 264 с.
  10. Сельскохозяйственная энциклопедия. – М.: Советская энциклопедия, 1974. – С. 483.
  11. Фурса Н. С. Изучение элементного состава валерианы лекарственной / Н. С. Фурса, Д. С. Круглов // Фармация. – 2012. – № 5. – С. 18-21.
  12. Шотт П. Р. Сафлор красильный – ценная масличная и лекарственная культура / Пища. Экология. Качество. – Новосибирск, 2002. – 301 с.

**УДК 615.322:582.998.16:633.85:54.061/.062****О. В. Барашовец, Н. В. Попова****ЕЛЕМЕНТНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ САФЛОРУ КРАСИЛЬНОГО (*CARTHAMUS TINCTORIUS*. L.)**

Було проведено дослідження елементного складу рослинної сировини сафлору красильного: квіток, насіння, трави. Для цього був використаний атомно-емісійний спектрографічний метод, визначено вміст 15 елементів. Отримані експериментальні дані свідчать про достатньо різноманітний та багатий елементний склад та вміст у досліджуваній сировині, що й обумовлює її терапевтичну дію. Результати дослідження вмісту мікроелементів свідчать про те, що трава сафлору містить їх найбільшу кількість, а насіння – найменшу. Вміст загальної суми всіх елементів досліджуваної сировини сафлору красильного (мг/100 г): трава – 6827,08; квітки – 3507,01; насіння – 1160,56.

**Ключові слова:** сафлор красильний; елементний склад; зола; атомно-емісійна спектрофотометрія

**УДК 615.322:582.998.16:633.85:54.061/.062****О. В. Барашовец, Н. В. Попова****ЕЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ СЫРЬЯ САФЛОРА КРАСИЛЬНОГО (*CARTHAMUS TINCTORIUS*. L.)**

Было проведено исследование элементного состава различного растительного сырья сафлора красильного: цветков, семян, травы. Для этого был использован один из сложных методов анализа – атомно-эмиссионный спектрографический метод. Определено содержание 15 элементов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о достаточно разнообразном и богатом элементном содержании в исследуемом сырье, что и обуславливает его терапевтическое действие. Результаты исследования содержания микроэлементов свидетельствуют о том, что трава сафлора содержит их наибольшее количество, а семян – наименьшее. Общая сумма всех элементов исследуемого сырья (мг/100 г): трава – 6827,08; цветки – 3507,01; семена – 1160,56.

**Ключевые слова:** сафлор красильный; элементный состав; зола; атомно-эмиссионная спектрофотометрия

УДК 547.792'831:543.382

Т. М. КАПЛАУШЕНКО, О. І. ПАНАСЕНКО, Ю. М. КУЧЕРЯВИЙ

Запорізький державний медичний університет

## ОКИСНЕННЯ 2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ ЕСТЕРІВ ДО 3-ІЛСУЛЬФІНІЛ- ТА 3-ІЛСУЛЬФОНІЛПОХІДНИХ

Однією з пріоритетних задач сучасної фармацевтичної науки є синтез біологічно активних сполук та створення на їх основі нових високоефективних лікарських засобів, які б могли конкурувати з дорогими імпортованими препаратами. Велику зацікавленість у цьому плані викликають гетероциклічні системи, зокрема 3-тіопохідні 1,2,4-триазолу, що містять хіноліновий радикал у п'ятому положенні 1,2,4-триазолового циклу. Ядро 1,2,4-триазолу є структурним фрагментом багатьох синтетичних лікарських засобів з протигрибковою (флуконазол, інтраконазол), антидепресивною (тразодон, альпразолам), протівірусною (тіотриазолін), гепатопротекторною та ранозагоювальною активністю. Високі біологічні властивості виявлено також у речовин, що містять хінолінові замісники. Таким чином, синтез нових молекул у ряду похідних 1,2,4-триазолу є перспективним та актуальним напрямком науки, має теоретичну і практичну значимість.

**Ключові слова:** 1,2,4-триазол; синтез; хімічні властивості; хромато-мас-спектрометрія

### ВСТУП

Кінець ХХ століття в свій час знаменувався стрімким розвитком науки та появою на світ численної кількості винаходів. Не виключенням у цьому плані стала і фармацевтична галузь науки, адже стосовно синтезу 1,2,4-триазол-3-тіонів була створена потужна теоретична та практична наукова база. Цей факт зумовлений тим, що 1,2,4-триазолі використовують не тільки задля створення лікарських засобів, а також і для виготовлення продукції, що широко застосовується у сільському господарстві, промисловості, різноманітних галузях науки тощо. Зокрема широко висвітлено інформацію про методи отримання 3-тіо-1,2,4-триазолів, але за останні роки не відомі матеріали, які б узагальнювали методи синтезу 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти та її похідних, що розширює синтетичні можливості на шляху пошуку біологічно активних речовин. Отже, вищевказані факти надають актуальності нашому дослідженню [2, 5, 7].

Метою нашого дослідження є окиснення 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти та її естерів до відповідних 3-ілсульфініл-та 3-ілсульфонілопохідних, вивчення їх фізико-хімічних властивостей.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В якості вихідних речовин були використані 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанова кислота

та її естери, синтезовані нами попередньо за відомими в літературі методиками. Окиснення атома Сульфору вихідних сполук (I-V, рис.) до чотиривалентного стану проводили в середовищі 1,4-діоксану з додаванням розчину калію гідрогенпероксосульфату при температурі, не вищій за 0 °С. Отримання 3-ілсульфонілопохідних (сполуки 5-9, рис.) проводили шляхом додавання 33 % розчину гідрогену пероксиду до відповідних вихідних сполук (I-V, рис.) у середовищі концентрованої кислоти ацетатної при кімнатній температурі або з нагріванням на водяній бані при  $t = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$  [1, 3, 6].

Будова синтезованих сполук підтверджена комплексом сучасних фізико-хімічних методів, а саме елементним аналізом (табл. 1), даними високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії, ІЧ-спектрофотометрії (табл. 2, 3).

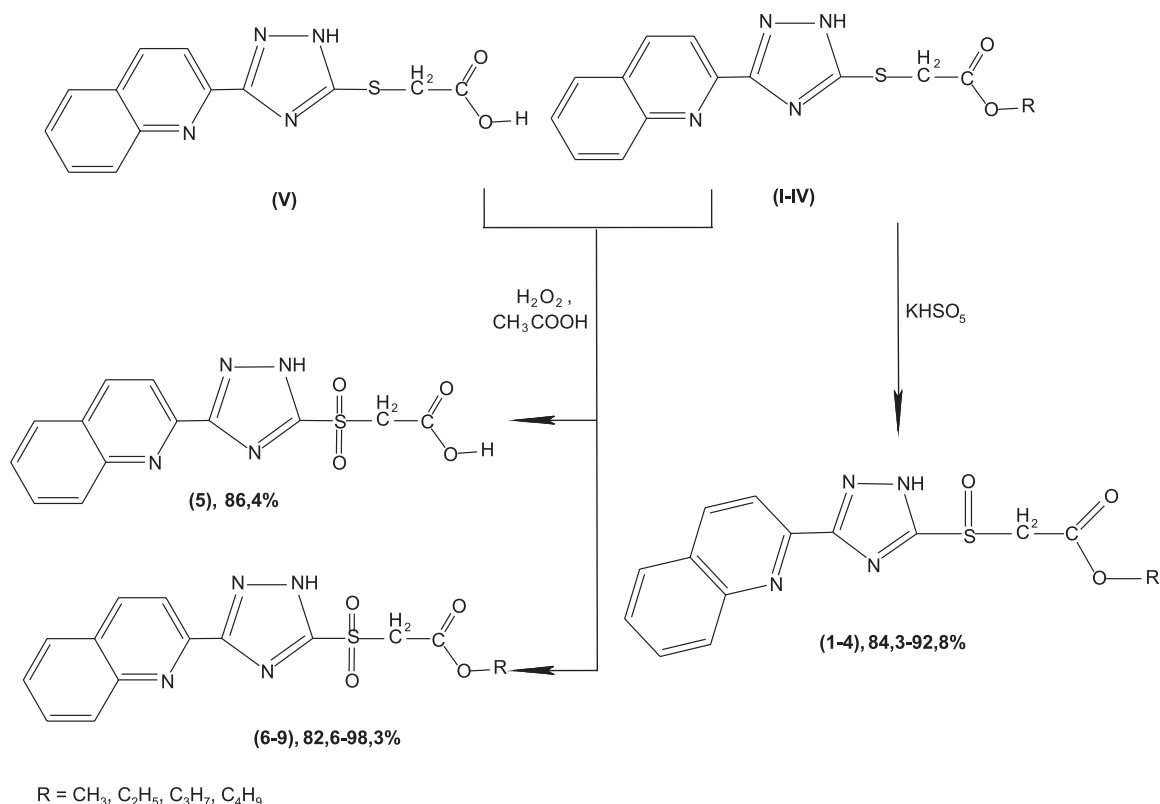
### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### Естери 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфініл)етанової кислоти (1-4, табл. 1)

До суміші 0,01 Моль відповідного естеру 2-(5-(хінолі-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти (I-IV) у 10 мл 1,4-діоксану додають 0,01 Моль розчину калію гідрогенпероксосульфату і залишають на 24 год при температурі, не вищій за 0 °С. Осади продуктів реакції відфільтровують, при цьому отримують сполуки 1-4. Світло-жовті кристалічні речовини мало розчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках. Для аналізу сполуки 1-4 очищені кристалізацією з суміші ацетатна кислота-вода 1 : 1.

© Каплаушенко Т. М., Панасенко О. І.,  
Кучерявий Ю. М., 2016





**Рис.** Схема синтезу 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфоніл)етанової кислоти, її естерів та естерів 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфініл)етанової кислоти.

**2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфоніл)етанова кислота (5) та її естери (6-9, табл. 1)**

**Спосіб А.** До розчину 0,01 Моль 2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти (V) в 30 мл концентрованої оцетатної кислоти додають 5 мл 33 % розчину гідрогену пероксиду. Суміш залишають при кімнатній температурі на 56 год, розчинник випаровують.

**Спосіб Б.** До розчину 0,01 Моль 2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти (V) або до розчинів 0,01 Моль естерів 2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти (I-IV) в 30 мл концентрованої оцетатної кислоти додають 5 мл 33 %

розчину гідрогену пероксиду. Суміш нагрівають протягом 5 год на водяній бані при температурі 75 °С, розчинник випаровують. Кристалічні речовини білого (7, 8) та жовтого (5, 6, 9) кольору важко розчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках. Для аналізу 2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфоніл)етанової кислоти (5) вона була перекристалізована з ДМФА, а її метиловий естер (6) – із суміші метанол : вода 1 : 1. Етиловий (7), пропіловий (8) та бутиловий (9) естери 2-(4-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфо)етанової кислоти очищені кристалізацією із суміші оцетатна кислота:вода 1 : 1.

Таблиця 1

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ КОНСТАНТИ 2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)СУЛЬФОНІЛ)ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ, ЇЇ ЕСТЕРІВ ТА ЕСТЕРІВ 2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)СУЛЬФІНІЛ)ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ**

Сполука	$\text{R}_1$	Т. пл., °С	Брутто-формула	Вихід, %	Знайдено, %				Обчислено, %			
					C	H	N	S	C	H	N	S
1	$\text{CH}_3$	>220	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	90,1	53,07	3,78	17,85	10,07	53,16	3,82	17,71	10,14
2	$\text{C}_2\text{H}_5$	201-203	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	84,3	54,47	4,96	17,02	9,90	54,53	4,87	16,96	9,71
3	$\text{C}_3\text{H}_7$	216-218	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	92,8	55,83	4,68	16,35	9,24	55,80	4,68	16,27	9,31
4	$\text{C}_4\text{H}_9$	>220	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	87,7	57,09	4,94	16,62	8,96	56,97	5,06	15,63	8,95
5	H	>285	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	86,4	48,94	3,17	17,74	9,98	49,05	3,17	17,60	10,07
6	$\text{CH}_3$	>220	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	86,9	50,67	3,69	16,89	9,54	50,60	3,64	16,86	9,65
7	$\text{C}_2\text{H}_5$	197-199	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	98,3	52,19	3,98	16,14	16,24	52,02	4,07	16,18	9,26
8	$\text{C}_3\text{H}_7$	202-204	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	82,6	53,30	4,47	15,60	8,88	53,32	4,47	15,55	8,90
9	$\text{C}_4\text{H}_9$	102-104	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	94,8	54,47	4,93	15,05	8,54	54,53	4,85	14,96	8,56

Таблиця 2

**МАКСИМУМИ ПОГЛИНАННЯ В ІЧ-СПЕКТРАХ ЕСТЕРІВ  
2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)СУЛЬФІНІЛ) ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ**

Сполука	Частота поглинання, см <sup>-1</sup>					
	$\nu_{C=N_{цикл}}$	$\nu_{CH_3}^{s/as}$	$\nu_{H_{in}}$	$\nu_{R_2SO}$	$\nu_{C-O-C}$	$\nu_{C-S}$
1	1647	2840/3055	1510	1083	1744	654
2	1570	2875/2990	1570	1054	1730	634
3	1595	2860/2975	1538	1017	1730	635
4	1630	2875/2958	1523	1063	1726	690

Таблиця 3

**МАКСИМУМИ ПОГЛИНАННЯ В ІЧ-СПЕКТРАХ  
2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)СУЛЬФІНІЛ)ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ ЕСТЕРІВ**

Сполука	Частота поглинання, см <sup>-1</sup>					
	$\nu_{C=N \text{ у циклі}}$	$\nu_{H_{in}}$	$\nu_{C-S}$	$\nu_{-CH_2-}^{s/as}$	$\nu_{C-O-C}$	$\nu_{-R_2SO_2-}$
5	1620	1502	623	2880/2919	1704	1134
6	1648	1510	632	2870/2905	1725	1140
7	1635	1542	634	2885/2915	1740	1136
8	1608	1515	759	2890/2902	1712	1138
9	1610	1520	733	2810/2915	1724	1139

Проба змішування речовини 5, отриманої за способами А і Б, не дала депресії температури плавлення.

Хімічні назви сполук наведені згідно з номенклатурою IUPAC (1979 рік) і рекомендаціями IUPAC (1993 рік).

Вивчення деяких фізико-хімічних властивостей синтезованих сполук проводили згідно з методами, наведеними у Державній фармакопеї України (ДФУ, вид. 1). Температуру плавлення визначали капілярним способом (2.2.14) на приладі ПТП (М).

Елементний склад нових сполук встановлено на елементному аналізаторі ELEMENTAR vario EL cube (стандарт – сульфаніламід).

ІЧ-спектри записувались у таблетках калію броміду (концентрація речовини 1 %) на спектрофотометрі Specord M-80 в ділянці 4000-500 см<sup>-1</sup> (умови сканування: щільова програма 3.0, постійна часу –  $\tau = 3$  с, час сканування 33 хв). Таблетки готувалися спільним розтиранням 200 мг калію броміду і 2 мг досліджуваної сполуки з наступним пресуванням.

<sup>1</sup>H ЯМР-спектри реєструвались на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу «Varian VXR-300», розчинник DMSO-D<sub>6</sub>, в внутрішній стандарт – тетраметилсилан і розшифровувались за допомогою комп'ютерної програми ADVASP 143.

Розрахунки електронних структур молекул проводили напівемпіричним методом AM1 (MOPAC 2000) з повною оптимізацією геометричної будови молекули для одержання значень енергій молекулярних орбіталей з використанням програми Hyper Chem® 6.0.

Мас-спектральні дослідження синтезованих сполук проводили на приладі Varian 1200L, іонізація здійснюється електронним ударом (70 eV) при прямому

введенні зразка. Температура іонного джерела – 200 °С; нагрівання відбувається від 25 °С до 390 °С зі швидкістю 300 С/хв.

Хромато-мас і УФ-спектри отримані з використанням прибору LC MS: Agilent 1260 Infinity HPLC System (Degasser, Bynary Pump, Autosampler, Thermostat Column Compartment, DAD); Agilent single-quadrupole mass spectrometer 6120 with electrospray ion-source (ESI); OpenLAB CDS Software. Умови проведення ВЕРХ-МС вивчення: 1) Binary gradient. А: H<sub>2</sub>O (HCOOH 0.1 %), В: CH<sub>3</sub>CN (HCOOH 0.1 %). 2) Column. Zorbax SB-C18, 30 mm × 4.6 mm, 1.8 μm. 3) Column temperature: 25 °С. 4) DAD: 210, 254, 280 nm. 5) Ion Source: API-ES. 6) Scan. Mass Range: 160-500. 7) Fragmentor: 10V. 8) Positive polarity. Інші реактиви були не нижчі за кваліфікацію для ВЕРХ.

Хроматографію в тонкому шарі сорбенту проводили на пластинках силікагель 60 ALUGRAMSill G\UV254 (алюм. підкл. 20 × 20) (Махерей-Нагель), або силікагель 60 ALUGRAMSill G\UV254 (алюм. підкл. 10 × 20) (Махерей-Нагель).

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати визначення елементного складу показали (табл. 1), що експериментальні дані не відрізняються від теоретичних більш ніж на 0,29 %.

В ІЧ-спектрах синтезованих естерів (1-4) наявні смуги поглинання –C=N-груп при 1647-1595 см<sup>-1</sup>, C-S-груп – при 690-635 см<sup>-1</sup>, смуг поглинання хінолінового замісника – при 1570-1523 см<sup>-1</sup>, також смуги у межах 1744-1726 см<sup>-1</sup>, що характеризуються смугами поглинання C-O-C-груп і смуги в інтервалі 1083-1017 см<sup>-1</sup>, характерні для R<sub>2</sub>SO-груп [4] (рис.).

ІЧ-спектри синтезованих естерів (6-9) характеризуються наявністю смуг поглинання  $\text{C}=\text{N}$ -груп при  $1648\text{--}1608\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}-\text{S}$ -груп – при  $759\text{--}623\text{ cm}^{-1}$ , смуг поглинання хінолінового циклу при  $1542\text{--}1502\text{ cm}^{-1}$ , а також смуг у межах  $1740\text{--}1712\text{ cm}^{-1}$ , що вказують на наявність  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -груп, і смуг в інтервалі  $1140\text{--}1134\text{ cm}^{-1}$ , притаманних  $\text{R}_2\text{SO}_2$ -групам [4] (рис.).

### ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики отримання 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфоніл)етанової кислоти та її естерів, а також естерів 2-(5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-іл)сульфініл)етанової кислоти. Всього синтезовано 9 нових речовин.
2. Структуру синтезованих сполук підтверджено комплексним використанням сучасних фізико-хімічних методів аналізу.
3. На наступному етапі дослідження планується встановлення показників біологічної активності синтезованих сполук.

### Перспективи подальших наукових досліджень

Перспективою проведених досліджень є встановлення показників гострої токсичності та подальше вивчення фармакологічних властивостей синтезованих сполук.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості S-похідних 5-(2-, 3-, 4-нітро-феніл)-1,2,4-триазол-3-тіонів: дис. ... канд. фармацевт. наук. – Запоріжжя, 2005. – 201 с.
2. Колесник Ю. М. Похідні 4-аміно та 3-тіо-1,2,4-триазолу як потенційні лікарські засоби: [монографія] / [Ю. М. Колесник, А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш та ін.]. – Запоріжжя, 2014. – 278 с.
3. Кучерявий Ю. М. Синтез 5-(феноксиметил)-4-R-3-алкілтіо-1,2,4-триазолів та їх подальше окиснення до 3-алкілсульфонілпохідних / Ю. М. Кучерявий, А. Г. Каплаушенко, Ф. Ал. Зедан // Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. – 2015. – № 19. – С. 14-18.
4. Тарасевич Б. Н. ИК-спектры основных классов органических соединений: [справ. матер.]. – М.: МГУ, 2012. – 54 с.
5. Щербак М. О. Методи синтезу, фізико-хімічні властивості та подальші перетворення в ряду 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіонів / М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко // Фармац. журн. – 2013. – № 2. – С. 10-19.
6. Anisimov A. V. Oxidation of organic sulfur compounds with hydrogen peroxide in the presence of crown ethers / [A. V. Anisimov, V. T. Pham, A. V. Tarakanova et al.] // Moscow University Chemistry Bull. – 2008. – С. 48-54.
7. Samelyuk Y. G. Synthesis of 3-alkylthio(sulfo)-1,2,4-triazoles, containing methoxyphenyl substituents at C<sup>5</sup> atoms, their antipyretic activity, propensity to adsorption and acute toxicity / Y. G. Samelyuk, A. G. Kaplaushenko // J. of Chem. and Pharmac. Res. – 2014. – № 6. – С. 1117-1121.

**УДК 547.792'831:543.382****Т. Н. Каплаушенко, А. И. Панасенко, Ю. Н. Кучерявый****ОКИСЛЕНИЕ 2-(5-(ХИНОЛИН-2-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛ)ТИО)-ЭТАНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ЭФИРОВ ДО 3-ИЛСУЛЬФИНИЛ- И 3-ИЛСУЛЬФОНИЛПРОИЗВОДНЫХ**

Одной из приоритетных задач современной фармацевтической науки является синтез биологически активных соединений и создание на их основе новых высокоэффективных лекарственных средств, которые могли бы конкурировать с дорогими импортными препаратами. Большой интерес в этом плане вызывают гетероциклические системы, в том числе 3-тиопродериваты 1,2,4-триазола, содержащие хинолиновый радикал в пятом положении 1,2,4-триазолового цикла. Ядро 1,2,4-триазола является структурным фрагментом многих синтетических лекарственных средств с противогрибковой (флуконазол, итраконазол), антидепрессивной (тразодон, альпразолам), противовирусной (тиотриазолин), гепатопротекторной и ранозаживляющей активностью. Высокие биологические свойства обнаружены также у веществ, содержащих хинолиновые заместители. Таким образом, синтез новых молекул в ряде производных 1,2,4-триазола является перспективным и актуальным направлением науки, имеет теоретическую и практическую значимость.

**Ключевые слова:** 1,2,4-триазол; синтез; химические свойства; хромато-масс-спектрометрия

**UDC 547.792'831:543.382****T. M. Kaplaushenko, O. I. Panasenko, Yu. M. Kucheryavyy****OXYDATION OF 2-(5-(QUINOLINE-2-YL)-1,2,4-TRIAZOLE-3-YL)THIO)ETHANOIC ACID AND ITS ESTERS TO 3-YLSULFONYL- AND 3-YLSULFINYLDERIVATIVES**

One of priority tasks of modern pharmaceutical science is the synthesis of biologically active compounds and creation of new highly effective drugs which could compete with expensive imported medicines. The heterocyclic systems, including a 3-thioderivatives of 1,2,4-triazoles containing quinoline radical in the fifth position of 1,2,4-triazole cycle cause the interest in this branch of chemistry. The nucleus of 1,2,4-triazole is a structural fragment of many synthetic drugs with antifungal (fluconazole, itraconazole) antidepressant (trazodone, alprazolam), antiviral (thiotriazolin), hepatoprotective and wound healing activities. High biological properties also have been found in substances containing quinoline substituents. So, the synthesis of new molecules in the range of 1,2,4-triazole derivatives is prospective and actual direction of science. It has theoretical and practical significance.

**Key words:** 1,2,4-triazole; synthesis; chemical properties; HPLC-MS

Адреса для листування:

69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26, к. 326.

Тел. (095) 3506704.

Запорізький державний медичний університет

Надійшла до редакції 31.05.2016 р.



# ***Біохімія та фармакологія***

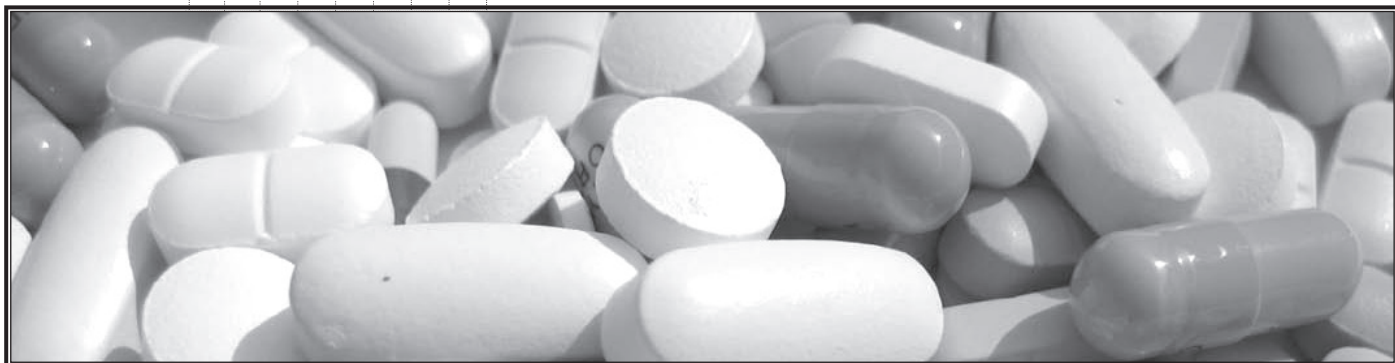
## **Рецензенти рубрики:**

**Штриголь С. Ю.,**  
*д. мед. н., професор*

**Загайко А. Л.,**  
*д. біол. н., професор*

**Кононенко Н. М.,**  
*д. мед. н., професор*

**Дроговоз С. М.,**  
*д. мед. н., професор*



UDC 615.454.2:543.544.5:001.891

L. V. BRUN<sup>1</sup>, V. I. MAKOLINETS<sup>2</sup>, S. N. GUBAR<sup>1</sup><sup>1</sup>National University of Pharmacy<sup>2</sup>SE "Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"

## PHARMACOKINETIC STUDY OF DICLOPHENAC SODIUM IN RAT PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

*The aim of this study is to determine pharmacokinetics of diclofenac sodium in the experiment on rats by the method of high-performance liquid chromatography. Identification and quantitative determination of diclofenac sodium in the substance of diclofenac sodium were carried out by the method of high-performance liquid chromatography. For study conduct, a total of 94 male rats with body weight of 250-300 g were used. Experimental animals were subdivided into 15 groups. Diclofenac sodium was diluted in purified water and administered per os at the doses of  $ED_{50}$  and  $\frac{1}{2} ED_{50}$  equivalent to 8 mg/kg and 4 mg/kg of animal body weight, respectively. Animals were sacrificed in 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 240 min, and 360 after drug administration. For extraction of diclofenac sodium from rat plasma samples, we used a method of solid-phase extraction, which had been modified due to micro-concentrations of the active substance. Dependence of diclofenac sodium concentration on time and dose was studied by the method of high-performance liquid chromatography. In the result of the study, quantitative content of diclofenac sodium substance and suitability of the doses studied (4 mg/kg and 8 mg/kg) were confirmed. The study conducted revealed no dynamics of time, during which diclofenac sodium was present in systemic blood flow, on the dose. The results, which had been proved by chromatograms of diclofenac sodium and control sample (plasma without diclofenac) for each time interval, were obtained. First concentrations of diclofenac sodium in rat plasma are registered in rat plasma in 15 min after dose administration at the doses of 4 and 8 mg/kg. That is why this time index is recommended for further preclinical and clinical studies.*

**Key words:** pharmacokinetics; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; diclofenac sodium; glucosamine; high-performance liquid chromatography

### INTRODUCTION

Today, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute one of the largest and clinically significant groups of drugs. In recent 30 years, its nomenclature has increased greatly and now it includes a great number of drugs that differ as for their peculiarities of action and use [3, 4, 6]. Diclofenac sodium (DNA) remains "the gold standard" in treatment of inflammatory diseases of connective tissue and is most widely used in modern medicine and pharmacy. So, studies of its pharmacological activity characteristics depending on dose and time are an important and urgent problem.

The aim of this work is to determine pharmacokinetics of DNA in experiments on rats by the method of high-performance liquid chromatography for further preclinical and clinical studies.

### MATERIALS AND METHODS

Diclofenac sodium (DNA), sodium 2-[(2,6 – dichlorophenyl) amino] phenyl] acetate, has marked anti-in-

flammatory, analgetic, as well as moderate antipyretic activities [3, 6]. Substance of DNA manufactured by Borshchahivskiy Chemical-Pharmaceutical Plant (BCPP), batch No. 20040609, was used for the study. Substance of DNA manufactured by "Amoli Organics Ltd" (batch No. 20061013) was used as a working reference standard (WRS).

Identification and quantitative determination of DNA in the substance of DNA were carried out by most sensitive method of high-performance liquid chromatography [2, 7, 8, 9, 10]. This method was used to determine concentrations of the test substance at all stages of the study.

The content of DNA in the substance (X), in per cent, was calculated according to the following formula:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{WRS} \cdot P \cdot 100}{S_{WRS} \cdot m_x \cdot (100 - W)}$$

where:  $S_x$  is the mean peak area of diclofenac sodium calculated from chromatograms of the test solution;  $S_{WRS}$  is the mean peak area of diclofenac sodium calculated from chromatograms of the reference solution;  $m_{WRS}$  is the weight of diclofenac sodium WRS, g; P is the content

© Brun L. V., Makolinet V. I., Gubar S. N., 2016

Table 1

## TACTICS OF PHARMACOKINETIC STUDY OF DICLOFENAC SODIUM ON RATS

Conditions of the experiment	Dose, mg/kg	Time of DNA entry into rat blood						
		360 min	240 min	120 min	90 min	60 min	30 min	15 min
Intact	–	Group No.						
		1						
Diclofenac sodium	4	2	3	4	5	6	7	8
Diclofenac sodium	8	9	10	11	12	13	14	15

of diclofenac sodium in the WRS, %;  $m_x$  is the weight of diclofenac sodium substance, g; W is the loss on drying of diclofenac sodium substance, %.

Experimental studies were carried out at experimental biological clinics of the State Enterprise "Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine". Animals used in the experiment: nonlinear white rats of the population of experimental biological clinics of the State Enterprise "Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

For study conduct, 94 male rats with body weight of 250–300 g were selected; they were kept according to sanitary norms on a standard diet [2]. Work with animals was carried out according to Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Experimental animals were subdivided into 15 groups. An intact group (group 1) consisted of 10 rats, and groups 2–15 consisted of 6 rats each. Animals of group 1 received purified water in the volume of 0.5 mL per 100 g [2]. DNA was diluted in purified water and administered per os in the same volume at the doses of  $ED_{50}$  and  $\frac{1}{2} ED_{50}$ , equivalent to 8 mg/kg and 4 mg/kg of animal body weight, respectively [2, 3, 6].

Pharmacokinetic study of DNA was carried out according to the tactics under conditions indicated in Tab. 1. Animals were sacrificed in 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 240 min, and 360 after drug administration.

Blood was sampled in the quantity of 7–10 ml into labeled test-tubes that were heparinized. Blood samples were centrifuged (3.000 rpm, 15 min), and plasma was obtained. The interval between blood sampling and its processing did not exceed 5 min. Before analysis, plasma samples were kept at  $-80^\circ\text{C}$ .

For extraction of DNA from rat plasma samples, a method of solid-phase extraction was used [10]. The method had been modified due to micro-concentrations of the active substance via sample concentration [1].

After determination of DNA concentration depending on the time of its administration, the following pharmacokinetic parameters were calculated by the noncompartmental method of statistical moments with the use of application software program M-ind on IBM PC Pentium III:  $C_{\max}$  (maximal concentration);  $T_{\max}$  (time to maximum drug concentration);  $T_{1/2}$  (half-life);  $Cl_T$  (total clearance);  $AUC^{0-\infty}$  (area under the concentration-time curve within

the limit of drug concentration observation);  $AUC^{0-\infty}$  (total area under the concentration-time curve within the limit of 0 to  $\infty$ );  $C_{\max}/AUC^{0-\infty}$  (coefficient that characterizes drug absorption rate).

Statistic processing of experimental data obtained was carried out with software STATISTICA (StatSoft Inc., the USA). Reliability of the results obtained was assessed at the level of significance not less than 95 % ( $p \leq 0.05$ ) [5].

## RESULTS AND DISCUSSION

## Quantitative determination of diclofenac sodium in rat plasma

## Comparative characteristic of diclofenac sodium substance

Results of quantitative determination of DNA in substance samples are indicated in Tab. 2.

Chromatograms of DNA substance samples obtained under the same conditions are presented in Fig. 1, where the following is indicated: 1. – chromatogram of DNA manufactured by Amoli Organics Ltd; 2. – chromatogram of DNA used in the experiment as WRS manufactured by Borshchahivskiy Chemical-Pharmaceutical Plant (BCPP).

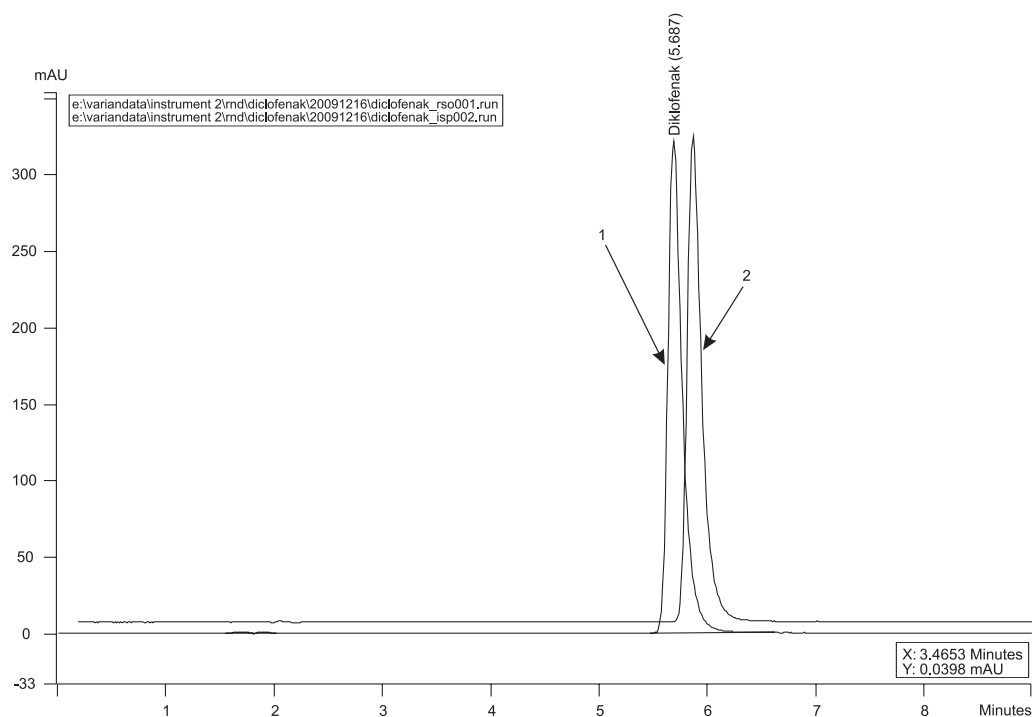
Quantitative content of DNA in DNA substance (BCPP) used in the experiment is 98.5 %.

Retention time of DNA in the chromatogram of the test sample of the solution (5.673 min) corresponds to that of DNA in the chromatogram of DNA WRS (5.673 min), so the sample provided is DNA substance. In the result of the studies conducted, quantitative content of DNA and

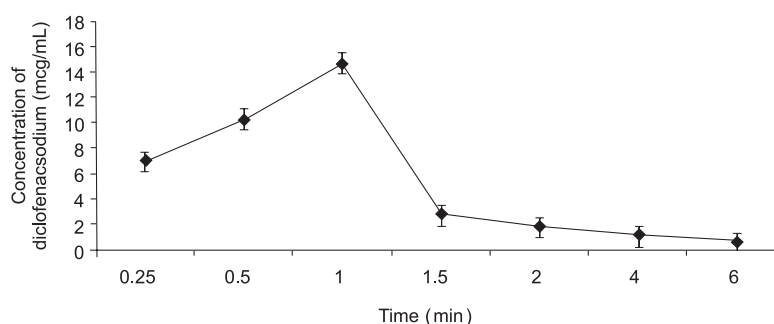
Table 2

## RESULTS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DICLOFENAC SODIUM IN SUBSTANCE SAMPLES

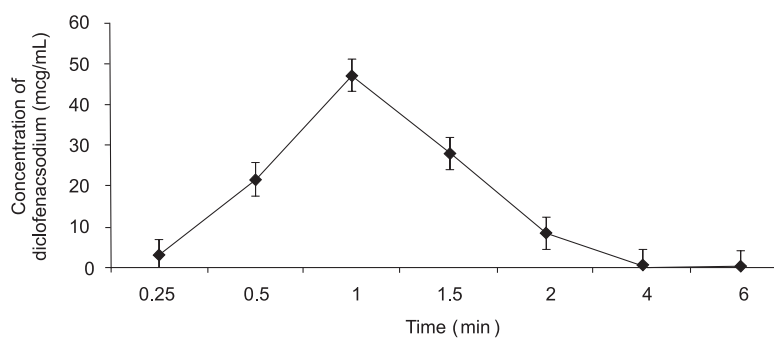
Mean peak area of diclofenac sodium manufactured by Amoli Organics Ltd, India ( $S_{WRS}$ )	15570622
Exact weight of diclofenac sodium (Amoli Organics Ltd) ( $m_{WRS}$ ), g	0,0120
Content of diclofenac sodium (Amoli Organics Ltd) in the substance (P), %	99,4
Loss on drying (Amoli Organics Ltd) ( $W_{WRS}$ ), %	0,36
Mean peak area of diclofenac sodium (BCPP) ( $S_x$ )	14993617
Exact weight of diclofenac sodium (BCPP) ( $m_x$ ), g	0,0117
Content of diclofenac sodium (BCPP) in the substance (X), %	98,5



**Fig. 1.** Chromatograms of samples of diclofenac sodium substance.



**Fig. 2.** Pharmacokinetic curve of diclofenac sodium (dose of 4 mg/kg).



**Fig. 3.** Pharmacokinetic curve of diclofenac sodium (dose of 8 mg/kg).

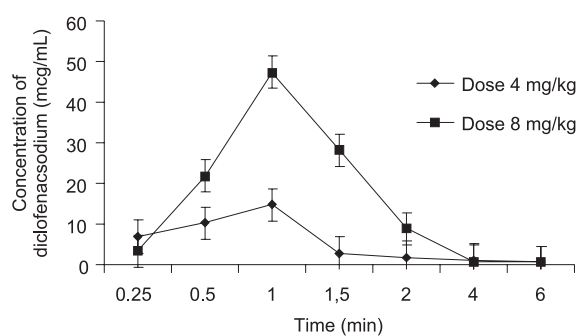
suitability of the doses studied. Actual doses of DNA during study conduct are 4 mg/kg and 8 mg/kg, respectively.

#### Assessment of pharmacokinetic parameters of diclofenac sodium

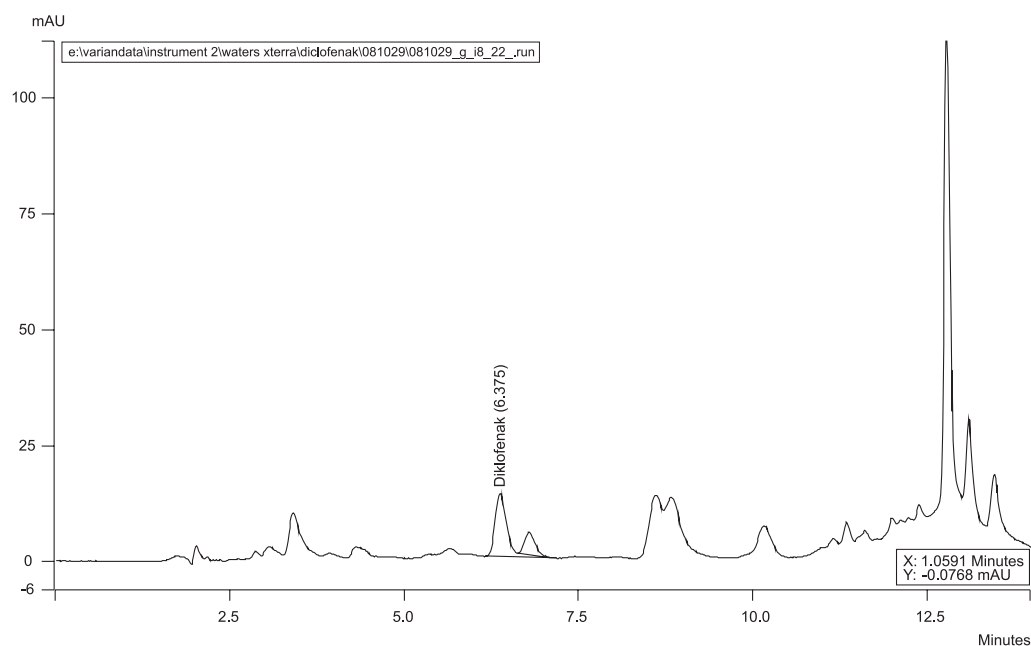
Profiles of averaged pharmacokinetic curves of dynamics of DNA rat plasma concentrations after single oral administra-

tion of 4 mg/kg and 8 mg/kg and their comparative characteristic are presented in Fig. 2-4. DNA is registered in plasma already in 15 min after substance administration of both doses studies. At the same time, DNA concentration at this time is  $4.88 \pm 0.82$  mcg/mL at administration of 4 mg/kg, and  $17.45 \pm 1.38$  mcg/mL at administration of 8 mg/kg.

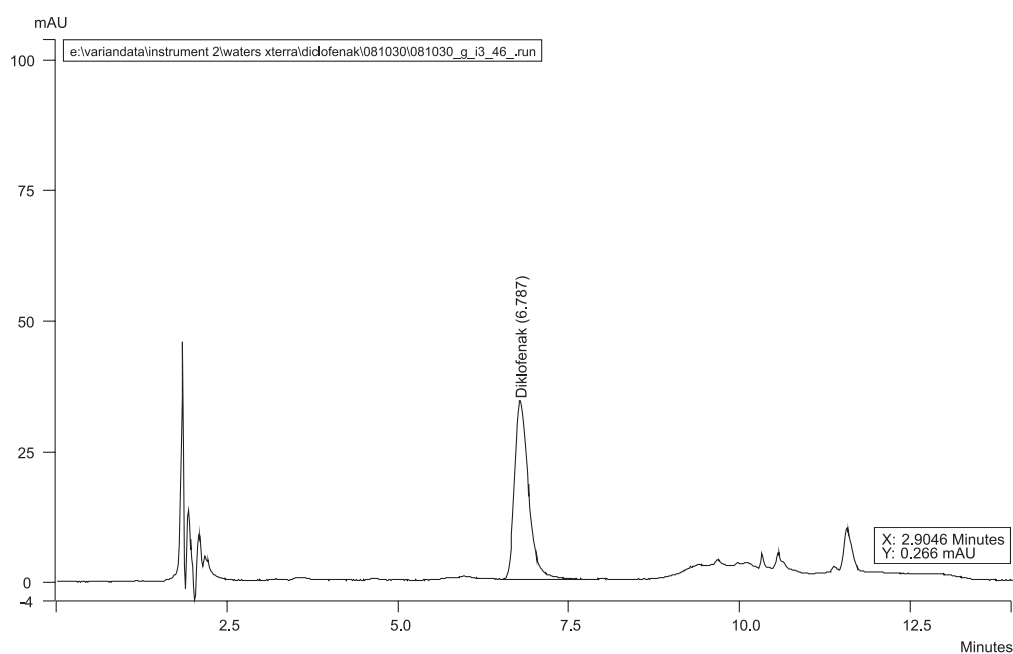




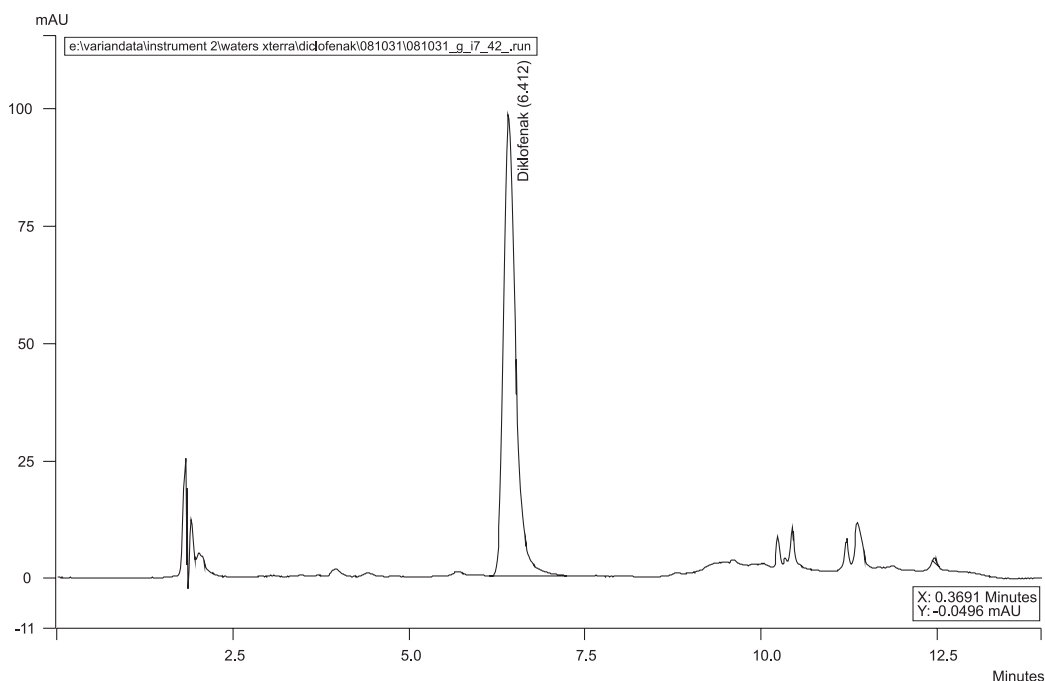
**Fig. 4.** Comparison of pharmacokinetic curves of diclofenac sodium (doses of 4 mg/kg and 8 mg/kg).



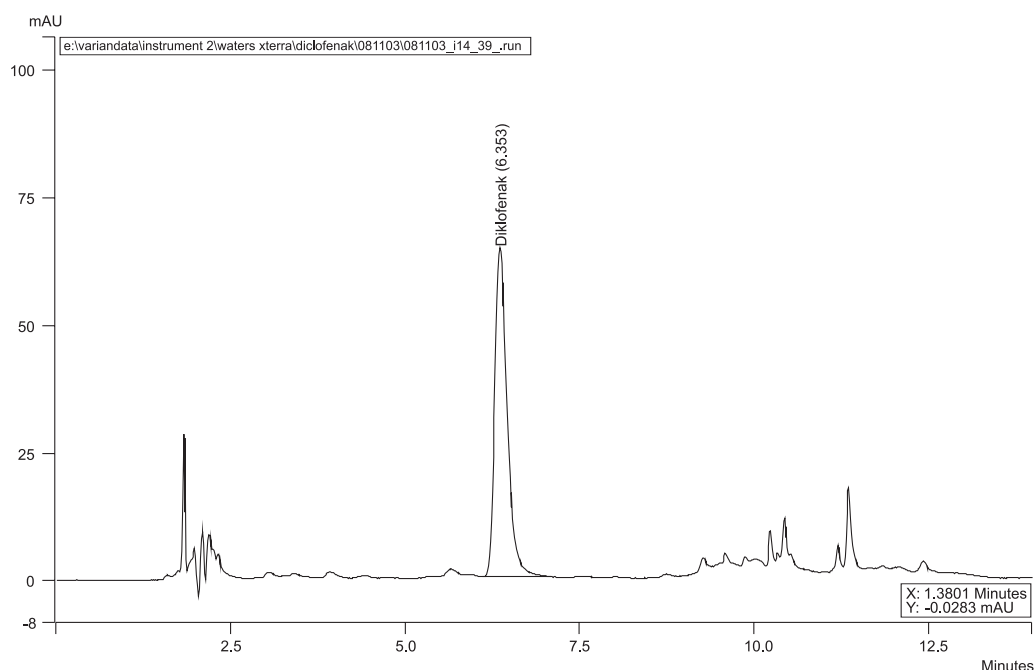
**Fig. 5.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 15 min after drug administration).



**Fig. 6.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 30 min after drug administration).



**Fig. 7.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 60 min after drug administration).



**Fig. 8.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 90 min after drug administration).

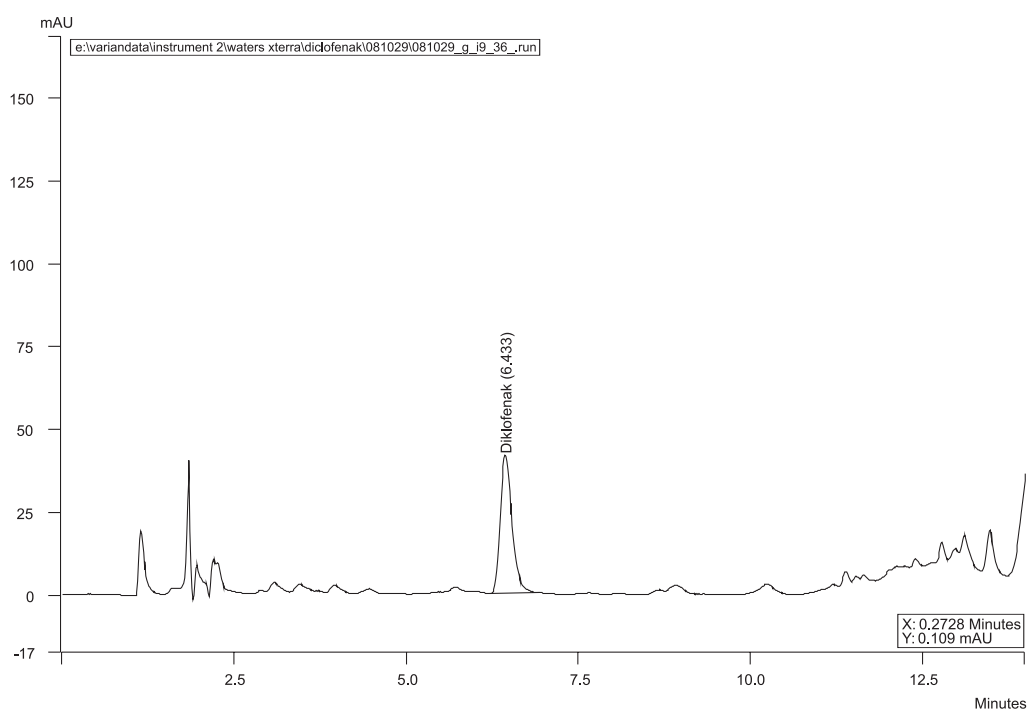
After that, DNA plasma content increases rapidly and reaches its maximum within 60 min. At the same time, its concentration  $14.72 \pm 0.07$  mcg/mL at administration of 4 mg/kg, and  $47.41 \pm 0.44$  mcg/mL at administration of 8 mg/kg.

Starting with 90 min, there is noted a decrease in DNA plasma concentration, which is decreased 5.37-folds at administration of 4 mg/kg, and 1.68-folds at administration of 8 mg/kg when compared to initial product concentration. This indicated to the fact that DNA at the dose

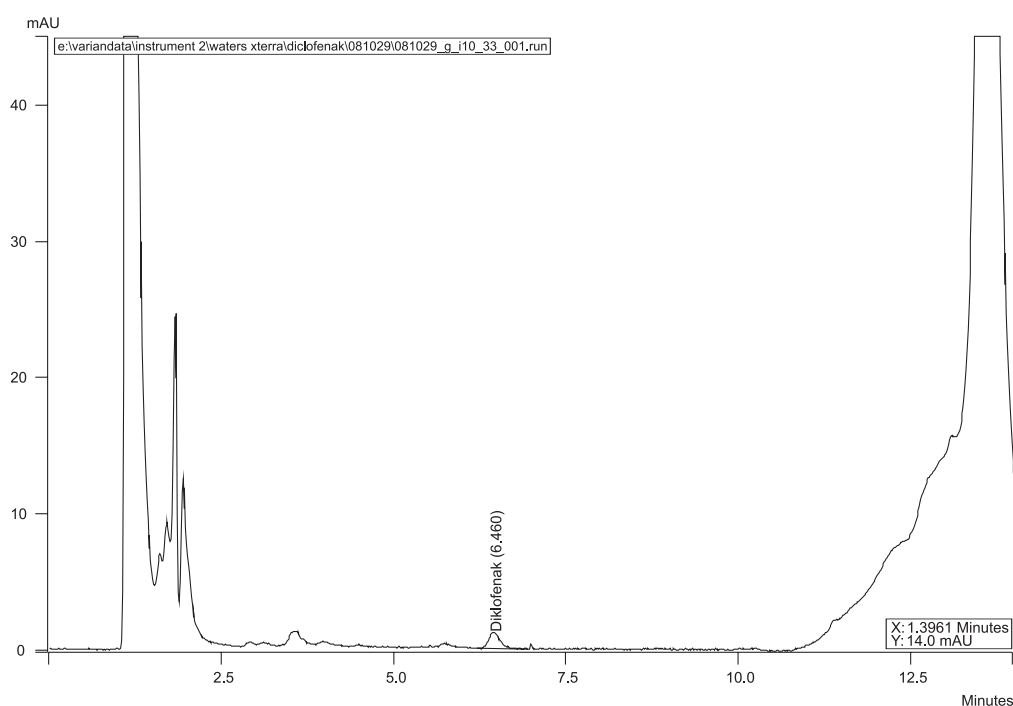
of  $\frac{1}{2}$  ED<sub>50</sub> is excreted from rat blood flow much more rapidly.

Starting with 120 min, there is noted too low level of DNA plasma concentration (be close to the limit of analytical method).

Pharmacokinetic parameters calculated are as follows: at administration of DNA 4 mg/kg, C<sub>max</sub> is  $15.16 \pm 0.24$  mcg/mL, T<sub>max</sub> is  $0.8 \pm 0.06$  h, T<sub>1/2</sub> is  $0.36 \pm 0.02$  h, Cl<sub>T</sub> is  $0.04 \pm 0.00$  L/h, MRT is  $1.63 \pm 0.04$  h, AUC<sub>0-t</sub> is  $20.38 \pm 0.54$  mcg×h/mL, AUC<sub>0-∞</sub> is  $20.93 \pm 0.51$  mcg×h/mL,



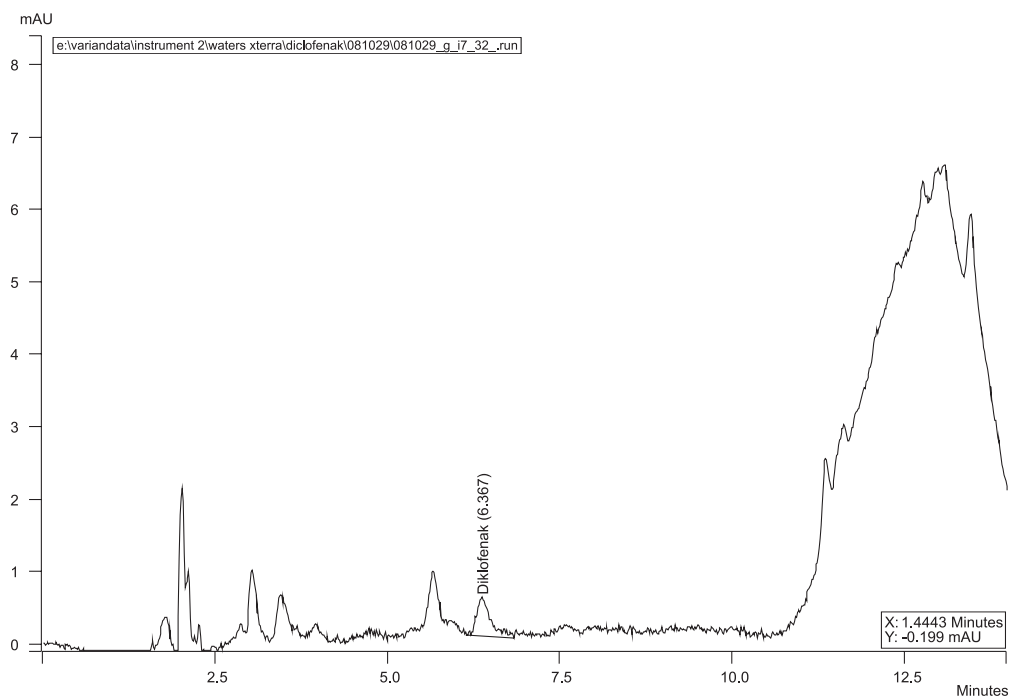
**Fig. 9.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 120 min after drug administration).



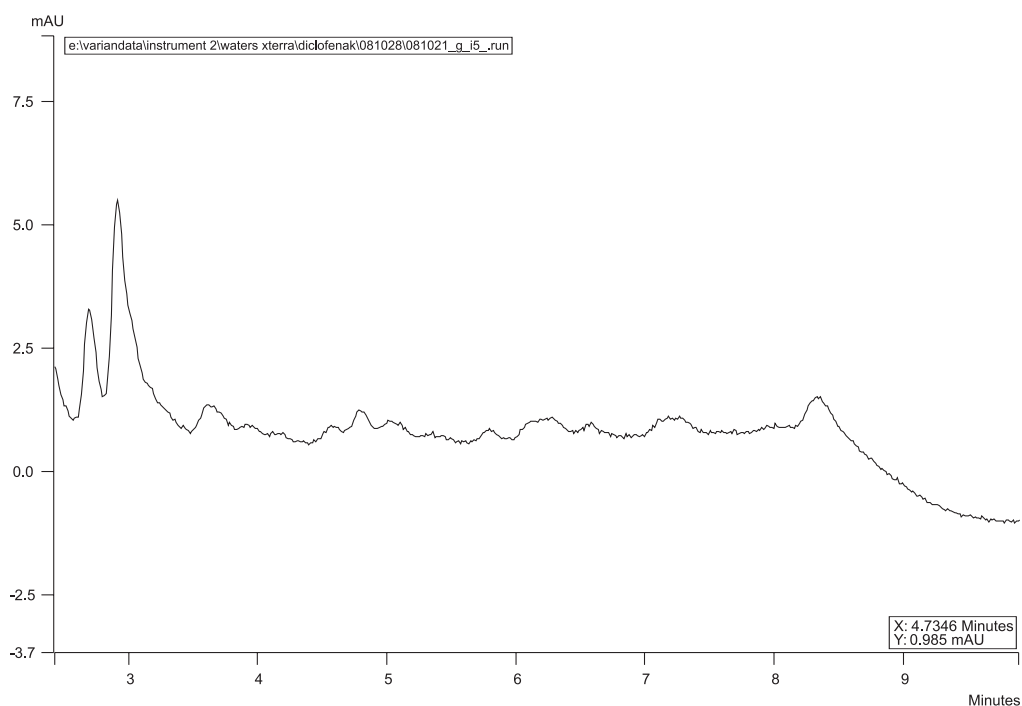
**Fig. 10.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 240 min after drug administration).

$C_{max}/AUC^{0 \rightarrow \infty}$  is  $0.73 \pm 0.01$  mcg/h. At administration of DNA 8 mg/kg,  $C_{max}$  is  $47.14 \pm 0.44$  mcg/mL,  $T_{max}$  is  $1.00 \pm 0.00$  h,  $T_{1/2}$  is  $0.09 \pm 0.00$  h,  $Cl_T$  is  $0.03 \pm 0.00$  L/h,  $MRT$  is  $1.3 \pm 0.00$  h,  $AUC_{0-t}$  is  $63.52 \pm 0.18$  mcg×h/mL,  $AUC^{0 \rightarrow t}$  is  $63.61 \pm 0.18$  mcg×h/mL,  $C_{max}/AUC^{0 \rightarrow \infty}$  is  $0.74 \pm 0.01$  1/h. The value of  $C_{max}/AUC^{0 \rightarrow \infty}$  index administration of 4 mg/kg practically completely corresponds to that of 8 mg/kg.

Thus, in the result of studies conducted, no differences in the dynamics of time during which DNA is present in systemic blood flow on the dose are determined. The results obtained are proved by chromatograms of DNA and control sample (plasma without DNA) for each time interval; they are presented in Fig. 5-12.



**Fig. 11.** Chromatogram of diclofenac sodium (in 360 min after drug administration).



**Fig. 12.** Chromatogram of the control solution (plasma without diclofenac).

### CONCLUSIONS

Dependence of diclofenac sodium concentration of dose and time has been determined in rat experiments by the method of high-performance liquid chromatography. According to study results, first concentrations of diclofenac sodium in rat plasma are registered in rat plasma in 15 min after dose administration at the doses of 4

and 8 mg/kg. That is why this time index is recommended for further preclinical and clinical studies.

### REFERENCES

1. Брунь Л. В., Губарь С. М. Розробка методики кількісного визначення диклофенаку натрію в плазмі крові щурів методом високоефективної рідинної



- хроматографії з урахуванням особливостей аналізу мікроконцентрації діючої речовини / Л. В. Брунь, С. М. Губарь // УБФЖ. – 2016. – № 3 (44). – С. 54-59.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. О. В. Сефанова. – К.: Авіценна, 2001. – С. 528.
  3. Компендиум 2015 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: Морион, 2015. – 2320 с.
  4. Корж Н. А. Остеоартроз: консервативная терапия: [монография] / [Н. А. Корж, А. Н. Хвисюк, Н. В. Дедух и др.]; под ред. Н. А. Коржа, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2007. – 424 с.
  5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
  6. Налетов С. В. Клиническая фармакология и фармакотерапия: [монография] / [С. В. Налетов, Т. Д. Бахтеева, В. Н. Казаков и др.]; под ред. С. В. Налетова. – Севастополь: Вебер, 2005. – 672 с.
  7. Brunner L. A. An automated method for the determination of diclofenac sodium in human plasma / L. A. Brunner, R. S. Luders // J. Chromatogr. Sci. – 1991. – Vol. 29, № 7. – P. 287-291.
  8. *In vivo* bioequivalence guidances (1090) – U.S. Pharmacopeia 23, NF 18. – 1995. – P. 3028-3053.
  9. Kamath B. V. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine / B. V. Kamath, K. Shivram, A. C. Shah // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 12, № 3. – P. 324-329.
  10. United States Pharmacopeia / Official Monographs. – 1995. – P. 546.

**УДК 615.454.2:543.544.5:001.891****Л. В. Брунь, В. І. Маколінець, С. М. Губарь****ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Метою даного дослідження є встановлення фармакокінетики диклофенаку натрію в експерименті на щурах методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Ідентифікацію та кількісне визначення диклофенаку натрію в субстанції диклофенаку натрію проводили методом ВЕРХ. Для проведення експерименту було використано 94 щурів-самців масою 250-300 г. Тварини в експерименті були розділені на 15 груп. Диклофенак натрію розчиняли у воді очищений та вводили перорально в дозах  $ED_{50}$  та  $\frac{1}{2} ED_{50}$ , що складає відповідно 8 мг/кг та 4 мг/кг маси тіла тварин. Тварин виводили з досліду через 15 хв, 30 хв, 60 хв, 90 хв, 120 хв, 240 хв та 360 хв після введення препарату. Для екстрагування диклофенаку натрію із зразків плазми крові щурів був використаний метод твердофазової екстракції, який був модифікований нами з урахуванням мікроконцентрації діючої речовини. Залежність концентрації диклофенаку натрію від часу та дози дослідили за допомогою методу ВЕРХ. При проведенні досліджень підтверджено кількісний вміст субстанції диклофенаку натрію та відповідність доз, які вивчаються (4 мг/кг і 8 мг/кг). У результаті проведених досліджень не виявлено відмінностей у динаміці часу знаходження диклофенаку натрію у системному кровообігу від дози. Отримані результати підтверджені хроматограмами диклофенаку натрію та контрольного зразка (плазма крові без диклофенаку) на кожний інтервал часу. Перші концентрації диклофенаку натрію реєструються в плазмі крові щурів через 15 хв після введення субстанції у дозах 4 та 8 мг/кг. Тому цей часовий показник рекомендується для подальших доклінічних та клінічних досліджень.

**Ключові слова:** фармакокінетика; нестероїдні протизапальні препарати; диклофенак натрію; глюкозамін; високоефективна рідинна хроматографія

**УДК 615.454.2:543.544.5:001.891****Л. В. Брунь, В. І. Маколінець, С. Н. Губарь****ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ ВИСОКОЭФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Целью данного исследования является установление фармакокинетики диклофенака натрия в эксперименте на крысах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Идентификацию и количественное изучение диклофенака натрия в субстанции диклофенака натрия проводили методом ВЭЖХ. Для проведения эксперимента были использованы 94 крысы-самцы массой 250-300 г. Животные в эксперименте были разделены на 15 групп. Диклофенак натрия растворяли в воде очищенной и вводили перорально в дозах  $ED_{50}$  та  $\frac{1}{2} ED_{50}$ , что составляет 8 мг/кг и 4 мг/кг массы тела животных. Животных выводили из эксперимента через 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 240 мин та 360 мин после введения препарата. Для экстрагирования диклофенака натрия из образцов плазмы крови крыс был использован метод твердофазовой экстракции, который был модифицирован нами с учетом микроконцентрации действующего вещества. Зависимость концентрации диклофенака натрия от времени и дозы исследовали с помощью метода ВЭЖХ. При проведении исследований подтверждено количественное содержание субстанции диклофенака натрия и соответствие изучаемых доз (4 мг/кг и 8 мг/кг). В результате проведенных исследований не определены различия в динамике времени нахождения диклофенака натрия в системном кровотоке от дозы. Полученные результаты подтверждены хроматограммами диклофенака натрия и контрольного образца (плазма крови без диклофенака) на каждый интервал времени. Первые концентрации диклофенака натрия регистрируются в плазме крови крыс через 15 мин после введения субстанции в дозах 4 та 8 мг/кг. Поэтому этот показатель времени рекомендуется для дальнейших доклинических и клинических исследований.

**Ключевые слова:** фармакокінетика; нестероїдні протизапальні препарати; диклофенак натрія; глюкозамін; високоєфективна жидкостна хроматографія

Адреса для листування:  
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 03.06.2016 р.

UDC 616.36:57.034:577.12

K. O. KALKO<sup>1</sup>, S. M. DROGOVOZ<sup>1</sup>, S. YU. SHTRIGOL<sup>1</sup>, A. V. KONONENKO<sup>1</sup>, V. A. ULANOVA<sup>1</sup>,  
T. K. YUDKEVICH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Pharmacy

<sup>2</sup>The Central Research Laboratory in National University of Pharmacy

## CIRCADIAN CHARACTERISTICS OF THE GLUTARGIN INFLUENCE ON PROTEIN AND PURINE METABOLISM UNDER THE CONDITIONS OF CHRONODETERMINATED ACETAMINOPHEN HEPATITIS IN RATS

*The aim of the work was to determine the circadian characteristics of the glutargin influence on protein and purine metabolism under the conditions of chronodetermined acetaminophen hepatitis in rats. Typical pathology was simulated by acetaminophen administration (dose of 1000 mg/kg on the rat) in such periods and hours of the day and night as morning (9.00), afternoon (15.00), evening (21.00), and night (3.00). The glutargin was administration in medical-preventive regime, that is an hour before the acetaminophen administration and two hours after in dose of 135 mg/kg on the rat. As the results of this investigations was determined that glutargin administration against the background of the chronodetermined acetaminophen hepatitis hadn't been characterized by changes of total protein and albumin contents, while the increasing level of carbamide was depending on circadian group of medicament (on 10-33 %) and decreasing level of uric acid was only in medicament of 9.00 am group (on 24 %). Obtained results should be taken into consideration in developing of glutargin chronoportrait.*

**Key words:** liver; protein metabolism; glutargin

### INTRODUCTION

Hepatobiliary system diseases are widely spread pathology that takes a significant place in morbidity and mortality of the population. A wide range of medical products are used for the pharmacological correction of this diseases. It is necessary to mark a group of specific medicines that have influence directly on hepatic – hepatoprotectors [10]. The pharmaceutical market of hepatoprotectors is quite diversified. It represented by medicines of herbal, chemical, synthetic and combined compositions [3, 5]. A special role in the therapy among national drugs taking place the **glutargin** (L-glutamine and L-arginine mix), this medicine based on amino acid. High therapeutic effectiveness of the glutargin had been confirming in practice during the treatment the massive outbreak of viral hepatitis A (Sukhodolsk, Lugansk region in 2003) [5, 10].

Rapid development of chronobiology, chronopathology and chronomedicine makes the requirement for knowledge of the peculiarity in drugs "chronoportraits". Drugs prescription will help us to optimize pharmacotherapy in view of circadian maximum of pharmacological and minimum of it's toxic effects, because it will allows us

to use wellknown medicines with much higher effectiveness, reducing or completely neutralizing it's side effects.

The model of acute acetaminophen hepatitis is often used on preclinical stages during studying the perspective hepatoprotectors because of the liver injury' similar pathogenesis, that is observed in consequence of antibiotic, antifungal, antiepileptic and another medicines' pharmacotherapy with potential hepatotoxicity [2, 5]. A key part of the liver in protein and purine metabolism is well known, and determination of hepatoprotectors influence on protein metabolism (anabolic effect) is a component of overall analysis of drugs' hepatoprotective activity. Exploration the circadian dependence of glutargin influence in protein and purine metabolism under the conditions of acute acetaminophen hepatitis will allow us to consider the obtained information for characterizing drug' "chronoportrait".

Aforementioned confirms an actuality in carrying the chronopharmacological investigations of the glutargin hepatoprotector with the aim of identifying it's chronopharmacological specificity.

### MATERIALS AND METHODS

Circadian dependence of the glutargin influence on protein and purine metabolism have been studying during spring season (in March 2015) by chronodetermined

Table 1

**THE GLUTARGIN INFLUENCE ON CIRCADIAN RHYTHMS OF PROTEIN AND PURINE METABOLISM (n = 96)**

Indices	Group of animals	03.00	09.00	15.00	21.00
Total protein, gr/l	IC	80.22 ± 4.05	75.06 ± 2.05	71.06 ± 4.16	73.60 ± 2.44
	CP	69.97 ± 1.41*	71.06 ± 2.56	74.68 ± 2.82	72.65 ± 3.86
	CP + glutargin	75.51 ± 4.04	74.87 ± 1.55	77.48 ± 1.47	77.10 ± 2.89
Index' amendment when the glutargin was taken with regard to CP		–	–	–	–
Albumin, gr/l	IC	41.85 ± 1.52	37.31 ± 1.18	42.26 ± 0.90 <sup>#</sup>	45.17 ± 3.48 <sup>#</sup>
	CP	41.23 ± 0.90	40.88 ± 1.13	38.88 ± 2.25	40.79 ± 1.55
	CP + glutargin	39.03 ± 0.33	39.63 ± 1.26	42.73 ± 2.22	43.77 ± 3.31
Index' amendment when the glutargin was taken with regard to CP		–	–	–	–
Carbamide, mmol/l	IC	13.61 ± 1.53	12.10 ± 1.03	11.51 ± 1.12	12.43 ± 1.11
	CP	9.75 ± 0.21*	11.43 ± 0.73	9.69 ± 0.24	9.29 ± 0.29*
	CP + glutargin	11.10 ± 0.71	12.60 ± 1.10	11.92 ± 0.62**	12.36 ± 0.48**
Index' amendment when the glutargin was taken with regard to CP		↑14 %	↑10 %	↑23 %	↑33 %
Urea acid, mkmol/l	IC	13.16 ± 1.01	14.24 ± 1.37	12.44 ± 0.83	13.07 ± 0.73
	CP	15.14 ± 1.62	24.07 ± 0.90 <sup>*/&amp;</sup>	11.00 ± 1.90	21.73 ± 2.16 <sup>*/&amp;</sup>
	CP + glutargin	14.06 ± 0.42	18.30 ± 1.94**	12.80 ± 1.43	19.11 ± 0.99
Index' amendment when the glutargin was taken with regard to CP		–	↓24 %	–	–

Note: n – the number of animals in experience; \* – index deviation authentically and significantly differ from index of intact animals ( $p < 0.05$ ); \*\* – index deviation authentically and significantly differ from index of animals group with hepatitis ( $p < 0.05$ ); # – index deviation authentically and significantly differ from minimal index in group of intact animals ( $p < 0.05$ ); & – index deviation authentically and significantly differ from minimal index in group of animals with hepatitis ( $p < 0.05$ ).

acetaminophen liver injury' model. Had been investigated 96 rats (females) by 8 animals from each circadian group of intact control, the model pathology and the glutargin administrated rats. Modelling of acute acetaminophen hepatitis had been reproduced by single acetaminophen administration (1000 mg/kg) on following periods and hours of the day: morning (9.00), afternoon (15.00), evening (21.00) and night (3.00). The glutargin had been administration to rats in medical-preventive regime (an hour before acetaminophen administration and two hours after) in dose of 135 mg/kg [7]. Decapitation of animals with blood sampling for getting blood serum had been realized after acetaminophen administration through 24 hours. Contents of total protein, albumin, carbamide and uric acid had been identifying in blood serum with the help of standard test-sets that were manufactured by "Filisit-diagnostics" and "SpaynLab" [4].

Experiences had been realizing under IR – lamp with the purpose of leveling the influence of optical factor on melatonin synthesis in the evening and night [9]. Obtained results had been processing with the help of Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP program, statistical programs package "Statistica 8.0" and nonparametric Mann-Whitney U-test. By comparing statistical indices was accepted the significance level  $p < 0.05$  [6].

With the help of Cosinor-Analysis 2.4 for Excel 2000/XP program had been calculating the mezor (an average value of studied index during the day) and amplitude (maximal aberration both sides from mezor). During the chronograms analysis had been determined an acrophase (an

hour of the day when it marked the maximal value of studied index) and the batiphase (an hour of the day when it marked the minimal value of studied index) [11].

**RESULTS AND DISCUSSION**

The glutargin injections against the background of the chronodetermined acute acetaminophen hepatitis hadn't been characterized by distinctive changes of total protein contents. It is proved by mezor – rhythm value of this index in groups of the glutargin ( $76.24 \pm 1.10$  gr/l) that was on the one level in intact rats ( $74.98 \pm 2.07$  gr/l) and in animals with control pathology ( $72.09 \pm 1.82$  gr/l). While index's rhythm amplitude was less in 1.4 times in glutargin groups of animals with hepatitis and was less in 1.7 times by comparison with intact rats (Tab. 2). When glutargin was taking an acrophase of the total protein contents was inphased in animals with hepatitis (but not in intact animals) and was observed on 15.00 pm while the batiphase was observed on 9.00 am (synphasicity with another research groups hadn't been registered) (Tab. 1).

An albumin contents (the total protein fraction) almost hadn't been changed in comparison from the rats with hepatitis when the glutargin was taken (Tab. 1), it is confirming by mezor of this index:  $41.29 \pm 1.22$  gr/l in the glutargin group and  $40.44 \pm 0.25$  gr/l in animals with hepatitis. Rhythm amplitude growth of an albumin contents had been observed in animals who were medicated by glutargin in 2.4 times comparatively to rats from control pathology (Tab. 1). An acrophase of this index in glutargin group is inphased those in intact rats and is



Table 2

**THE GLUTARGIN INFLUENCE ON CIRCADIAN INDICES OF PROTEIN AND PURINE METABOLISM  
BY COSINOR-ANALYSIS 2.4 FOR EXCEL 2000/XP PROGRAMME**

Chronoindex	Group of animals	Total protein, gr/l	Albumin, gr/l	Carbami de, mmol/l	Urea acid, mkmol/l
Mesor	IC	74.98 ± 2.07	41.65 ± 1.22	12.41 ± 0.55	13.23 ± 0.62
	CP	72.09 ± 1.82	40.44 ± 0.25	10.04 ± 0.25	17.98 ± 0.84*
	CP + glutargin	76.24 ± 1.10	41.29 ± 1.22	11.99 ± 0.45	16.07 ± 0.84
Amplitude	IC	4.64 ± 1.48	3.94 ± 1.48	1.06 ± 0.34	0.69 ± 0.33
	CP	2.48 ± 1.14	1.18 ± 0.88	1.07 ± 0.30	2.38 ± 0.96
	CP + glutargin	1.49 ± 0.86	2.77 ± 1.49	0.43 ± 0.30	0.75 ± 0.54

Note: \* – index deviation authentically and significantly differ from index of intact animals ( $p < 0.05$ ).

observing on 21.00 pm while the batiphaze is observing on 3.00 am (synphasicity with another research groups hadn't been registered) (Tab. 1).

The glutargin had been stimulating the growth of carbamide contents on 10-33 % according to circadianity of the medicine group (Tab. 1). That's why rhythm mezor of this index in the glutargin groups had been rising from  $10.04 \pm 0.25$  (rats with hepatitis) to  $11.99 \pm 0.45$  mmol/l when drug was taken, in this case amplitude had been reducing in 2.5 times comparatively to animals with hepatitis (Tab. 2). An acrophaze of the carbamide contents in glutargin groups (9.00 am) is inphased to rats with pathology and was observed on 09.00 am, while the batiphaze was observed on 03.00 am (synphasicity with another research groups hadn't been registered) (Tab. 1).

It had been registered an authentic reduction (on 24 %) of urea acid contents in group of medicine on 9.00 am comparatively to animals with control pathology when the glutargin was taken, when it wasn't practically significant changes of this index' value in another circadian groups of medicine (Tab. 1). That's why the rhythm mezor of urea acid contents reduction was not expressive from  $17.98 \pm 0.84$  (control animals) till  $16.07 \pm 0.84$  mkmol/l when the glutargin was taken. The level of urea acid rhythm amplitude contents had been decreasing distinctively (in 3.2 times), regarding to animals with hepatitis, and practically obtained the value of rats from intact control, when the glutargin was taken (Tab. 2). An urea acid acrophaze and the betaphase are inphased to intact and control animals in the glutargin groups and had been registered on 09.00 am and 15.00 pm accordingly (Tab. 1).

Thus, medical-preventive regime of the glutargin administration in the background of the chronodetermined acetaminophen hepatitis had a tendency to leveling up the contents of total protein in groups of medicine on 03.00 am and 09.00 am, to increasing the level of carbamide on 10-33 % according to circadianity of the medicine group and to decreasing the level of urea acid in group of medicine on 09.00 am. In abovementioned conditions the glutargin taken hadn't stimulated the contents changes of an albumin in regard to intact animals and rats with hepatitis.

The glutargin ability to increase the contents of blood carbamide in pathological conditions first of all connected with the medicine's components: arginine and glutamic acid. In particular, arginine neutralizes ammonium and transforms it into non-toxic compound the carbamide, in this way it improves the tendency of detoxifying processes in liver, and glutamine neutralizes ammonium taking part in Krebs cycle [5]. The glutargin ability to increase the carbamide contents during the day is characterized by circadian dependence and is determined by circadian course of the metabolic processes in hepatocytes [11].

The most distinctive reduction of an urea acid contents under the glutargin influence had been observed in medicine group on 09.00 am and probably was determined by circadian aspect of an antioxidant and membrane-stabilizative characteristics of the glutargin [11]. This fact prevents the intracellular components going out into blood serum and saving activity of an urease enzyme (when medicine taking in the morning). This ferment takes part in urea acid metabolism till the final product an allantoin in hepatocytes [1]. All abovementioned results should be considered in the overall development of the glutargin chronoportrait.

### CONCLUSIONS

1. In conditions of the chronodetermined acetaminophen hepatitis glutargin taking hadn't been characterized by changing the contents of total protein and albumin in all circadian groups of medicines.
2. The glutargin taking against the background of the chronodetermined hepatitis had been characterized by increasing level of carbamide contents in all circadian groups of medicine with the most significant and authentic growth of this index in the evening and night (23-33 %).
3. Decreasing level of urea acid (on 24 %) when the glutargin was injected against the background of acetaminophen pathology had been observed only in the morning without changes of the index value during another periods of the day.

## REFERENCES

1. Біохімія: [підруч.] / За заг. ред. проф. А. Л. Загайко, проф. К. В. Александрової. – Х.: Вид-во «Форт», 2014. – 728 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
3. Дроговоз С. М. Фармакологія в допомогу студенту, провизору і врачу: [учеб.-справ.] / С. М. Дроговоз, С. Ю. Штрыголь, Е. Г. Щекина. – Х.: Титул, 2013. – 900 с.
4. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2-х т. / В. С. Камышников. – Мн: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
5. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам группы лекарств для печени. – Симферополь: ИТ «Ариал», 2013. – 384 с.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
7. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Д. С. Рыболовлев // Докл. АН СССР. – 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513-1516.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. докт. мед. наук А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
9. Семененко С. Б. Особливості структури хроноритмів екскреторної функції нирок за умов гіперфункції шишкоподібної залози // Буковинський мед. вісник. – 2014. – Т. 18, № 2 (70). – С. 99-101.
10. Соломенник Е. В. Влияние препарата глутаргин на клинико-биохимические показатели у больных острым вирусным гепатитом А / А. О. Соломенник, Е. В. Юрко, Е. И. Могиленец, К. И. Никитина // Актуальні питання фарм. і мед. науки та практики. – 2010. – № 4. – С. 107-109.
11. Хронофармакологія наглядно (Хронофармакологія в таблицях і рисунках): [справ.-учеб. посібник] / Под ред. С. М. Дроговоз. – Х.: Титул, 2014. – 128 с.

## УДК 616.36:57.034:577.12

**К. О. Калько, С. М. Дроговоз, С. Ю. Штрыголь, А. В. Кононенко, В. А. Уланова, Т. К. Юдкевич**  
**ЦИРКАДІАННІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ГЛУТАРГІНУ НА БІЛКОВИЙ ТА ПУРИНОВИЙ ОБМІНИ В УМОВАХ ХРОНОДЕТЕРМІНОВАНОГО ПАРАЦЕТАМОЛОВОГО ГЕПАТИТУ У ЩУРІВ**

Метою даної роботи було встановлення циркадіанних особливостей впливу глутаргіну на білковий та пуриновий обміни в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту у щурів. Модельну патологію відтворювали введенням парацетамолу (у дозі 1000 мг/кг щура) в такі періоди та години доби: ранковий (09.00), денний (15.00), вечірній (21.00) та нічний (03.00). Глутаргін вводили в лікувально-профілактичному режимі, тобто за 1 год до введення парацетамолу та 2 год після цього в дозі 135 мг/кг щура. В результаті проведених досліджень встановлено, що введення глутаргіну на тлі хронодетермінованого парацетамолового гепатиту не характеризувалося змінами вмісту загального білка та альбуміну, тоді як збільшення вмісту сечовини залежало від циркадіанності групи препарату (на 10-33 %), а зменшення вмісту сечової кислоти спостерігалось лише в групі препарату о 09.00 (на 24 %). Отримані результати слід враховувати при розробці хронопортрету глутаргіну.

**Ключові слова:** печінка; білковий обмін; глутаргін

## УДК 616.36:57.034:577.12

**Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, С. Ю. Штрыголь, А. В. Кононенко, В. А. Уланова, Т. К. Юдкевич**  
**ЦИРКАДІАННІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ГЛУТАРГІНА НА БІЛКОВИЙ ТА ПУРИНОВИЙ ОБМІНИ В УМОВАХ ХРОНОДЕТЕРМІНОВАНОГО ПАРАЦЕТАМОЛОВОГО ГЕПАТИТУ У КРИС**

Целью данной работы является определение циркадианных особенностей влияния глутаргина на белковый и пуриновый обмены в условиях хронодетерминированного парацетамолового гепатита у крыс. Модельную патологию воспроизводили введением парацетамолу (доза 1000 мг/кг для крысы) в следующие периоды и часы суток: утренний (09.00), дневной (15.00), вечерний (21.00) и ночной (03.00). Глутаргин вводили в лечебно-профилактическом режиме, то есть за 1 час до введения парацетамолу и через 2 часа после в дозе 135 мг/кг для крысы. В результате проведенных исследований установлено, что введение глутаргина на фоне хронодетерминированного парацетамолового гепатита не характеризировалось изменениями содержания общего белка и альбумина, тогда как увеличение содержания мочевины зависело от циркадианности группы препарата (на 10-13 %), а уменьшение содержания мочевой кислоты наблюдалось только в группе препарата в 09.00 (на 24 %). Полученные результаты следует учитывать при разработке хронопортрета глутаргина.

**Ключевые слова:** печень; белковый обмен; глутаргин

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 10.06.2016 р.

UDC 612.616+591.463.12:612.66+577.1

N. O. KARPENKO<sup>1</sup>, YE. M. KORENIEVA<sup>1</sup>, E. YE. CHYSTIAKOVA<sup>1</sup>, N. P. SMOLIENKO<sup>1</sup>,  
I. O. BIELKINA<sup>1</sup>, N. YU. SELIUKOVA<sup>1</sup>, S. P. KUSTOVA<sup>1</sup>, M. O. BOIKO<sup>1</sup>,  
YU. B. LARIANOVSKA<sup>2</sup>, V. K. KLOCHKOV<sup>3</sup>, N. S. KAVOK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State Institution "Institute for endocrine pathology problems named after V. Ya. Danilevskiyi NAMS of Ukraine"

<sup>2</sup>National University of Pharmacy

<sup>3</sup>STC "Institute for Scintillation Materials, NAS of Ukraine"

## THE INFLUENCE OF THE RARE-EARTH METALS NANOPARTICLES ON THE RAT'S MALES REPRODUCTIVE FUNCTION IN THE DESCENDING STAGE OF ONTOGENESIS

*The anti-aging effects of the rare-earth metals nanoparticles have been studied on the 18-21-month-old rat males. It was shown that the nanoparticles of Gadolinium Ortovanadate activated by Europium ( $GdVO_4 : Eu^{3+}$ ) in a dose of 0.33 mg/kg during chronic using (70 days) have demonstrated the anti-aging effects on the old male's reproductive function manifested by the increasing the sex hormone level and activating the spermatogenesis.*

**Key words:** nanoparticles of Gadolinium Ortovanadate; reproductive function; spermatogenesis

### INTRODUCTION

The increasing of the duration of human life in the high developed countries is often associated with the birth rate decreasing and with the changes of the population structure. The part of elderly men is increasing most rapidly. The manifestation of most elderly-aged-associating diseases is going after finishing reproductive period which is accompanied by the androgenic deficiency with men [3, 9]. These changes cause the increasing the amount of the old people with multiple pathologies, that, in its turn, causes the problem of prolonging an active life. The importance of the reproductive health can't be determined only by the care of the population strength.

There is natural slow decreasing of the sex hormone Ts (testosterone) level in the declining year's men. According to the data of the Massachusetts Adult Search (MMAS) the Ts level is decreasing approximately 0.8 % a year after 30-35 years to the end of life. The development of the age-associated hypogonadal state is closely connected with disturbances in the central hypothalamic-hypophysis system and in the testicles. The amount of the Leydig testosterone-synthesizing cells decreases in the testicles; the density of the luteinizing hormone receptors and activity of the Ts synthesizing ferments are lowering. The concentration of the sex steroid binding globulin is increasing in blood, the fraction of the biologically active androgen is decreasing and the ratioTs/E<sub>2</sub> is changing, the estrogen activity is heightening [18].

Due to Ts versatile activity in the men's organism the decreasing of the androgen blood level determines not only sexual disturbances but different somatic changes too. It is considered that violation of the sex hormones ratio takes an important part in the age-associated diseases development such as DM (diabetes mellitus) and insulin resistance, determines the activity of the high nervous system, emotion sphere and so on [21]. In fact beginning from 50 years old the glucose blood level is gradually increasing – every 10 years by 0.055 mmol/l. The DM accompanies by the lowering of the total and free testosterone levels and oxidative stress is often developing [12]. There is lack of stimulating insulin action on the Leydig cells Ts production and decreasing those cells reaction to the chorionic gonadotropin introduction under the insulin resistance condition. All those facts quicken the involution of the reproductive function and make worse the quality of elderly life. Under the Ts deficiency the symptoms complex of the adult organism which requires varied therapy is developing. The polypragmasia may lead to the undesirable interaction between medicines, metabolic disturbances and developing of complications.

Nowadays there is lowered Ts concentration with the youngest men 8.0-12.0 nmol/l (subnormal indices). This accelerated involution of the reproductive function may be considered as civilization disease [6], which leads to the premature age androgen deficiency and hypofertility with difficult and often empirical treatment [2].

Taking into consideration mentioned facts the correction of the sex hormones disbalance for the deceleration

tion of the organism involution is an important part and expected positive effect of the anti-aging therapy. Moreover, the increasing of the middle-aged part of population requires for the prophylaxis and intensive control of the non-infectious diseases and determines the perceptivity of the innovational approaches and searches of the new nontoxic substances with positive effects on the age processes which would be able to stimulate reproductive function and fertility, to normalize age metabolism, to influence insulin resistance and to support full value of the  $\beta$ -cells function thus showing antidiabetic effects. The substances with endocrinological effects on the human organism might be the most perspective for the anti-aging therapy.

The substances of vanadium should be marked among ones. This element takes up an exceptional position among essential elements, because both of its forms – anionic and cationic – take part in the biological processes [13]. The element is a catalyst in the redox reactions. Vanadium is an inhibitor or regulator of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATF-ase}$ , ribonuclease and others ferments. It intensifies the tissues oxygen absorption, catalyzes the phospholipids oxidation by liver ferments and influences the blood glucose level. In addition to their hypoglycemic effect, Vanadium compounds have anti-hypertensive anti-cholesterolemic activities, change food taking throw their influence the hypothalamic neuropeptide Y. This metal is an active to the different organism functions. On the base of animals' researches it was proven that vanadium using under the conditions of iodine deficiency or goitrogens activity has a positive effects on the thyroid functions. Vanadium inhibits the fat acids and cholesterol synthesis [11]. In experiments with the animal it has been shown that vanadium deficiency in the organism leads to the increasing of the abortion frequency, to thyroid disorders and decreasing lactation [17]. But in the big doses this metal is very toxic for the human organism [10], especially for the reproductive system [15], it may disturb spermatogenesis an initiate apoptosis of the spermatozoons [16]. The biological role of the vanadium is considered not to be enough studied.

The vanadium insulin-like activity carefully summarized in the reviews [14, 15] is the most interesting. At the same time the high toxicity of the soluble vanadium compound [5, 10] prevents it's using as insulin-like substance, although, its insoluble salts, especially gadolinium ortovanadate, are nontoxic, but have low bioavailability. It is expected that using the gadolinium ortovanadate in the form of nanocrystals would raise the solubility keeping safe its positive biological effects and nontoxicity. Analysing above-cited data we might allow that vanadium compounds have anti-aging effects especially with decreasing their toxicity in the form of nanoparticles (NP). **Purpose:** the studying of the affectivity of the  $\text{GdVO}_4$  nanoparticles using for age changes correction in rat males in the descending stage of ontogenesis as a potential medicines for prevention the age-associated conditions and involution of the reproductive function.

## MATERIALS AND METHODS

The investigation has been carried out on the Wistar rat males from the vivarium of SI "Institute for endocrine pathology named after V. Ya. Danilevskyi NAMS of Ukraine". The animals have been kept in the standard conditions of natural light sources, recommended diet and water regime ad libitum. The experiment has been carried out according to the national ethic principles which correlated with thesis of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

The model for natural aging replaying not only Ts level lowering but also expressive age androgen-dependent processes has been used. The influence of the  $\text{GdVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$  nanoparticles on the reproductive function has been studied on the group of rats (21 males) with fixing age (18 months in the experiment beginning, descending stage of ontogenesis). According to [7] rats after 18 months are related to the pre-elderly period (18-23 months). During experiment the general condition, body weight and glucose blood level have been controlled. The animals have been taken away from the experiment throw the fast decapitation without using narcosis on the 71-st day. Fast decapitation allows avoiding changes of the sex hormone concentration in blood owing to anesthetics action. The indices of the reproductive function have been determined after course (70 days) intaking of the  $\text{GdVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$  nanoparticles (NP  $\text{GdVO}_4$  group). The colloidal water solution of the NP  $\text{GdVO}_4$  activated by Europium ( $\text{GdVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ ) has been obtained at the Institute for scintillation materials NAS of Ukraine. NP  $\text{GdVO}_4$  in dose of 0.33 mg/kg have been given with the feeding avoiding stress influence the long manipulations with sonde. During animals autopsy the visual inspection and determination of the eternal mass of organs have been carried out. The samples of blood preserving at  $-18^\circ\text{C}$  for determining of sex hormone level ( $\text{T}_s$  and  $\text{E}_2$ ) have been taken on the 30-th day (from tail vein) and on the 71-st day (during decapitation).

The condition of the reproductive system has been estimated using spermogram indices of the epididymal sperms during microscoping. The concentrations of the epididymal sperms, motility and pathological forms percentage have been determined [7]. The concentration of the morphologically normal sperms  $\text{C}_x$  has been calculated [8]. In order to study the morphological indices of the histological sections the testicles have been fixed in the 10 % formaldehyde solution of neutral pH, then cut sections have been dehydrated by passing the tissue trough the increasing concentrations of the ethylic alcohol (from 0 to 100 %). After that the tissue has been embedded into the celoidine-paraffin, cut using the microtome and colored with haematoxylin and eosin. On the cut sections of the testicles tissue the morphometric estimating of spermatogenesis indices, the relative quantity of the seminiferous tubules with the spermatogenic epithelium and with the spermatozoa in the metaphase of the second part



Table 1

**ABSOLUTE MASS OF ORGANS OF THE EXPERIMENTAL RATS ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )**

Mass	Group	
	Control (n = 7)	NP GdVO <sub>4</sub> (n = 6)
Testicles, mg	3557.1 ± 174.4	4100.0 ± 194.9*
Seminal vesicles, mg	828.6 ± 40.6	970.0 ± 88.9
Epididymis, mg	1278.6 ± 28.6	1320.0 ± 93.0
Ventral prostate gland, mg	628.6 ± 68.9	710.0 ± 64.0
Thymus gland, mg	235.1 ± 36.1	212.6 ± 31.0
Adrenal glands, mg	39.4 ± 2.3	41.0 ± 3.4
Spleen, mg	1171.4 ± 108.5	1480.0 ± 158.6
Pituitary gland, mg	10.0 ± 1.2	8.8 ± 1.3

Note: \* – Differences between control group (0.05 < P < 0.1).

of ripening (with 12-th stage of meiosis), and the quantity of the normal spermatogonial stem cells in the spermatogenic code have been carried out [7].

The blood glucose level has been estimated with all rats on 30-th, 50-th and 70-th days. The glucose concentration in blood obtained from rat's tale on empty stomach has been measured using glucometer "Exan-G" [7]. The concentrations of sex hormones in the blood serum have been determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method on ELISA Analyzer "StartFax-100" using commercial sets of agents "Testosterone-CHEMA" and "Estradiol-CHEMA" (Russia).

The results obtained from the rats of the similar age, which have been fed with the starch solution without any additional components, have been considered to be as control ones.

The statistical analyze has been carried out using Excel program 2003. The results have been calculated as an arithmetic mean ( $\bar{x}$ ) and their statistical error ( $\pm S_{\bar{x}}$ ) using the Q Dunn criterion for the polynomial equations [15]. The differences between groups have been considered to be a statistical probability according to statistical reliability  $p < 0.05$ .

**RESULTS AND DISCUSSION**

One of the main indices of the animal condition is a body weight control which has been carried out during the experiment with the interval of 10-15 days. On the beginning of the experiment all of animal groups have no differences; the average body weight of the sample was  $361 \pm 2.6$ g. In 2 month from the beginning of the experiment (20-month-old rats) all of rats have the statistically increased body weight by compared with 18 month-old rats. The difference was 7.1-8.7 %. This fact is evidence of the absence of the toxicity of the studying substances. Taking into the account the using of the standard diet it may be confirmed that an increasing body weight is due to natural aging processes [20]. At the same time it must be marked the difference in the changing rate of this index. The rats of control group have a statistically reliable exceeded body weight than initial ones beginning from the 45-th day of the experiment (20-21-month-old). In

Table 2

**SPERMOGRAMM OF THE INVESTIGATED RATS AFTER CHRONIC APPLICATION OF THE NP GdVO<sub>4</sub> ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )**

Indices	Control (solvent) (n = 7)	NP GdVO <sub>4</sub> (n = 5)
Concentration, mil./ml	42.9 ± 4.4	56.2 ± 5.2*
Motility, %	73.1 ± 4.5	78.8 ± 4.9
Pathological form, %	14.4 ± 1.4	16.0 ± 2.7
Non-motile, %	8.1 ± 1.2	10.6 ± 1.0
C <sub>N</sub> **, mil./ml	33.3 ± 3.8	41.2 ± 3.8
Duration of motility, min	218.7 ± 14.2	258.4 ± 20.9

Note: \* – Statistical differences between Control group (P < 0.05);

\*\* – The concentration of the morphologically normal and motile spermatozoons.

the NP GdVO<sub>4</sub> group the body weight has been growing slowly and only on the 60-th day of the experiment has exceeded the initial and has become such as the control group. Thus, the age-associated body weight increasing in the NP GdVO<sub>4</sub> group of animals was slower that may be considered to be positive effect. During the experiment the glucose blood concentration has been determined. There is no difference between groups of animals as to the initial glucose level; the concentration of the glucose in the whole sample was  $5.1 \pm 0.2$  nmol/l. The glucose level in the control group animals has statistically reliable increased up to  $6.0 \pm 0.2$  nmol/l (135.2 % from initials meanings) when the rats were 19 months. On the 50-th day of the experiment the glucose level was exceeded the initials meanings by the 33.5 % (P < 0.05) and on the 70-th day – by the 18.5 % (P < 0.05). After NP GdVO<sub>4</sub> using on the 50-th and 70-th days of the experiment the blood glucose concentration was at the initial level. On the 30-th day this index was smaller than in the control group but only on the 70-th day has reached the age level. The differences with the initial level on the 30-th, 50-th and 70-th days of the experiment were 11.5 (P < 0.05), 8.3 (P < 0.05) and 16.6 % (P < 0.05) accordingly. Thus, the inhibition of the age-dependent hyperglycaemia is observed in the NP GdVO<sub>4</sub> group. It may be considered that long-term keeping the normal body weight and normoglycaemia are connecting. The obtained data shows the necessity of the additional researches of the glucose decreasing properties of these substances on the proper models.

During visual examination the differences of the state of the internal organs between control and NP GdVO<sub>4</sub> group have been not determined. There are no differences between masses of the immune organs (thymus gland and spleen). The masses of the adrenal glands have no differences, too (Tab. 1).

The chronic using of the NP has no influence on the reproductive organs.

Only increasing the testicles masses has been observed in the NP GdVO<sub>4</sub> group (0.05 < P < 0.1).

The obtained results have shown that investigated substances have no toxic influence on both reproductive and immune systems of old rats.

Table 3

## THE QUANTITATIVE CHARACTERISTIC OF THE RAT SPERMATOGENESIS, ME (LQ; UQ)

Indices	Control	GdVO <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> (according to Mann-Witney criterion)	P <sub>2</sub> (according to Student's criterion t)
Normal spermatogonial stem cells, M ± m	61.04 ± 0.51	62.25 ± 0.10*	–	0.0014
Index of spermatogenesis, point, Me (LQ; UQ)	3.31 (3.25; 3.37)	3.35 (3.32; 3.37)*	0.0035	–
Tubules with 12-th stage of meiosis, %, Me (LQ; UQ)	4.0 (4.0; 5.0)	7.0 (6.0; 7.0)*	0.0023	–
Tubules with stratified epithelium, % Me (LQ; UQ)	0.0 (0.0; 1.0)	0.0 (0.0; 0.0)	0.8357	–

Note: \* – Statistically significant differences between experimental and control groups on the significance level  $p < 0.05$ .

According to the Tab. 2, the increasing of the spermatozoon's concentration in the epididymal sperms suspension has been marked under the NP influence.

According to the prior investigations the spermatozoon's concentration with 10-month-old rat males is  $35.3 \pm 5.6$  mil/ml, the part of motile sperms is  $69.0 \pm 5.4$  %, abnormal forms –  $17.5 \pm 4.7$  % and CN –  $29.0 \pm 5.0$  mil/ml. Comparing these indices with the data in Tab. 2 it may be seen that spermogram's indices of control rat males group (20-20.5-month-old) are the similar.

The morphometrical characteristics of the spermogram of the rats which took the NP GdVO<sub>4</sub> confirmed the visual signs of the spermatogenic epithelium improvements (Tab. 3). The presented data show the evident increasing of the spermatogonial stem cells, the spermatozoon's meiosis activity and the index of spermatogenesis with the experimental males. The combination of these signs may be considered to be real stimulation of the spermatogenesis.

The main man's sex hormone is known to be Ts; it determines sex belonging, regulates the sex development and intensity and character of the sexual behavior with the adults; it regulates the spermatogenesis and metabolism. The level of its derivate E<sub>2</sub> synthesized in the target tissue cells by aromatization of the Ts is of great importance because the ratio between these steroids demonstrates the androgen-estrogen correlation and relative androgenization or estrogenization of the organism. Ts synthesizes in the gonads by Leidig cells and gets the blood straight away. Its synthesis is regulated by gonadotropic hormones and is characterized by specific daily rhythm. The blood samples were obtained at one and the same time in 20-th and 60-th day of the nanoparticle feeding. The measuring concentration of steroid showed no significant differences between experimental and control groups on the 20-th day of the experiment (Tab. 4).

The 72 % increasing of the Ts concentration was determined with the males in 60 days of the NP GdVO<sub>4</sub> feeding. This index was statistically higher than with the same males or with the control animals on the 20-th day of the experiment. The concentration of E<sub>2</sub> in all groups of the experimental animals has no significant differences. Such changes caused increasing the Ts/E<sub>2</sub> ratio, they we-

Table 4

THE CONCENTRATION OF THE SEX HORMONES OF THE RAT ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

Index	Day	Group	
		Control (n = 6)	NP GdVO <sub>4</sub> (n = 6)
Testosterone, nmol/l	20	10.3 ± 1.1	11.6 ± 2.5
	60	12.8 ± 1.8	20.0 ± 4.1*/**
Estradiol, pmol/l	20	127.0 ± 17.7	161.0 ± 19.5
	60	136.9 ± 23.5	162.2 ± 42.0
Testosterone/ Estradiol	20	66.1 ± 8.8	57.2 ± 9.8
	60	94.0 ± 12.9	154.6 ± 37.0

Note: \* – Statistically significant differences from control group, 20 days ( $P < 0.05$  due to Dunn criterion); \*\* – Statistically significant differences from group NP GdVO<sub>4</sub> : Eu<sup>3+</sup> 20 days ( $P < 0.05$  due to Dunn criterion).

ren't statistically reliable though. It means, the long lasting application of the NP GdVO<sub>4</sub> : Eu<sup>3+</sup> stimulate Ts synthesis which is demonstrated by the spermatogenesis activating.

Thus, under the condition of the alimental chronic application in dose of 0.33 mg/kg stimulate the spermatogenesis. It has been proved by Ts level increasing, activating the testicles spermatogenic epithelium and by increasing the epididymal spermatozoons concentration.

The estimating of the obtained results confirms the anti-aging biological activity of the NP GdVO<sub>4</sub>. Due to the anti-aging effect the NP GdVO<sub>4</sub> have hindered the age-depending hyperglycemia development, inhibited the age-depending increasing of body weight, have positive influence on the spermatogenesis intensity and Ts synthesis with the old rat males.

Indeed, it is very difficult to discuss the obtained results of the NP GdVO<sub>4</sub> : Eu<sup>3+</sup> investigations owing to the unique properties of the nanoparticles and used term

of the researching (70 days). The comparison between the well-known biological properties of vanadium and its salts might be incorrect. First of all, the researchers mark the high toxicity of the vanadium and its salts [5, 10]. In our case from 7 animals of the NP GdVO<sub>4</sub> experimental group only one male died on 67-th day without signs of the toxic injury. During autopsy the increasing of the adrenal glands and other internal organs masses were not obtained. The organs had a usual surface look. However, it is necessary to carry out subsequent experiments with the nanoparticles chronic application by younger animals that will allow to study NP chronic and gonads toxicity.

The vanadium has demonstrated a positive influence on the glucose metabolism during NP GdVO<sub>4</sub> application [19]. However, to make any conclusions as to any available kind of actions – insulin like or of the prolonging of the pancreas  $\beta$ -cells function is impossible. The answer to this question requires the subsequent specific investigations using the appropriate models.

The significant increasing of the spermatozoons production accompanied by the testicles mass growing under the influence of the NP GdVO<sub>4</sub> has been determined. It allows to suppose that NP GdVO<sub>4</sub> stimulating effect on the reproductive function will remain after stopping nanoparticles application. The data of spermogram have been proved by the light microscoping of the testicles tissues. The evident increasing of the spermatogonial quantity in the tubules, spermatozoons activity in the meiosis and index of the spermatogenesis has been detected after the NP GdVO<sub>4</sub> application. As for the possible mechanism of such action one may think that it is the consequence of the Ts production more than 30 % that has lead to the above-cited effects. The increasing of the androgenisation may also lead to other determined positive effects.

### CONCLUSIONS

1. The nanoparticles of the GdVO<sub>4</sub> in dose of 0.33 mg/kg has demonstrated the significant and long-lasting effects as for glucose metabolism. The inhibition of the age-depending growing body weigh (up to 45-th day) and absence of the increasing glucose blood level (up to 50-th day) have been detected.
2. The positive effect of the nanoparticles of the gadolinium ortovanadate on the reproductive function of old animals by the increasing of the Ts concentration and spermatogenesis activating has been detected.

The experimental results obtained on the model of the aged organism involution which has summarized inhibition of the all organs and functions have been described. The reproductive system functions of full value in the young age when its different disturbances have another character and may lead to the fertility lost. This fact defines the perceptivity of the further investigations on the specific models of the hypo fertility in the young age which may appear due to different negative factors.

### REFERENCES

1. Безруков В. П. Влияние старения населения на формирование потребностей в финансировании здравоохранения // Матер. консулт. междунар. семинара. – М.: МЗМП РФ, 1995. – С. 149.
2. Бондаренко В. А. Функция печени и андрогенный статус у мужчин с идиопатическими патоспермиями // В. А. Бондаренко, А. С. Минухин, Е. И. Скорняков // Пробл. эндокринол. патол. – 2012. – № 2. – С. 15-19.
3. Верткин А. Л. Возрастной андрогенный дефицит и эректильная дисфункция / А. Л. Верткин, Д. Ю. Пушкар. – М.: Изд. группа «ГЭОТАР-Медиа», 2009 – 176 с.
4. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
5. Голубев М. А. Сравнительная характеристика ванадий-содержащих соединений, обладающих инсулиноподобным действием / М. А. Голубев, В. К. Городецкий, А. П. Анискина // Вопр. мед. химии. – 2000. – № 2. – С. 78-83.
6. Дедов И. И. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин [Текст] / И. И. Дедов, С. Ю. Калинин. – М.: Практ. медицина, 2006. – 240 с.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] // За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
8. Карпенко Н. О. Інтегральна оцінка репродуктивної функції самців лабораторних тварин / [Н. О. Карпенко, В. В. Талько, С. Т. Омелчук та ін.] // Укр. біофармац. журн. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 64-68.
9. Куликовский В. Ф. Частичный андрогенодефицит, остеопения и ранние нарушения микции у стареющих мужчин, связь явлений / В. Ф. Куликовский, Н. В. Олейник // Совр. наукоемкие технол. – 2009. – № 6. – С. 48-49.
10. Пат. 2341528 RU, МПК С 07 F 9/00. Оксованадиевый комплекс с глицином, проявляющий гипогликемическую активность [Электронный ресурс] / Е. Н. Вергейчик, О. В. Лапочкин, Л. Б. Губанова (RU); заявник та патентовласник ГОУ ВПО Пятигорская государственная фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (RU). – № 2007116481/04. – Заявл.: 02.05.07. Оpubл.: 20.12.08. – Режим доступа: [www.fips.ru](http://www.fips.ru)
11. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.m-kat.ru/ebook.php?file=skalny.djvu&page=26>
12. American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for Clinical Practice for the Management of Diabetes Mellitus: AACE Diabetes Mellitus Clinical Practice Guidelines Task Force // Endocrine Practice. – 2007. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. 3-66.

13. Baran E. Oxovanadium (IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems // J. Inorg. Biochem. – Vol. 80, Issues 1-2. – P. 1-10.
14. Cam M. C. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent? / M. C. Cam, R. W. Brownsey, J. H. McNeill // Canad. J. Physiol. Pharmacol. – 2000. – Vol. 78, № 10. – P. 829-847.
15. Chandra A. K. Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities / A. K. Chandra, R. Ghosh, A. Chatterjee, M. Sarkar // J. Inorg. Biochem. – 2007. – Vol. 101, № 6. – P. 944-956.
16. Chandra A. K. Protection against vanadium-induced testicular toxicity by testosterone propionate in rats [Text] / A. K. Chandra, R. Ghosh, A. Chatterjee, M. Sarkar // Toxicol. Mech. Methods. – 2010. – Vol. 20, № 6. – P. 306-315.
17. Domingo J. L. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity // Reprod. Toxicol. – 1996. – Vol. 10, № 3. – P. 175-182.
18. Holland J. Testosterone levels and cognition in elderly men: [a review] // Maturitas. – 2011. – Vol. 69, № 4. – P. 322-337.
19. Marzban L. Insulin-Like Actions of Vanadium: Potential as a Therapeutic Agent / L. Marzban, J. H. McNeill // J. Trace Elements in Experim. Med. – 2003. – Vol. 16. – P. 253-267.
20. Thomas M. A. Effects of aging on food intake and body composition in rats / M. A. Thomas, H. B. Rice, D. Weinstock, R. L. Corwin // Physiol. Behav. – 2002. – Vol. 76, № 4-5. – P. 487-500.
21. Yeap B. B. Hormones and health outcomes in aging men // Exp. Gerontol. – 2013. – Vol. 11, № 2. – P. 251-270.

**УДК 612.616+591.463.12:612.66+577.1**

**Н. О. Карпенко, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, І. О. Белкіна, Н. Ю. Селюкова, С. П. Кустова, М. О. Бойко, Ю. Б. Ларьяновська, В. К. Клочков, Н. С. Кавок**

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК РІДКОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ САМЦІВ ЩУРІВ НА НИЗХІДНІЙ СТАДІЇ ОНТОГЕНЕЗУ**

На самцях щурів віком 18-21 міс. досліджені антивікові ефекти наночастинок рідкоземельних металів. Показано, що наночастинки гадолінію ортованадату активованого європієм ( $GdVO_4 : Eu^{3+}$ ) у дозі 0,33 мг/кг маси тіла при хронічному застосуванні (70 діб) чинять антивікову дію щодо репродуктивної функції старих тварин, у яких зросла концентрація чоловічого статевого гормону та активувався сперматогенез.

**Ключові слова:** наночастинки гадолінію ортованадату; репродуктивна функція; сперматогенез

**УДК 612.616+591.463.12:612.66+577.1**

**Н. А. Карпенко, Е. М. Коренева, Е. Е. Чистякова, Н. П. Смоленко, И. О. Белкина, Н. Ю. Селюкова, С. П. Кустова, М. О. Бойко, Ю. Б. Ларьяновская, В. К. Клочков, Н. С. Кавок**

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ САМЦОВ КРЫС НА НИСХОДЯЩЕЙ СТАДИИ ОНТОГЕНЕЗА**

На самцах крыс возрастом 18-21 мес. исследованы антивозрастные эффекты наночастиц редкоземельных металлов. Показано, что наночастицы гадолиния ортованадата активированного европием ( $GdVO_4 : Eu^{3+}$ ) в дозе 0,33 мг/кг массы тела при хроническом применении (70 суток) замедляли возрастной рост массы тела и развитие гипергликемии (до 50-х суток) в сравнении с исходным уровнем. Установлено антивозрастное действие вещества относительно репродуктивной функции старых животных, у которых возросла концентрация мужского полового гормона, активировался сперматогенез.

**Ключевые слова:** наночастицы гадолиния ортованадата; репродуктивная функция; сперматогенез

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Алчевських, 10.

Тел. 0505826127. E-mail: reproduk@ukr.net.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології

ім. В. Я. Данилевського НАМН України»

Надійшла до редакції 30.05.2016 р.



УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, Мухамед Ахмед Мусмари

Национальный фармацевтический университет

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ JNK КИНАЗ

*Поиск новых ингибиторов JNK киназ является актуальной проблемой современной фармакологии. Ранее показано, что некоторые ингибиторы киназ JNK проявляют антиоксидантную активность. Целью настоящего исследования было изучение антиоксидантной активности группы потенциальных ингибиторов JNK. В работе определяли содержание ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгатов, а состояние ферментативного звена антиоксидантной защиты определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Вещества X0001, G0002, G0003 снижали содержание ТБК-РП, ДК и активность СОД. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а X0001 – в обеих концентрациях. Наибольшую активность показало вещество X0001.*

**Ключевые слова:** печень; JNK; супероксиддисмутаза; каталаза; диеновые конъюгаты; ТБК-реактивные продукты

### ВВЕДЕНИЕ

c-jun N-концевые киназы (JNK) – подкласс митоген активируемых протеинкиназ (МАРК), которые участвуют в передаче сигналов от клеточной мембраны к ядру и аппарату генной транскрипции, играют ключевую роль в развитии многих заболеваний человека, в частности, различных видов опухолей, сердечно-сосудистых расстройств, диабета, нейродегенеративных заболеваний, нарушений иммунитета [9, 12]. В настоящее время JNK является важной терапевтической мишенью, а поиск новых ингибиторов JNK – актуальной проблемой фармакологии.

Ранее мы исследовали активность ряда потенциальных ингибиторов JNK. Было показано, что целый ряд соединений ингибирует активность JNK киназ, которую стимулировали под действием ацетинофена.

Известно, что в активацию JNK вовлечены различные факторы и сигнальные пути. Взаимодействие факторов роста и некоторых цитокинов приводит к активации МАР-киназных сигнальных путей, активирующие JNK [8]. Активация JNK также происходит под влиянием ряда физических факторов, которые генерируют образование активных форм кислорода и развитие оксидативного стресса в клетке [10].

Имеются данные о том, что некоторые ингибиторы JNK киназ проявляют антиоксидантную актив-

ность. Показано, что JNK в гладкомышечных клетках ингибируется в присутствии антиоксидантов [10]. Аналог куркумина (2E,6E)-2,6-бис(2-(трифлуорометил)бензилиден) циклогексан, антиоксидант, который подавляет развитие диабетической кардиомиопатии, тормозит образование фосфорилированной формы JNK в кардиомиоцитах [15]. Применение антиоксидантов приводит к ингибированию JNK в миоцитах крыс и восстанавливает чувствительность клеток к инсулину [14]. В то же время данные об антиоксидантной активности исследуемых потенциальных ингибиторов JNK отсутствуют.

Поэтому целью настоящей работы было изучение антиоксидантной активности соединений – потенциальных ингибиторов JNK киназ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на белых крысах массой 180-200 г, которые содержались на стандартном рационе вивария Национального фармацевтического университета. При выполнении экспериментов придерживались «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001), гармонизированных с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Животных декапитировали под хлоразоло-уретановым наркозом. Печень перфузировали *in situ* физиологическим раствором. Печень измельчали на холоде и готовили 10 %-ный гомогенат на 50 мМ трис-HCl буфере, содержащем 50 мМ NaCl.



Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ  
НА ОБРАЗОВАНИЕ ТБК-РЕАКТИВНЫХ  
ПРОДУКТОВ В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ КРЫС  
(нмоль/мг БЕЛКА,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		0,567 $\pm$ 0,013
X0001	50 мкМ	0,453 $\pm$ 0,021*
	100 мкМ	0,484 $\pm$ 0,019*
G0002	50 мкМ	0,529 $\pm$ 0,018
	100 мкМ	0,432 $\pm$ 0,024*
G0003	50 мкМ	0,499 $\pm$ 0,028
	100 мкМ	0,467 $\pm$ 0,024*
G0004	50 мкМ	0,566 $\pm$ 0,019
	100 мкМ	0,535 $\pm$ 0,022
G0005	50 мкМ	0,544 $\pm$ 0,021
	100 мкМ	0,552 $\pm$ 0,016
G0006	50 мкМ	0,550 $\pm$ 0,018
	100 мкМ	0,547 $\pm$ 0,023
G0007	50 мкМ	0,569 $\pm$ 0,018
	100 мкМ	0,565 $\pm$ 0,014
G0008	50 мкМ	0,497 $\pm$ 0,028
	100 мкМ	0,570 $\pm$ 0,013
Гарцинол	50 мкМ	0,467 $\pm$ 0,021*
	100 мкМ	0,430 $\pm$ 0,019*

Примечание: \* – отклонение достоверно относительно интакта ( $p \leq 0,05$ ).

Исследуемые ингибиторы (X0001, G0002, G0003, G0004, G0005, G0006, G0007) вносили в пробы в концентрации 50 и 100 мкМ. В качестве препарата сравнения был использован гарцинол (камбоджинол) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 25 мкМ [7]. Суспензии исследуемых веществ готовили с добавлением твина-80. Суспензии контрольных клеток содержала твин-80 соответствующей концентрации.

Для определения содержания ТБК-реактивных продуктов к гомогенату печени добавляли 10 % раствор трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при скорости 3000 об/мин. К супернатанту добавляли 0,75 % раствора ТБК. Пробы инкубировали на протяжении 15 минут на кипящей водяной бане, охлаждали. Оптическую плотность измеряли при длине волны 532 нм [1].

Уровень кетодиенов определяли по методу, описанному в работе [2]. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли по В. И. Чумакову, активность фермента выражали в условных ед./г белка [6], активность каталазы (КФ 1.11.1.6) – по методу М. А. Королюка и соавт. [2]. Содержание белка в гомогенате печени определяли по методу Лоури [5].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA (StatSoft Inc., США, версия 6.0). Значимость межгрупповых отличий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ НА УРОВЕНЬ  
ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ В ГОМОГЕНАТЕ  
ПЕЧЕНИ КРЫС (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ,  
E232/220,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		0,340 $\pm$ 0,013
X0001	50 мкМ	0,253 $\pm$ 0,021*
	100 мкМ	0,244 $\pm$ 0,019*
G0002	50 мкМ	0,402 $\pm$ 0,024
	100 мкМ	0,301 $\pm$ 0,018*
G0003	50 мкМ	0,319 $\pm$ 0,012
	100 мкМ	0,252 $\pm$ 0,014*
G0004	50 мкМ	0,355 $\pm$ 0,018
	100 мкМ	0,372 $\pm$ 0,024
G0005	50 мкМ	0,309 $\pm$ 0,028
	100 мкМ	0,332 $\pm$ 0,014
G0006	50 мкМ	0,319 $\pm$ 0,018
	100 мкМ	0,299 $\pm$ 0,027
G0007	50 мкМ	0,319 $\pm$ 0,017
	100 мкМ	0,345 $\pm$ 0,014
G0008	50 мкМ	0,351 $\pm$ 0,012
	100 мкМ	0,333 $\pm$ 0,013
Гарцинол	50 мкМ	0,251 $\pm$ 0,015*
	100 мкМ	0,233 $\pm$ 0,017*

Примечание: \* – отклонение достоверно относительно интакта ( $p \leq 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе уровень развития оксидативного стресса, а также антиоксидантные свойства исследуемых соединений оценивали по содержанию первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), а также вторичных – соединений, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [3]. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2.

Было показано, что при внесении в среду инкубации веществ X0001, G0002, G0003 наблюдалось снижение уровня ТБК-реактивных продуктов (табл. 1). Внесение вещества X0001 в концентрации 50 мкМ в среду инкубации гомогената снижало уровень ТБК-РП на 21 %, а в концентрации 100 мкМ – на 18 %. Соединения G0002 и G0003 оказывали действие только в концентрации 100 мкМ и снижали уровень ТБК-РП на 24 % и 18 %, соответственно. Внесение вещества X0001 в концентрации 50 мкМ в среду инкубации гомогената снижало уровень ДК на 26 %, а в концентрации 100 мкМ – на 29 %. Соединения G0002 и G0003 оказывали действие только в концентрации 100 мкМ и снижали уровень ТБК-РП на 12 % и 26 %, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что данные вещества проявляют антиоксидантную активность. При этом наибольшую активность проявило вещество X0001, тогда как соединения G0002 и G0003 оказывали эффект только в концентрации 100 мкМ.

Таблица 3

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ  
НА АКТИВНОСТЬ СОД В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ  
КРЫС (ед./мг БЕЛКА,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		100,12 ± 1,5
X0001	50 мкМ	81,57 ± 2,9*
	100 мкМ	78,69 ± 1,6*
G0002	50 мкМ	1031,12 ± 1,1
	100 мкМ	83,41 ± 2,4*
G0003	50 мкМ	99,54 ± 1,8
	100 мкМ	79,01 ± 2,5*
G0004	50 мкМ	101,41 ± 1,9
	100 мкМ	109,03 ± 1,4
G0005	50 мкМ	100,03 ± 2,1
	100 мкМ	97,57 ± 2,3
G0006	50 мкМ	98,71 ± 2,2
	100 мкМ	107,24 ± 1,2
G0007	50 мкМ	111,03 ± 4,8
	100 мкМ	98,93 ± 2,6
G0008	50 мкМ	107,17 ± 1,5
	100 мкМ	111,57 ± 2,9
Гарцинол	50 мкМ	89,14 ± 1,2*
	100 мкМ	83,27 ± 1,8*

Примечание: \* – отклонение достоверно относительно интакта ( $p \leq 0,05$ ).

Протекание свободнорадикальных процессов в организме уравнивается активностью эндогенной антиоксидантной системы. Антиоксидантная система защищает клетки, органы и ткани от избытка АФК, удаляет или переводит их в менее реакционные соединения, поддерживая таким образом баланс между продукцией АФК и их утилизацией. В настоящей работе уровень ферментативного звена антиоксидантной защиты определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Нами было показано, что внесение веществ X0001, G0002, G0003 в среду инкубации гомогената печени влияет на активность СОД (табл. 3). Так, соединение X0001 в концентрации 50 мкМ снижало активность фермента на 21 %, а в концентрации 100 мкМ – на 18 % (табл. 3). Соединения G0002 и G0003 также снижали активность фермента на 23 % и 27 %, соответственно.

Наблюдаемое снижение активности СОД при внесении в среду инкубации гомогената исследуемых соединений может быть обусловлено тем, что данные вещества проявляют антиоксидантные свойства, связывая АФК, в т. ч. супероксидный радикал, который выступает по отношению к СОД активирующим фактором [8]. Следует отметить, что исследуемые вещества не влияют на активность каталазы в пробах (табл. 4). Падение активности ферментов антиоксидантной защиты закономерно коррелировало со сни-

Таблица 4

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ  
НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ГОМОГЕНАТЕ  
ПЕЧЕНИ КРЫС (мккат НА 1 мг БЕЛКА,  
 $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		7,11 ± 0,72
X001	50 мкМ	8,05 ± 0,97
	100 мкМ	6,35 ± 0,76
G0002	50 мкМ	6,80 ± 0,44
	100 мкМ	7,47 ± 0,51
G0003	50 мкМ	7,94 ± 0,52
	100 мкМ	6,95 ± 0,74
G0004	50 мкМ	7,24 ± 0,51
	100 мкМ	6,77 ± 0,69
G0005	50 мкМ	7,31 ± 0,62
	100 мкМ	6,56 ± 0,72
G0006	50 мкМ	8,95 ± 0,83
	100 мкМ	6,84 ± 0,76
G0007	50 мкМ	6,80 ± 0,63
	100 мкМ	7,27 ± 0,32
G0008	50 мкМ	7,57 ± 0,52
	100 мкМ	7,05 ± 0,77
Гарцинол	50 мкМ	6,74 ± 0,49
	100 мкМ	7,01 ± 0,55

жением процессов ПОЛ, о чем свидетельствовало снижение уровня ТБК-РП и ДК (табл. 1, 2).

### ВЫВОДЫ

1. Вещества X0001, G0002, G0003 снижали содержание ТБК-РП и ДК в пробах. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а X0001 – в обеих концентрациях.
2. Вещества X0001, G0002, G0003 снижали активность СОД в гомогенате печени. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а X0001 – в обеих концентрациях.
3. Наибольшую активность показало вещество X0001.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: [справ.]. – М.: Колос, 2004. – 520 с.
2. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, А. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. Литовский И. А. Атеросклероз и гипертоническая болезнь. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения / И. А. Литовский, А. В. Гордиенко. – С. Пб.: СпецЛит, 2013. – 308 с.

4. Макаревич О. П. Определение активности супероксиддисмутаза / О. П. Макаревич, П. П. Голиков // Лаб. дело. – 1983. – № 6. – С. 24-28.
5. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989.
6. Чумаков В. И. Количественный метод определения активности Zn, Cu-зависимой СОД в биологическом материале / В. И. Чумаков, Л. Ф. Осинская // Вопросы мед. химии. – 1977. – № 5. – С. 712-718.
7. Ahmad A. Anticancer action of garcinol *in vitro* and *in vivo* is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling / [A. Ahmad, S. H. Sarkar, A. Aboukameel et al.] // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33, № 12. – P. 2450-2456.
8. Futosi K. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways / K. Futosi, S. Fodor, A. Mócsai // Int. Immunopharmacol. – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 638-650.
9. Gehringer M. c-Jun N-terminal kinase inhibitors: a patent review (2010-2014) / M. Gehringer, F. Muth, P. Koch, S. A. Laufer // Expert Opin. Ther. Pat. – 2015. – Vol. 25, № 8. – P. 849-872.
10. Hotamisligil G. S. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes / G. S. Hotamisligil // Diabetes. – 2005. – Vol. 54 (suppl 2). – P. S73-S78.
11. Kyaw M. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. / [M. Kyaw, M. Yoshizumi, K. Tsuchiya et al.] // Hypertens. Res. – 2001. – Vol. 24, № 3. – P. 251-261.
12. Pal M. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance / M. Pal, M. A. Febbraio, G. I. Lancaster // J. Physiol. – 2016. – Vol. 594, № 2. – P. 267-279.
13. Samokhvalov V. Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells / [V. Samokhvalov, P. J. Bilan, J. D. Schertze et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 296, № 1. – E37-E46.
14. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Michara // Analytical Biochem. – 1978. – Vol. 86. – P. 271-278.
15. Wang Y. Inhibition of JNK by novel curcumin analog C66 prevents diabetic cardiomyopathy with a preservation of cardiac metallothionein expression / [Y. Wang, S. Zhou, W. Sun et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2014. – Vol. 306, № 11. – E1239-E1247.

#### УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, О. А. Красильнікова, Мухамед Ахмед Мусмари

#### ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK КІНАЗ

Пошук нових інгібіторів JNK киназ є актуальною проблемою сучасної фармакології. Раніше показано, що деякі інгібітори киназ JNK виявляють антиоксидантну активність. Метою цього дослідження було вивчення антиоксидантної активності групи потенційних інгібіторів JNK. У роботі визначали вміст ТБК-реактивних продуктів і дієнових кон'югатів (ДК), а стан ферментативної ланки антиоксидантного захисту визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) і каталази. Речовини X0001, G0002, G0003 знижували вміст ТБК-РП, ДК і активність СОД. При цьому речовини G0002 і G0003 проявляли активність тільки в концентрації 100 мкМ, а X0001 – в обох концентраціях. Найбільшу активність показала речовина X0001.

**Ключові слова:** печінка; JNK; супероксиддисмутаза; каталаза; дієнові кон'югати; ТБК-реактивні продукти

#### UDC 577.126:57.042

A. L. Zagayko, O. A. Krasil'nikova, Mohamed Ahmed Musmari

#### STUDY ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEW POTENTIAL INHIBITORS OF JNK KINASES

The search for new inhibitors of JNK kinases is an actual problem of modern pharmacology. Previously it was demonstrated that a few of JNK kinases inhibitors exhibit antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of a group of potential inhibitors of JNK. In this paper we determined the TBARS and diene conjugates (DC) content, and the state of the enzymatic antioxidant defense level was determined by the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase. Substances X0001, G0002, G0003 reduced TBARS and DC content and SOD activity. G0002 and G0003 were effective only at 100 μM, and X0001 at both concentrations. X0001 was the most active substance.

**Key words:** liver; JNK; superoxide dismutase; catalase; diene conjugates; TBARS

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 24.06.2016 р.

**РЕЦЕНЗІЯ**  
**на підручник «Медична мікробіологія, вірусологія**  
**та імунологія» для студентів вищих медичних закладів**  
**IV рівня акредитації за редакцією академіка НАН,**  
**НАМН України В. П. Широбокова /**  
**Вінниця: Нова книга, 2011. – 952 с.: іл.**

Світ переживає період бурхливого розвитку природничих наук, у тому числі мікробіології. Сьогодні без знання основ молекулярної біології, генетики, генетичної інженерії, біотехнологій, мікробіології неможливо розраховувати на підготовку грамотного лікаря. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія особливо міцно пов'язані з медичними дисциплінами, що забезпечило досягнення в інфекційній патології в другій половині двадцятого та на початку двадцять першого століття. Новий, більш високий науково-медичний рівень мікробіології, вірусології та імунології поряд з традиційними методами боротьби з заразними хворобами одночасно дозволяє успішно вирішувати актуальні проблеми серцево-судинних хвороб, злоякісних новоутворень, трансплантації тканин, органів і т. п. Слід зазначити, що на базі мікробіології, вірусології та імунології сформувались екологічна мікробіологія, генетична інженерія, біотехнологія, які інтенсивно впливають на розвиток біології та медицини. Без перебільшення можна констатувати важливу роль мікробіології в діагностиці, лікуванні, профілактиці хвороб, тому існує необхідність підвищення рівня вивчення цієї дисципліни на всіх факультетах медичних, фармацевтичних вищих навчальних закладів України.

Майбутнім лікарям, провізорам потрібно мати глибокі знання біотехнології, використання біотехнологічних медичних препаратів. Однією зі складних інформаційнонасичених дисциплін сьогодення є медична мікробіологія. Знання з медичної мікробіології, вірусології, імунології є важливою складовою формування професійного мислення лікаря, провізора. Мікробіологія служить базовим предметом для клінічних та медико-профілактичних дисциплін. Фахівець у галузі медицини має володіти значним запасом знань, творчо застосовувати їх у повсякденній діяльності. Надії та сподівання педагогів, науковців, практичних лікарів значною мірою задовольняє вихід у світ підручника «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» для студентів вищих медичних закладів IV рівня акредитації за редакцією академіка Національної академії наук України В. П. Широбокова. Книгу написали відомі науковці, досвідчені педагоги, мікробіологи, вірусологи, імунологи. Головним є те, що підручник відповідає офіційно затвердженим в установленому порядку сучасним навчальним програмам.

Підручник містить передмову, перелік умовних скорочень, «загальну мікробіологію», «спеціальну мікробіологію». Крім того, є додатки «Основні патогенні бактерії, віруси, мікроскопічні гриби та найпростіші і захворювання, які вони спричиняють»; «Словник термінів з мікології», список літератури, предметний іменний покажчик, покажчик латинських назв мікроорганізмів, гельмінтів. Перша частина видання присвячена питанням загальної мікробіології (сучасні методи дослідження мікроорганізмів, морфологія, структура, міжнародна класифікація бактерій; фізіологія бактерій). Зв'язок сучасної медичної мікробіологічної науки з фундаментальними, клінічними дисциплінами подано достатньо вдало, дохідливо. Важливими для майбутніх лікарів, провізорів будуть відомості, присвячені розвитку, становленню мікробіології в Україні. В книзі вперше вдало подано розділ «Вплив фізичних, хімічних та біологічних факторів на мікроорганізми», що має винятково важливе практичне значення для біотехнологічних процесів, розробки заходів боротьби з інфекційними хворобами. Автори подають чітко, конкретно, доступно, ґрунтовно визначення понять асептики, антисептики, дезінфекції, стерилізації; методи, засоби, переваги та недоліки, що є важливо для студентів усіх факультетів.

Рецензований підручник вдало відрізняється доступністю матеріалу розділу «Генетика мікробів», в якому всі положення висвітлені на високому науковому рівні. В підручнику вміло, переконливо викладено генетику вірусів, їх мінливість. Для молодих лікарів, провізорів стане в нагоді матеріал про генетичні методи, що застосовують фахівці (полімеразна ланцюгова реакція, рестрикційний аналіз, метод молекулярної гібридизації тощо). Цікаво для студентів написано розділ «Біотехнологія». Медична наука не обходиться ні дня без використання біотехнологічних процесів для розробки лікарських, профілактичних засобів. Знання щодо генно-інженерних мікробних ферментів, речовин, продуктів, принципи отримання дуже важливі для майбутніх лікарів. Значна робота проведена по систематизації, класифікації механізмів дії антимікробних препаратів. У підручнику вперше добре представлені антисептики, дезінфектанти, антивірусні препарати, принципи раціональної антибіотикотерапії. Систематизація даних теорії і практики хіміотерапії залишається



безумовно актуальною і своєчасною. Автори ґрунтовно вдало викладають питання неспецифічної резистентності організму, вчення про антигени, імунну систему організму, імунну відповідь, реакції імунітету, алергію. На увагу заслуговують розділи «Імунодіагностика та імунореакція», «Імунопрофілактика та імунотерапія». Наука зробила велетенські кроки у розробці, вдосконаленні даних наукових проблем. Новизною книги є поява розділу «Принципи і засоби імунокорекції. Імуномодулятори, імуносупресори», який має важливе значення. Вперше в підручнику на високому методичному рівні вдало наведені відомості про вакцинні препарати, методи їх одержання, календар проведення щеплень.

Друга частина навчального видання присвячена надзвичайно актуальній проблемі «Мікробіологічна діагностика інфекційних захворювань», в якій автори логічно подали матеріал з облаштування базових, режимних та інших лабораторій; правила роботи в мікробіологічній лабораторії; групи патогенних мікроорганізмів. Належну увагу приділено перевагам та недолікам мікроскопічного, культурального, серологічного, алергічного, біологічного методів та експрес-методів. Вперше в підручнику з медичної мікробіології представлено розділ з гельмінтології, що є досить актуальним. Так, щорічно рівень захворюваності населення України на гельмінтози сягає 900 на 100 тисяч осіб. Важливий розділ, в якому розглядаються біологічні властивості паразитів та захворювання, які вони викликають. Класифікацію та показання до використання антигельмінтних препаратів викладено доступно, зрозуміло. Підготовка кваліфікованих медичних кадрів з питань клінічної мікробіології націлена на ефективне поєднання теоретичних знань з практичною підготовкою та підвищенням якості медичної освіти. Колективу авторів вдалося, на наш погляд, ґрунтовно висвітлити матеріал з клінічної та санітарної мікробіології. Цікавим і корисним для студентів буде розділ, що описує мікробіологічні ознаки збудників опортуністичних інфекцій, особливості контролю в системі заходів профілактики. Принципово суттєво у підручнику з медичної мікробіології написано розділ і «Мікроорганізми і плід». Докладно розглянуті внутрішньоутробні інфекції, що зумовлюють можливе інфікування плода, мертвородження, не виношування вагітності, вроджені вади розвитку, інфекційні захворювання. Для студентів важливо знати біологічні властивості збудників цих захворювань; сучасні методи мікробіологічної діагностики, специфічну профілактику інфекційних уражень плода.

На високу оцінку заслуговує розділ «Мікробіологічні дослідження у фармації», що дозволяє цілісно засвоїти інформацію з мікробіології. Важливо, що в ньому вдало систематизовані відомості про фітопатогенні мікроорганізми, діагностику інфекційних хвороб рослин, мікробіологічні дослідження лікарської сировини, готових лікарських форм. Беззаперечно позитивним є підрозділ «Мікробіологічний контроль лікарських засобів в умовах аптечного виробництва та фармацевтичних підприємств» відповідно до Державної фармакопії України.

Новизною відрізняються погляди авторів підручника на висвітлення розділів «Нормальна мікрофлора тіла людини»; «Мікрофлора ротової порожнини». В єдиному комплексі кваліфіковано викладені важливі відомості для лікарів, провізорів щодо мікроорганізмів, які заселяють біотопи організму людини, їх ролі у життєдіяльності організму, щодо причин виникнення порушень екосистем, ролі місцевого імунітету, засобів профілактики та лікування. Безперечно перевагою даного підручника доцільно вважати те, що автори дали чіткі визначення наукових термінів. Після кожного розділу наведені контрольні питання для самоперевірки, що посилює його позитивну оцінку. Окремо слід позитивно відзначити ретельно оформлені таблиці, схеми, рисунки, світлин. Підручник дозволяє студентам суттєво підвищити якість засвоєння предмету.

Таким чином, новий підручник «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» є оригінальним сучасним виданням, яке становить високу наукову та педагогічну цінність і цілком заслуговує на високий статус. Нова книга несе в собі корисну, важливу інформацію для студентів, викладачів, науковців, аспірантів, магістрантів, інтернів та фахівців, які стоять на сторожі здоров'я людей, благополуччя нашої держави.

Завідувач кафедри мікробіології, вірусології  
та імунології Національного фармацевтичного  
університету МОЗ України доктор медичних наук,  
професор

Н. І. Філімонова



## ПРАВИЛА ПІДГОТОВКИ МАТЕРІАЛІВ ДО ПУБЛІКАЦІЇ В ЖУРНАЛІ «УКРАЇНСЬКИЙ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ»

1. До розгляду приймаються оригінальні та інші види статей (до 10–11 сторінок), присвячені біофармацевтичним дослідженням лікарських препаратів, експериментальній фармакології, біохімії, фармакогнозії та фарм-хімії. Перевага в опублікуванні надається статтям, які містять дані щодо використання результатів біологічних, біохімічних, фармакологічних і біофармацевтичних досліджень.

2. Текст статті друкується кеглем № 14 через 1,5 інтервали на аркуші формату А4 (ширина полів: зліва — 3 см, справа — 1 см, зверху та знизу — по 2 см) і починається з таких даних: індекс УДК, ініціали та прізвища всіх авторів (рівняти по лівому краю), назва організації (курсив, рівняти по лівому краю), в яких виконана робота (якщо авторів декілька, відомості про кожного подаються окремими рядками), назва статті (жирним шрифтом, рівняти по лівому краю), анотація укр. мовою (по центру: АНОТАЦІЯ; з абзацу: текст анотації; з абзацу: Ключові слова: перелік ключових слів (понять) у кількості 3–8. Далі з абзацу (через пропущений рядок) починається текст статті.

3. Автори повинні дотримуватись загального плану побудови статті і виділяти обов'язкові структурні елементи:

3.1. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими або практичними питаннями.

3.2. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які спирається автор.

3.3. Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття.

3.4. Формулювання цілей (завдання) статті.

3.5. Викладення основного матеріалу дослідження (методів та об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів.

3.6. Висновки з проведеного дослідження та перспективи подальшого розвитку даного напрямку.

3.7. Перелік використаних джерел інформації, розташованих за алфавітом (спочатку — роботи вітчизняних авторів, потім — зарубіжних). Цитовані джерела позначаються у тексті цифрами (у квадратних дужках). Джерел інформації має бути не менше п'яти; оформлення — за останніми вимогами ВАК.

4. Стаття супроводжується **повним перекладом англійською мовою та трьома анотаціями**: українською мовою (на початку статті), російською та англійською мовами (після статті). Анотації повинні містити: індекс УДК, ініціали та прізвища всіх авторів, назву статті, ключові слова. Оформлення анотацій:

УДК....

Инициалы и фамилии авторов

НАЗВАННЯ СТАТТІ

### АННОТАЦІЯ

Текст (с абзаца)...

Ключевые слова:

UDC...

L. P. Dorokhova

DIRECTIONS OF THE.....

RESUME

The view the constant....

Key words: ...

5. Формули сполук подаються окремими файлами у форматі Corel Draw (версія не пізніше 11); діаграми та рисунки — у форматі Excel або Corel Draw (версія не пізніше 11); рисунки у вигляді фотографій можуть бути представлені файлами TIFF 300–600 dpi Gray Scale (256 градаций сірого), JPG не менше 1 Мб. Ширина графічного матеріалу повинна бути розміром 5,5 см, 11,5 см або 17,4 см.

6. У статтях повинна використовуватись система одиниць СІ.

7. Таблиці повинні мати нумерацію і заголовок. Інформація, наведена у таблицях і на рисунках, не повинна дублюватися.

8. Усі матеріали подаються до редакції у двох друкованих екземплярах та на електронному носії. Один екземпляр друкується так, як передбачено автором розташування всього графічного і текстового матеріалу. Другий екземпляр статті підписується всіма авторами.

9. Стаття супроводжується експертним висновком, рецензією та направленням від організації (для авторів НФаУ — це розпорядження «До друку» за підписом відповідальної особи НФаУ).

10. До статті на окремому аркуші та в електронному вигляді додаються відомості про авторів, які містять: учене звання, учений ступінь; прізвище, ім'я та по батькові (повністю); місце роботи та посаду, яку обіймає автор; адресу для листування; номери телефонів і факсів, E-mail.

11. Редакція залишає за собою право редакційної правки статті.

12. Статті, відіслані авторам на виправлення, повинні бути повернені до редакції не пізніше, ніж через 10 днів після одержання. В авторській коректурі допускається виправлення лише помилок набору.

13. До друкованого варіанту статті (2 екз.) додається електронна копія мовою оригіналу та англійською мовою на CD диску (або на іншому виді електронного носія) у форматі MS Word.

14. Статті приймаються відповідальним секретарем журналу Галузінською Л. В. за адресою: м. Харків, вул. Куликівська, 12, кафедра біохімії.

К. т. (057) 706-30-99, (067) 119-94-85.

E-mail: zagayko@nuph.edu.ua,

biopharm-journal@nuph.edu.ua.

## ЗМІСТ / СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

НАЗУСТРІЧ VIII НАЦІОНАЛЬНОМУ З'ЇЗДУ ФАРМАЦЕВТІВ УКРАЇНИ .....	3
ДО ЮВІЛЕЮ В. М. КОВАЛЬОВА .....	5
ДО ЮВІЛЕЮ А. М. КОВАЛЬОВОЇ .....	6

### МАТЕРІАЛИ VII НАЦІОНАЛЬНОГО КОНГРЕСУ ПАТОФІЗІОЛОГІВ УКРАЇНИ ЗА МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ «ПАТОФІЗІОЛОГІЯ І ФАРМАЦІЯ: ШЛЯХИ ІНТЕГРАЦІЇ», 5-7 жовтня 2016 р., м. ХАРКІВ

#### EFFECT OF THE DERIVATIVE OF 2-BENZAMIDO-2-(2-OXOINDOLIN-3-ILIDEN) ACETIC ACID ON THE ACTIVITY OF FREE-RADICAL PROCESSES IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Yu. S. Bukataru, I. I. Zamorskii, S. V. Kolisnyk..... 8

Вплив похідного 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти  
на активність вільнорадикальних процесів при черепномозковій травмі /  
Ю. С. Букатару, І. І. Заморський, С. В. Колісник

Влияние производного 2-бензамид-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной  
кислоты на активность свободнорадикальных процессов при  
черепномозговой травме / Ю. С. Букатару, И. И. Заморский, С. В. Колесник

#### OXIDATIVE STRESS CORRECTION WITH METABOLIC PREPARATIONS, NEW POSSIBILITIES OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN PRIMARY GLAUCOMA

I. N. Mikheyitseva, V. N. Yelskiy ..... 12

Корекція оксидативного стресу метаболічними засобами, нові можливості  
антиоксидантного захисту при первинній глаукомі /  
І. М. Михейцева, В. М. Єльський

Коррекция оксидативного стресса метаболическими средствами, новые  
возможности антиоксидантной защиты при первичной глаукоме /  
И. Н. Михейцева, В. Н. Ельский

#### PROTEIN FACTORS OF OXIDATIVE STRESS AND ATHEROGENESIS IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

L. S. Mkhitarjan, O. B. Kuchmenko, O. G. Kupchynska, I. N. Ievstratova,  
N. M. Vasylynchuk, M. P. Mostovyak, T. F. Drobotko ..... 16

Білкові фактори оксидативного стресу і атерогенезу у пацієнтів  
з артеріальною гіпертензією / Л. С. Мхітарян, О. Б. Кучменко,  
О. Г. Купчинська, І. Н. Євстратова, Н. М. Васи́лінчук, М. П. Мостов'як,  
Т. Ф. Дроботько

Белковые факторы оксидативного стресса и атерогенеза у пациентов  
с артериальной гипертензией / Л. С. Мхитарян, Е. Б. Кучменко,  
Е. Г. Купчинская, И. Н. Евстратова, Н. Н. Васи́линчук, М. П. Мостовьяк,  
Т. Ф. Дроботько

# THE INFLUENCE OF GLUTATHIONE ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT ACTIVITY IN KIDNEYS AND BLOOD OF RATS WITH RHABDOMYOLYTIC MODEL OF ACUTE KIDNEY INJURY

V. M. Drachuk, I. I. Zamorskii, O. M. Goroshko.....20

Вплив препарату глутатіону на прооксидантно-антиоксидантний баланс у нирках та крові щурів при рабдоміолітичній моделі гострого пошкодження нирок / В. М. Драчук, І. І. Заморський, О. М. Горошко

Влияние препарата глутатиона на прооксидантно-антиоксидантный баланс в почках и крови крыс при рабдомиолитической модели острого повреждения почек / В. М. Драчук, И. И. Заморский, А. М. Горошко

# ПАТОГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ РОЗВИТКУ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЇХ ЛІКУВАННЯ

А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Н. М. Бабенко, Ю. О. Гаєвська, О. Д. Луценко, М. В. Останков .....24

Патогенетические факторы развития аутоиммунных заболеваний.

Современные подходы к их лечению / А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава,

Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, Е. Д. Луценко, М. В. Останков

Pathogenetic factors of development of autoimmune diseases.

Current approaches to their treatment / A. M. Goltsev, T. G. Dubrava,

N. N. Babenko, Yu. A. Gaevskaya, E. D. Lutsenko, M. V. Ostankov

# ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КРЕМУ «ЕНОПСОР» НА ПЕРЕБІГ АЛЕРГІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ ШКІРИ, ВИКЛИКАНОГО 2,4-ДИНІТРОХЛОРОБЕНЗОЛОМ

Л. В. Галузінська, А. Л. Загайко .....29

Изучение влияния крема «Энопсор» на течение аллергического воспаления кожи, вызванного 2,4-динитрохлорбензолом / Л. В. Галузинская, А. Л. Загайко

The study of the impact of cream "Enopsor" on the course of allergic inflammation of the skin caused by 2,4-benzene-dinitrochlor / L. V. Galuzinska, A. L. Zagayko

# ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТІВ З ЛИСТЯ СТЕВІЇ ТА ЧОРНИЦІ НА ПОКАЗНИКИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ, ІНДУКОВАНОГО ВИСОКОФРУКТОЗНОЮ ДІЄТОЮ З ДОДАВАННЯМ ІН'ЕКЦІЙ ДЕКСАМЕТАЗОНУ

А. Л. Загайко, О. І. Чумак, В. П. Филимоненко.....33

Исследование влияния экстракта из листьев стевии и черники на показатели развития экспериментального сахарного диабета, индуцированного высокофруктозной диетой с добавлением

инъекций дексаметазона / А. Л. Загайко, Е. И. Чумак, В. П. Филимоненко

Research of influence of extract of leaves of stevia and bilberry on the performance of development of experimental diabetes induced by high fructose diet by means of adding of injections of deksamithazon /

A. L. Zagayko, O. I. Chumak, V. P. Filimonenko

# ОГЛЯДОВІ СТАТТІ

# LIPOPROTEIN LIPASE AS AN ATTRACTIVE TARGET FOR CORRECTING DYSLIPIDEMIA AND REDUCTION OF CVD RESIDUAL RISK

D. A. Dorovsky, A. L. Zagayko.....38

Ліпопротеїнліпаза як мішень для корегування дисліпідемії і скорочення залишкового ризику серцево-судинних захворювань / Д. А. Доровський, А. Л. Загайко

Липопротеинлипаза как мишень для коррективки дислипидемии и сокращения остаточного риска сердечно-сосудистых заболеваний / Д. А. Доровский, А. Л. Загайко

## БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВІ СУБСТАНЦІЇ АДЕМЕТІОНІНУ 1,4-БУТАНДИСУЛЬФОНАТУ

К. С. Бурдак, Т. Г. Ярних, М. І. Борщевська, В. А. Коноваленко ..... 46

Изучение стабильности таблеток на основе субстанции адеметионина  
1,4-бутандисульфоната / К. С. Бурдак, Т. Г. Ярних, М. И. Борщевская,  
В. А. Коноваленко

Studying of stability of tablets on the basis of the substance ademetonine  
1,4-butandisulfonate / K. S. Burdak, T. H. Yarnykh, M. I. Borshchevska,  
V. A. Konovalenko

## ФАРМАЦЕВТИЧНА ХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

### THE MINERAL COMPOSITION OF HERBAL DRUG OF SAFFLOWER (*CARTHAMUS TINCTORIUS*. L.)

О. В. Барашовець, Н. В. Попова ..... 52

Елементний склад сировини сафлору красильного  
(*Carthamus tinctorius*. L.) / О. В. Барашовець, Н. В. Попова

Элементный состав сырья сафлора красильного  
(*Carthamus tinctorius*. L.) / О. В. Барашовец, Н. В. Попова

### ОКИСНЕННЯ 2-(5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)ЕТАНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ ЕСТЕРІВ ДО 3-ІЛСУЛЬФІНІЛ- ТА 3-ІЛСУЛЬФОНІЛПОХІДНИХ

Т. М. Каплаушенко, О. І. Панасенко, Ю. М. Кучерявий ..... 56

Окисление 2-(5-(хинолин-2-ил)-1,2,4-триазол-3-ил)тио)-этановой кислоты  
и ее эфиров до 3-илсульфинил- и 3-илсульфонилпроизводных /

Т. Н. Каплаушенко, А. И. Панасенко, Ю. Н. Кучерявий

Oxydation of 2-(5-(quinoline-2-yl)-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethanoic acid and  
its esters to 3-ylsulfonyl-, and 3-ylsulfinyl derivatives / T. M. Kaplaushenko,  
O. I. Panasenko, Yu. M. Kucheryavii

## БІОХІМІЯ ТА ФАРМАКОЛОГІЯ

### PHARMACOKINETIC STUDY OF DICLOPHENAC SODIUM IN RAT PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Л. В. Брунь, В. І. Маколінетс, С. Н. Губар ..... 62

Дослідження фармакокінетики диклофенаку натрію у плазмі крові  
щурів методом вискоєфективної рідинної хроматографії / Л. В. Брунь,  
В. І. Маколінець, С. М. Губарь

Исследование фармакокинетики диклофенака натрия в плазме крови  
крыс методом вискоєфективной жидкостной хроматографии /  
Л. В. Брунь, В. И. Маколинетс, С. Н. Губарь



**CIRCADIAN CHARACTERISTICS OF THE GLUTARGIN INFLUENCE ON PROTEIN AND PURINE METABOLISM UNDER THE CONDITIONS OF CHRONODETERMINATED ACETAMINOPHEN HEPATITIS IN RATS**

K. O. Kalko, S. M. Drogozov, S. Yu. Shtrigol, A. V. Kononenko, V. A. Ulanova, T. K. Yudkevich..... 71

Циркадіанні особливості впливу глутаргіну на білковий та пуриновий обміни в умовах хронодетермінованого парацетамолового гепатиту у щурів / К. О. Калько, С. М. Дрогозов, С. Ю. Штриголь, А. В. Кононенко, В. А. Уланова, Т. К. Юдкевич

Циркадианные особенности влияния глутаргина на белковый и пуриновый обмены в условиях хронодетерминированного парацетамолового гепатита у крыс / Е. А. Калько, С. М. Дрогозов, С. Ю. Штриголь, А. В. Кононенко, В. А. Уланова, Т. К. Юдкевич

**THE INFLUENCE OF THE RARE-EARTH METALS NANOPARTICLES ON THE RAT'S MALES REPRODUCTIVE FUNCTION IN THE DESCENDING STAGE OF ONTOGENESIS**

N. O. Karpenko, Ye. M. Korenieva, E. Ye. Chystiakova, N. P. Smolienko, I. O. Bielkina, N. Yu. Seliukova, S. P. Kustova, M. O. Boiko, Yu. B. Larianovska, V. K. Klochkov, N. S. Kavok..... 75

Вплив наночастинок рідкоземельних елементів на репродуктивну функцію самців щурів на низхідній стадії онтогенезу / Н. О. Карпенко, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, І. О. Белкіна, Н. Ю. Селюкова, С. П. Кустова, М. О. Бойко, Ю. Б. Ларьяновська, В. К. Клочков, Н. С. Кавок

Влияние наночастиц редкоземельных элементов на репродуктивную функцию самцов крыс на нисходящей стадии онтогенеза / Н. А. Карпенко, Е. М. Коренева, Е. Е. Чистякова, Н. П. Смоленко, И. О. Белкина, Н. Ю. Селюкова, С. П. Кустова, М. О. Бойко, Ю. Б. Ларьяновская, В. К. Клочков, Н. С. Кавок

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ JNK КИНАЗ**

А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, Мухамед Ахмед Мусмари ..... 81

Вивчення антиоксидантної активності нових потенційних інгібіторів JNK кіназ / А. Л. Загайко, О. А. Красильнікова, Мухамед Ахмед Мусмари

Study antioxidant activity of new potential inhibitors of JNK kinases /

A. L. Zagayko, O. A. Krasil'nikova, Mohamed Ahmed Musmari

**Рецензія на підручник «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» для студентів вищих медичних закладів IV рівня акредитації за редакцією академіка НАН, НАМН України В. П. Широбокова ..... 85**

**ПРАВИЛА ПІДГОТОВКИ МАТЕРІАЛІВ ДО ПУБЛІКАЦІЇ В ЖУРНАЛІ**

«УКРАЇНСЬКИЙ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ» ..... 87



Свідоцтво про державну реєстрацію  
КВ № 19397-9197 ПР від 21.09.2012 р.

Редактор *А. Л. Краснікова*  
Комп'ютерне верстання *О. О. Воробйова*

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:  
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12. Тел./факс (057) 706-30-99.  
E-mail: biopharm-journal@nuph.edu.ua, press@nuph.edu.ua.

Передплатні індекси:  
для індивідуальних передплатників — 86822;  
для підприємств — 86823.

Підписано до друку 15.08.2016 р. Формат 60х84 1/8  
Умов. друк. арк. 10. Обліков.-вид. арк. 10,76  
Тираж 100 пр.

Надруковано з готових оригінал-макетів у друкарні ФОП Азамаєв В. Р.  
Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.  
Запис № 24800170000026884 від 25.11.1998 р.  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру  
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.  
Серія ХК № 135 від 23.02.05 р.  
м. Харків, вул. Познанська, 6, к. 84, тел. (057) 362-01-52  
E-mail: bookfabrik@mail.ua