

**УКРАЇНСЬКИЙ
БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
ЖУРНАЛ**



**УКРАИНСКИЙ
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**UKRAINIAN
BIOPHARMACEUTICAL
JOURNAL**

Заснований у лютому 2008 р.

№ 2 (31) 2014

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., Дрогвоз 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., Стрельніков 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 № 8 від 31.03.2014 р.)

Біохімія та мікробіологія

Рецензенти рубрики:

Севериновська О. В.,
д. біол. н., професор

Філімонова Н. І.,
д. мед. н., професор



УДК 616.24 – 76.29.49: 76.03.31

Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат

Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара

СТАН ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ, АЛІМЕНТАРНО ЕКСПОЗОВАНИХ ЕСТРОГЕНАМИ

Інгібіція протеолітичних процесів в організмі дослідних щурів за впливу аліментарних стероїдних гормонів може призводити до гальмування апоптозу внаслідок порушення сигнальних шляхів передачі інформації та напруження в системі детоксикації з наступним розвитком проліферативних гіперпластичних процесів і раку в естрогенозалежних тканинах і, зокрема, молочній залозі.

Ключові слова: протеолітичні процеси; стероїдні гормони; апоптоз; проліферація

ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) в структурі захворюваності та смертності жіночого населення стійко займає лідируючі позиції. У структурі онкологічної захворюваності жінок в Україні РМЗ посідає перше місце. Рівень захворюваності на РМЗ в Україні за останні 45 років (1965-2010) зріс з 17,6 до 69,7 на 100 тис. жіночого населення, за останні 20 років – у 2,5 рази, щорічний приріст цієї онкопатології становить більше 2 %. За даними Національного канцер-реєстру щорічно в Україні реєструють понад 16,5 тис. нових випадків РМЗ, серед яких 25 % – жінки репродуктивного віку [6].

Харчування становить 30-35 % факторів ризику, які спричиняють виникнення пухлин. У сучасному промисловому тваринництві при інтенсивних технологіях вирощування тварин з порушенням технологічних регламентів часто незаконно застосовуються шкідливі для здоров'я людини гормональні стимулятори росту і тиреостатики, тому що вони дозволяють домогтися значного підвищення продуктивності. Є вагомі підстави вважати, що споживання великої кількості жирів тваринного походження (з м'ясом і молочними продуктами) може викликати розвиток РМЗ. Статеві гормони тварин ідентичні гормонам людини. Потрапляючи в організм людини з їжею, ці гормони сприймаються ним як свої власні. Надмірний рівень естрогену в організмі буває причиною захворювань різного ступеня тяжкості: у жінок (особливо літнього віку) він здатен викликати рак грудей [5].

Найбільш відповідальний період постнатального онтогенезу – статеве дозрівання (пубертатний період). Статеві гормони разом з іншими факторами чинять виражений ефект на біохімічні обмінні проце-

си, впливають на функцію різних органів і систем організму: при гіпоестрогенії (що не відповідає віку) розвиваються остеопороз, гормональна кардіопатія, депресивний стан, сенільні психози; при гіперестрогенії – гіперпластичні процеси і гормонозалежні пухлини [5].

Протеолітичні ензими залучені до ключових про-онкогенних процесів: ангіогенезу, інвазії та метастазування. Посилення експресії протеаз та їх активності спостерігається в злоякісних пухлинах людини і корелює зі злоякісною прогресією та несприятливим прогнозом для пацієнта [15].

Мета роботи – дослідження протеолітичних процесів в органах щурів різного віку, що піддавалися впливу екзоестрогенів, для визначення тригерних механізмів розвитку новоутворень.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти були проведені на щурах-самках лінії Вістар, які піддавалися впливу екзоестрогену протягом 45 діб. На початок експерименту вік піддослідних тварин складав 3 місяці – у препубертатному періоді (група II) та 6 місяців – статевозрілі (група IV). Контрольні групи – інтактні тварини відповідного віку (групи I та III).

Для моделювання впливу екзогенного естрогену їжу щурів обробляли препаратом «Сінестрон» – похідним стильбену, який за хімічною будовою відрізняється від стероїдних естрогенних гормонів, але за біологічними і лікувальними властивостями близький до них — в розрахунку 2 мкг на кг маси.

Матеріали дослідження: мозок і печінка щурів. Об'єкт досліджень: показники активності протеолізу: трипсину та його облігатних інгібіторів – α 1-антитрипсину (α 1-АТ), α 2-макроглобуліну (α 2-МГ) [2], катепсину В і катепсину L [1], вмісту молекул середньої маси (МСМ) [4], загального білка [12].

© Лихолат Т. Ю., Лихолат О. А., 2014

Таблиця

ЗСУВИ В ПРОТЕОЛІТИЧНІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ, ПІДДАНІ ВПЛИВУ АЛІМЕНТАРНИХ ЕСТРОГЕНІВ ($M \pm m$)

Показник	I група, n=6	II група, n=6	III група, n=6	IV група, n=6
Печінка				
Трипсин, нмоль/с г білка	0,65 \pm 0,03	0,73 \pm 0,04*	0,67 \pm 0,033	0,72 \pm 0,036*
α 1-АТ, мкмоль/с г білка	0,46 \pm 0,02	0,54 \pm 0,03*	0,48 \pm 0,024	0,53 \pm 0,027*
α 2-МГ, мкмоль/с г білка	23,5 \pm 1,17	21,62 \pm 1,08	24,11 \pm 1,20	25,2 \pm 1,26
Катепсин L, ум.од./г білка	21,19 \pm 1,06	18,01 \pm 0,91	20,78 \pm 1,04	18,65 \pm 0,93
Катепсин В, ум.од./г білка	20,88 \pm 1,04	21,06 \pm 1,05	21,07 \pm 1,05	21,34 \pm 1,05
МСМ, ум.од.	8,78 \pm 0,44	10,15 \pm 0,52	7,68 \pm 0,38	8,78 \pm 0,44
Мозок				
Трипсин, нмоль/с г білка	0,073 \pm 0,004	0,061 \pm 0,003*	0,072 \pm 0,003	0,067 \pm 0,003*
α 1-АТ, мкмоль/с г білка	0,27 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
α 2-МГ, мкмоль/с г білка	13,77 \pm 0,69	22,41 \pm 1,12*	14,42 \pm 0,63	14,27 \pm 0,71
Катепсин L, ум.од./г білка	12,74 \pm 0,61	13,66 \pm 0,68	11,05 \pm 0,55	14,43 \pm 0,72
Катепсин В, ум.од./г білка	14,07 \pm 0,73	15,47 \pm 0,77	14,25 \pm 0,70	13,11 \pm 0,66
МСМ, ум.од.	4,67 \pm 0,23	3,94 \pm 0,19*	4,15 \pm 0,22	4,67 \pm 0,23*

Примітка: * – вірогідність змін у порівнянні з контрольними показниками, $p \leq 0,05$.

Одержані дані обробляли стандартними методами оцінки варіаційних рядів. Різницю між порівнюваними величинами вважали вірогідною при $p < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Існують дані, що в пухлинних процесах важливу роль відіграє протеоліз: сприяє підвищенню проліферативної активності, інгібуванню апоптозу, стимуляції неоангіогенезу та індукції лікарської резистентності. Велику роль в інвазії та метастазуванні злоякісних пухлин відіграють цистеїнові пептидогідролази – катепсини [14].

Після проведення досліджень із визначення впливу екзоестрогену на протеолітичні процеси самиць препубертантного та статевозрілого віку були отримані наступні результати.

Доведено, що трипсин є неспецифічним переносником стероїдних гормонів. У печінці спостерігалось зниження індексу трипсину у піддослідній II групі щурів (на 16 %), у той час як у статевозрілих самиць активність ензиму підвищена на 13% в IV групі (табл.).

α 1-Антитрипсин – глікопротеїн, який синтезується в печінці. Показано, що α 1-АТ інгібує хімотрипсин-індукований апоптоз печінкових клітин, що призводить до неконтрольованої проліферації пухлинних клітин [7]. Рівень α 1-АТ був вищим у II групі на 17 % у порівнянні з інтактною і домінував у IV групі (на 11 %).

α 2-Макроглобулін є глікопротеїном, інгібітором плазматичних протеїназ і використовується в якості маркера проникності клітинних мембран. В силу позитивного впливу естрогенів на синтез α 2-МГ концентрація його у жінок приблизно на 20% більша, ніж у чоловіків; α -МГ має властивість зв'язувати гормони та цитокіни (IL, IFN, TNF- α , фактори зростання) [11]. Активність α 2-МГ мала тенденцію до зниження у піддослідних щурів препубертантного віку і слабко зростала у піддослідних статевозрілих особин.

Цистеїнові катепсини є важливими регуляторами та сигнальними молекулами великої кількості біологічних процесів. Підвищена активність катепсинів була продемонстрована в багатьох пухлинних клітинах [9]. Активність катепсину В є позитивним регулятором апоптотичного каскаду [8]. Катепсин В сприяє проліферації епітеліальних клітин молочної залози і передраковому прогресуванню раку, естроген впливає на його активність [13]. Катепсин L в основному відповідає за виділення факторів зростання пухлини [16]. Катепсини В та L, які, крім деструктивної, виконують і регуляторну функцію, здійснюючи постсинтетичну модифікацію попередників пептидних гормонів та нейромедіаторів [10].

Активність цистеїнового катепсину L була знижена у печінці самиць препубертантного віку при порівнянні з контрольною на 15 % і на 12 % статевозрілих особин IV групи.

При визначенні активності трипсину в мозку були отримані наступні дані: в контрольній групі I активність ензиму домінувала над показником відповідної піддослідної групи на 14,2 %. В контрольній групі статевозрілих особин активність трипсину була вищою на 5 % в порівнянні з показником самиць піддослідної групи. Спостерігалася тенденція до підвищення ферментативної активності α 1-АТ у піддослідних групах препубертантних та статевозрілих самиць на 7,6 % та 6,85 %, відповідно. При дослідженні активності α 2-МГ детермінована активація на 62,8 % у піддослідній групі II при порівнянні з контрольною I, в той час як відхилення показника між дослідними групами статевозрілих тварин були незначними.

За експозиції препарату Сінестрон у мозку щурів у препубертантному періоді зафіксована активація катепсину В на 10 % при порівнянні з контрольною групою аналогічного віку. У статевозрілих са-

миць активність ферменту знижена на 6,2 % в піддослідній групі в порівнянні з контролем.

Нервові клітини містять великі кількості катепсину L. Визначена функція катепсину L в секреторних везикулах в якості ключової протеази для протеолітичного процесингу пронейропептидів і прогормонів в активні нейропептиди, які є посередниками для синапсів у міжклітинних комунікаціях у нервовій системі. За експозиції препарату Сінестрол у мозку щурів обох піддослідних відбувалася активація катепсину L: на 7,2 % (II група) та 13,25 % (IV група).

Одним з провідних патогенетичних синдромів критичних станів є ендogenous інтоксикація, яку детермінують за вмістом молекул середньої маси. Показане їх накопичення в органах щурів обох піддослідних груп. Так, зростання вмісту МСМ у самиць препубертатного віку, що споживали Сінестрон, складало у печінці 12 %, у нирках – 32,5 %, у сироватці крові – 18,5 %, у головному мозку – 15,6 %. У статевозрілих самиць підвищення становило 7,4 %, 11,3 %, 14 % та 14 %, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Аліментарна експозиція щурів екзоестрогенами призводить до змін в протеолітичній системі та розвитку ендogenous інтоксикації, що є органоспецифічними та залежними від віку тварин: вищий рівень посилення активності інгібіторної ланки та вмісту МСМ спостерігається у щурів у пубертатному періоді, що спричиняє зниження потенціалу захисних механізмів організму і може стати тригером дисфункції систем природної детоксикації та біотрансформації, порушення сигнальних шляхів передачі інформації. Визначені феномени в організмі дослідних щурів можуть призводити до гальмування апоптозу – одного з основних механізмів видалення ушкоджених клітин з популяції.
2. Стероїдні гормони, що надходять до організму з харчовими продуктами, здатні ініціювати ендокринні порушення, моделювати реакції, що залежать від рецепторів стероїдних гормонів, в патологічні, які результатуються в несприятливі проблеми зі здоров'ям для людей, а саме зростання ризику розвитку пухлин і метастазів. Припустимо, що перераховані вище ефекти обумовлюють розвиток проліферативних гіперпластичних процесів і раку в естрогенозалежних тканинах і, зокрема, молочній залозі.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Березин В. А. Очистка и некоторые свойства тиаоактивируемого катепсина из больших полушарий головного мозга и мозжечка быка / В. А. Березин, В. И. Черная, А. Д. Рева, О. В. Смагина // Укр. биохим. журн. – 1982. – № 3. – С. 249-253.
2. Карягина И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, $\alpha 1$ -антитрипсина и $\alpha 2$ -макрогло-

булина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, З. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. – 1990. – № 2. – С. 10-13.

3. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М., 1990. – 293 с.
4. Малахова М. Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации / М. Л. Малахова // Эффер. терапия. – 1995. – № 1. – С. 60-65.
5. Уварова Е. В. Репродуктивное здоровье девочек подросткового возраста / Е. В. Уварова // Рос. вестник перинат. и педиатрии. – 2003. – Т. 48, № 5. – С. 8-9.
6. Федоренко З. П. Рак в Україні 2011-2012 / [З. П. Федоренко, Ю. Й. Михайлович, Л. О. Гулак та ін.] // Бюл. Нац. канцер-реєстру України. – 2013. – № 14. – 120 с.
7. Emoto T. Alpha 1-antichymotrypsin inhibits chymotrypsin-induced apoptosis in rat hepatoma cells / [T. Emoto, K. Nakamura, Y. Y. Nagasaka et al.] // Apoptosis. – 1998. – Vol. 3, № 3. – P. 155-160.
8. Eykelbosh A. J. A role for the lysosomal protease cathepsin B in zebrafish follicular apoptosis / A. J. Eykelbosh, K. G. Van Der // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2010. – Vol. 156, № 2. – P. 218-223.
9. Fröhlich E. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma / [E. Fröhlich, B. Schlagenhauff, M. Möhrle et al.] // Cancer. – 2001. – Vol. 91, № 5. – P. 972-982.
10. Hook V. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease / [V. Hook, L. Funkestein, J. Wegrzyn et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1. – P. 89-104.
11. Lauer D. Alpha 2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta 1-42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism / D. Lauer, A. Reichenbach, G. Birkenmeier // Exp. Neurol. – 2001. – Vol. 167. – P. 385-392.
12. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / [O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-269.
13. Mullins S. R. Three-dimensional cultures modeling premalignant progression of human breast epithelial cells: role of cysteine cathepsins / [S. R. Mullins, M. Sameni, G. Blum et al.] // Biol. Chem. – 2012. – Vol. 17. – P. 11-15.
14. Palermo C. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer / C. Palermo, J. A. Joyce // Trends Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 22-28.
15. Pandey A. Cancer testes antigens in breast cancer: biological role, regulation, and therapeutic applicability / [A. Pandey, A. Kurup, A. Shrivastava et al.] // Int. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 5. – P. 302-320.
16. Rochefort H. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? / [H. Rochefort, F. Capony, M. Garcia et al.] // J. Cell. Biochem. – 1987. – Vol. 1. – P. 17-29.

УДК 616.24 – 76.29.49: 76.03.31**Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат****СОСТОЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА КРЫС, АЛИМЕНТАРНО
ЭКСПОЗИРОВАННЫХ ЭСТРОГЕНАМИ**

Ингибирование протеолитических процессов в организме подопытных крыс при воздействии алиментарных стероидных гормонов может приводить к торможению апоптоза вследствие нарушения сигнальных путей передачи информации и напряжения в системе детоксикации с последующим развитием пролиферативных гиперпластических процессов и рака в эстроген-зависимых тканях и, в частности, молочной железе.

Ключевые слова: протеолитические процессы; стероидные гормоны; апоптоз; пролиферация

UDC 616.24 – 76.29.49: 76.03.31**T. Yu. Lykholat, O. A. Lykholat****STATE OF PROTEOLYTIC SYSTEM IN THE RAT ORGANISM BY ALIMENTARY ESTROGENS EXPOSED**

Inhibition of the proteolytic processes in the experimental rats' organism under the influence of the nutritional steroid hormones can lead to apoptosis deceleration due to the violations of signaling pathways of data transmission and tension in the system of detoxification followed by the development of the proliferative hyperplastic processes and cancer in estrogen-sensitive tissues and in the particular breast.

Key words: proteolytic processes; steroid hormones; apoptosis; proliferation

Адреса для листування:

49010, м. Дніпропетровськ, вул. Казакова, 24.

Тел. 0502291962. E-mail: Lykholat2006@ukr.net

Дніпропетровський національний університет
ім. О. Гончара

Надійшла до редакції:

27.02.2014 р.

УДК 616.992.282:615.371:615.015.33

М. В. РИБАЛКІН, Н. І. ФІЛІМОНОВА, О. П. СТРИЛЕЦЬ, Л. С. СТРЕЛЬНИКОВ

Національний фармацевтичний університет

ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ІНАКТИВОВАНИХ КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* ТА *CANDIDA TROPICALIS* ОКРЕМО ФОРМУВАТИ ІМУНІТЕТ ПРОТИ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Досліджені імуногенні властивості інактивованих клітин грибів Candida albicans та Candida tropicalis окремо. В результаті проведених досліджень встановлено, що імунізуюча доза, яка забезпечує напружений імунітет протягом 3 місяців, при внутрішньом'язовому введенні по 0,2 мл інактивованих клітин грибів Candida albicans містить 4 млн/мл, а інактивованих клітин грибів Candida tropicalis містить 5 млн/мл. Доведено, що внутрішньом'язовий шлях введення інактивованих клітин грибів Candida забезпечує краще формування імунітету проти кандидозної інфекції, ніж підшкірний шлях введення.

Ключові слова: кандидамікоз; антиген; вакцина; імунітет; інактивовані клітини

ВСТУП

Гриби роду *Candida* відомі з давніх часів. Сьогодні кандидози продовжують активно досліджуватися, так як з другої половини 20 століття відмічається постійне зростання захворюваності на ці мікози. Незважаючи на вдосконалення методів діагностики, появу ефективних антибіотиків, значимість кандидозу продовжує зростати. Цьому сприяє активне і не завжди обґрунтоване та правильне використання антибіотиків, вторинні імунодефіцити після лікування онкозахворювань, трансплантацій, зростання захворюваності ВІЛ-інфекції і на кінець висока пристосовуваність даного збудника [4, 8, 14, 16].

Думки різних авторів з приводу носійства грибів цього роду на неушкодженій шкірі розходяться: частина вважає, що воно може бути тільки транзитним, і в нормі гриби повинні бути відсутні на шкірі, а інші – сягати 10 %. *Candida* є умовно-патогенним мікроорганізмом з високим рівнем носійства, частота якого постійно зростає: якщо в 20-ті роки ХХ ст. воно складало на слизовій ротової порожнини 10 %, то в 60-70-ті роки зросло до 46-52 %, а в наші дні досягло 60 % [4, 14, 16]. На слизовій оболонці вагіни невагітних жінок носійство досягає 11-12,7 %, але різко збільшується в останній триместр, що становить по різних даних 29,3-86 % [4, 8, 14].

Збудниками кандидозу є дріжджові гриби роду *Candida* родини Cryptococcaceae. На теперішній момент відомо близько 160 видів грибів роду *Candida* та лише близько 20 здатні викликати кандидоз у лю-

дини. При цьому найчастіше у хворих виділяють 8 видів: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*. Найчастіше збудником кандидозу є *Candida albicans*, який викликає 90 % поверхневих та 50-70 % глибоких форм. Другим за розповсюдженістю збудником кандидозу є *C. tropicalis* [1, 4, 16].

Захист організму від кандидозних уражень забезпечує ряд механізмів: неспецифічних та специфічних. До перших відносять несприятливе для грибів середовище організму (рН, температура), цільність шкірних покривів та слизових оболонок, баланс десквамації і регенерації епітеліоцитів, нормальне функціонування миготливого епітелію, присутність мукополісахаридів слизу, конкуренція представників нормальної мікрофлори та тканин макроорганізму, адекватна перистальтика і нормальний стан кислотно-ферментних систем кишково-шлункового тракту. Також до цієї групи належить присутність достатнього рівня секреторного IgA, лізоциму, трансферину, лактоферину, церулоплазміну, білків гострої фази, компонентів комплементу, мананозв'язуючого протеїну тощо. Однак головну роль у захисті організму відіграють специфічні фактори імунної системи: фагоцити, НК-клітини, Т-лімфоцити, антитіла, система комплементу. Головним ланцюгом, який позбавляє організм людини *Candida* spp., є фагоцити-макрофаги і нейтрофіли. Відбувається це шляхом фагоцитозу, а також за рахунок регуляції імунної відповіді [4, 8, 14, 16].

На думку багатьох дослідників активація даних імунологічних механізмів шляхом введення вакцин на основі антигенів [2, 3, 6, 12] забезпечує кращу ре-

© Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрилець О. П., Стрельников Л. С., 2014

Таблиця 1

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ВНУТРІШНЬОМ'ЯЗОВОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida albicans, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Внутрішньом'язове введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	-	-	-	++
++	++	-	-	-	+++
+	-	-	-	-	+++
++	+	+	+	-	+++
+	+	-	-	+	+++
++	+	+	-	-	++
Результати через 3 місяці					
++	+	-	-	-	++
++	+	+	+	-	+++
+	+	-	-	-	++
++	+	-	-	-	+++
+	++	+	-	-	+++
++	-	-	-	+	+++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

зультативність при профілактиці і лікуванні кандидозної інфекції у порівнянні з використанням традиційних протигрибкових препаратів, до яких у багатьох грибів роду *Candida* виробилася стійкість [4, 8, 9]. Таким чином, перспективна розробка вакцини для профілактики та лікування кандидозної інфекції на основі грибів роду *Candida*, а саме *Candida albicans* та *Candida tropicalis*, які є основними збудниками кандидозів [1, 11, 13]. Подібні дослідження активно проводяться за кордоном [7, 10, 13, 16].

У попередніх дослідженнях був обґрунтований метод інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* шляхом поєднання фізичних та хімічних чинників. Тепер необхідно дослідити імуногенні властивості клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проти кандидомікозів.

Метою даної роботи було дослідження здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* формувати імунітет проти кандидозної інфекції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі дослідження проводили у ламінарному боксі, підтримуючи асептичні умови. Клітини грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 попередньо окремо культивували у пробірках на агарі Сабуро при 25 ± 2 °C упродовж 48 годин та змивали клітини грибів 10 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Перено-

Таблиця 2

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ПІДШКІРНОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida albicans, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Підшкірне введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	-	-	-	+++
++	++	+	-	+	++
+	-	-	+	-	+++
++	+	-	-	-	+++
++	+	-	-	-	++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
+	+	-	-	-	+++
++	+	+	-	-	+++
++	+	+	-	-	+++
+	+	-	+	-	+++
++	++	++	-	+	+++
++	-	+	-	-	++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

сили окремо одержані суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, які інкубували при 25 ± 2 °C упродовж 6 діб та змивали клітини грибів 50 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* візуально та методом мікроскопування. Далі проводили центрифугування при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 10 хв. Одержаний осад клітин грибів доводили стерильним ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду до необхідної кількості та стандартизували суспензії шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва [5].

Комплексну інактивацію суспензій клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну: інактивували температурою 50 ± 2 °C протягом 1 години у об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів в усіх шарах суспензії, після чого до кожної суспензії грибів додавали формалін у концентрації 40 %, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензіях до 0,5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хв та залишали протягом доби при температурі 25 ± 2 °C. Використання температури 25 ± 2 °C виключає зниження імуногенності

Таблиця 3

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA TROPICALIS*
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ВНУТРІШНЬОМ'ЯЗОВОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida tropicalis, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Внутрішньом'язове введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	+	+	-	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	++	-	-	++
++	+	-	+	+	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
++	+	+	-	-	+++
++	+	+	-	+	+++
++	++	++	-	-	+++
+	+	+	+	-	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	-	+	-	++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

властивостей клітин грибів у подальшому. Температуру підтримували шляхом розташування ємкостей з дослідними суспензіями грибів на водяній бані.

Для оцінки здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та клітин грибів *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 окремо з різним вмістом клітин грибів 1, 2, 3, 4, 5 млн викликати імунітет проводили дослідження на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18-22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних групах, які утримувалися в однакових умовах на стандартному раціоні [8, 10]. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи та окремо підшкірно у верхню частину задньої правої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* у об'ємі по 0,2 мл. Через 14 днів повторно у верхню частину задньої лівої лапи та окремо підшкірно у верхню частину задньої лівої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* об'ємом по 0,2 мл [11, 12, 18, 19, 23]. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин. Через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин та через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин після імунізації проводили внутрішньоочеревинне зараження. Для цього використовували суспензію грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн клітин та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 у кількості 60 млн клітин в об'ємі 5 мл [9, 21], після чого

Таблиця 4

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA TROPICALIS*
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ПІДШКІРНОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida tropicalis, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Підшкірне введення					
Результати через 1 місяць					
++	++	++	-	-	++
+	+	+	+	-	++
++	+	+	+	-	+++
++	++	+	-	+	++
++	+	-	+	-	+++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
++	++	+	-	-	++
++	+	+	+	-	+++
+	++	+	-	+	++
++	+	-	+	+	+++
++	++	+	+	-	+++
++	+	++	+	-	+++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати.

Результати проб враховували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за наступною системою: (-) – відсутність проявів захворювання; слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів; середня форма захворювання (++) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічних процесів, висівання грибів з фекалій тварин; розвинута форма захворювання (+++) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів, внутрішніх органів тварин були виявлені ознаки патологічних процесів: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печінці та інших органах, виділення ретрокультур грибів з органів тварин. Результати досліджень оброблялися статистично.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлено, що доза інактивованих клітин грибів *Candida al-*

bicans як при внутрішньом'язовому, так і при підшкірному введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 4 млн та 5 млн клітин грибів, через 1 та 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 84% тварин. З огляду на те, що доза 4 млн клітин грибів *Candida albicans* в 1 мл містить меншу кількість клітин грибів, більш доцільним для подальших досліджень ми вважаємо саме цю дозу. Результати досліджень наведені у табл. 1.

Доза інактивованих клітин грибів *Candida albicans*, що містить в 1 мл 3 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 67 % білих мишей як при внутрішньом'язовому, так і при підшкірному введенні, а через 3 місяці – також 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні та 34 % білих мишей при підшкірному введенні. При цьому у тварин, які захворіли у результаті експериментального зараження, відмічалось лише незначне пригнічення, потім мимовільне одужання, тоді як невакциновані тварини тяжко хворіли. Легкий перебіг хвороби зазначався також у мишей, імунізованих у дозі 2 млн клітин гриба, однак у цій групі відсоток тварин, яких зовсім не вдалося заразити, був дуже низьким. Результати досліджень наведені у табл. 2.

За результатами проведених досліджень встановлено, що доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 5 млн клітин грибів, через 1 та 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 84 % тварин. Доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* при підшкірному введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 5 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 84 % та через 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 67 % тварин. Результати досліджень наведені у табл. 3.

Доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis*, яка містить в 1 мл 4 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні, а при підшкірному – 50 % тварин. Через 3 місяці – також 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні та 34 % білих мишей при підшкірному введенні. При цьому у тварин, які захворіли у результаті експериментального зараження, відмічалось лише незначне пригнічення, потім мимовільне одужання, тоді як невакциновані тварини тяжко хворіли. Легкий перебіг хвороби відмічався також у мишей, імунізованих у дозі 3 млн клітин гриба, однак у цій групі відсоток тварин, яких зовсім не вдалося заразити, був дуже низьким. Результати досліджень наведені у табл. 4.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень встановлено, що імунізуюча доза, яка забезпечує напружений імунітет протягом 3 місяців, при внутрішньом'язовому

введенні по 0,2 мл інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* містить відповідно 4 млн/мл і 5 млн/мл. Згідно з результатами досліджень можна зробити висновки, що внутрішньом'язовий шлях введення інактивованих клітин грибів *Candida* забезпечує краще формування імунітету проти кандидозної інфекції, ніж підшкірний шлях введення. Саме тому для подальших досліджень було обрано внутрішньом'язове введення інактивованих клітин грибів *Candida*.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Апанасенко Н. А. Видовой состав возбудителей поверхностного кандидоза плотоядных животных / Н. А. Апанасенко, А. М. Литвинов // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2010. – № 1. – С. 146.
2. Еликова Н. Н. Антигенная активность и иммуногенность клеток *Candida albicans*, обработанных перйодатом натрия / Н. Н. Еликова, Г. А. Витовская // Микол. и фитопатол. – 1991. – Т. 25, № 5. – С. 308-403.
3. Жукова Н. В. Теоретические основы иммунопрофилактики / Н. В. Жукова, И. М. Кривошеева, Н. В. Мирошниченко // ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского». – 2012. – С. 31-34.
4. Зеленова Е. Г. Кандиды: экология, морфофункциональные особенности и факторы патогенности / Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Т. В. Махрова // Нижегородский мед. журн. – 2002. – № 1. – С. 73-84.
5. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии. 2-е изд. – М.: Медицина, 1971. – 539 с.
6. Чоп'як В. В. Специфічна імунопрофілактика сьгодні і завтра: [навч. посіб.] / В. В. Чоп'як, Г. О. Потьомкина. – Львів, 2011. – 88 с.
7. Шарафутдинов А. М. Технология получения протективного антигена гриба *Candida albicans* и возможность его практического применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Ульяновская гос. с.-х. акад. – Ульяновск, 2001. – 23 с.
8. Anaul Kabir M. Candida infections and their prevention / M. Anaul Kabir, Zulfiqar Ahmad // ISRN Preventive Medicine. – 2013. – P. 1-13.
9. Antifungal agents: mode of action in yeast cells / A. J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P. A. Ezkurra, G. Quindós // Revista Espanola de Quimioterapia. – 2006. – Vol. 19, № 2. – P. 130-139.
10. Banerjee U. Effect of immunization with formalin killed cells in complete Freund's adjuvant in experimental candidosis / U. Banerjee, L. N. Mohapatra, R. Kumar // Med. Res. – 1985. – Vol. 81. – P. 454-458.
11. Brown-Thomsen I. Reserve variations between *Candida albicans* and *Candida tropicalis* / I. Brown-

- Thomsen // Actapathol. Etnicrobiol. Scand. – 1966. – Vol. 66, № 1. – P. 143-144.
12. Cutler J. E. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold / J. E. Cutler, G. S. Deepe, B. S. Klein // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – № 5. – P. 13-28.
13. Giger D. K. Experimental murine candidiasis: pathological and immune responses to cutaneous inoculation with *Candida albicans* / D. K. Giger, J. E. Do-mer, J. T. McQuitty // Infect. Immunol. – 1978. – № 19. – P. 496-509.
14. Pfaller M. A. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends / M. A. Pfaller, P. G. Pappas, J. R. Wingard // Clin. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 43, № 1. – P. 3-14.
15. Segal E. Fungal vaccines and immunotherapy / E. Segal, D. Elad // Mycol. Med. – 2006. – № 16. – P. 134-151.
16. Sims C.R. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients / C. R. Sims, L. Ostrosky-Zeichner, J. H. Rex // Arch. Med. Res. – 2005. – № 36. – P. 660-71.

УДК 616.992.282:615.371:615.015.33**Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников****ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* И *CANDIDA TROPICALIS* ОТДЕЛЬНО ФОРМИРОВАТЬ ИММУНИТЕТ ПРОТИВ КАНДИДОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

В данной статье изучены иммуногенные свойства инактивированных клеток грибов *Candida albicans* та *Candida tropicalis* отдельно. В результате проведенных исследований установлено, что иммунизирующая доза, которая обеспечивает напряженный иммунитет на протяжении 3 месяцев, при внутримышечном введении по 0,2 мл инактивированных клеток грибов *Candida albicans* и инактивированных клеток грибов *Candida tropicalis* содержит соответственно 4 млн/мл и 5 млн/мл. Установлено, что внутримышечный способ введения инактивированных клеток грибов *Candida* более эффективно обеспечивает формирование иммунитета против кандидозной инфекции, чем подкожный метод введения.

Ключевые слова: кандидамикоз; антиген; вакцина; иммунитет; инактивированные клетки

UDC 616.992.282:615.371:615.015.33**M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov****DETERMINING THE ABILITY OF THE INACTIVATED CELLS OF FUNGAL *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA TROPICALIS* AWAY FORM IMMUNITY AGAINST *CANDIDA* INFECTION**

The immunogenic properties of inactivated fungal cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* have been studied separately. The studies found that immunizing dose that provides the immunity among 3 months after intramuscular administration of 0,2 ml of inactivated *Candida albicans* fungal cells contain 4 mln/ml and cells inactivated fungi *Candida tropicalis* contain 5 mln/ml. It has been established that the intramuscular administration of inactivated cells of *Candida* provides more efficient formation of immunity against *Candida* infections than the subcutaneous method of administration.

Key words: candidiasis; antigen; vaccine; immunity inactivated cells

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

Тел. (057) 706-30-99.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:

05.03.2014 р.

Фармакологія

Рецензенти рубрики:

Дроговоз С. М.,
д. мед. н., професор

Щокіна К. Г.,
д. фарм. н., професор

Загайко А. Л.,
д. біол. н., професор

Набока О. І.,
д. біол. н., професор



УДК 615.322: 616.697: 616.65

Г. В. Зайченко, Ю. О. Тацький, В. А. Коротков, О. В. Андріяненков, О. О. Іванова

Національний фармацевтичний університет

ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ СУПОЗИТОРІЇВ З ОЛІЙНИМ ЕКСТРАКТОМ МАКЛЮРИ НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ

У статті наведені результати експериментального дослідження простатопротекторної дії супозиторіїв з олійним екстрактом маклюри на моделі скипидарного простатиту у щурів. Встановлено, що застосування супозиторіїв з фітоекстрактом приводить до зменшення ознак загальної та системної запальної реакції, пригнічення процесів ПОЛ, підвищення активності антиоксидантної системи, нормалізації рівня андрогенізації у щурів-самців, сприяє відновленню функціональної активності передміхурової залози. За простатопротекторною дією досліджувані супозиторії з олійним екстрактом маклюри не поступаються препарату порівняння простапланту форте дозою 35 мг/кг.

Ключові слова: передміхурова залоза; скипидарний простатит; олійний екстракт маклюри; самці-щури

ВСТУП

Хронічний простатит (ХП) залишається одним з найбільш поширених, важких для діагностики та лікування захворювань в урологічній практиці. Ця патологія зустрічається в усіх вікових та етнічних групах, є найчастішим захворюванням у чоловіків до 50 років, посідає третє за частотою розвитку місце у пацієнтів після 50 років, поступаючись лише доброякісній гіпертрофії передміхурової залози (ДГПЗ) та раку простати [1, 5, 8, 10].

Актуальність проблеми ХП пов'язана з його високою розповсюдженістю, стійким перебігом, незадоволеністю результатами лікування та частими рецидивами. Висока соціальна значущість захворювання обумовлена переважним ураженням осіб молодого віку (від 20 до 45 років), негативним впливом на статеву, репродуктивну функції та психоемоційну сферу, суттєвим погіршенням якості життя чоловіків [1, 10].

Незважаючи на широке застосування лікарських засобів різних фармакологічних груп, ефективність фармакотерапії ХП не перевищує 60 %. У схемах консервативного лікування ХП значну частку складають препарати на основі рослинної сировини. Популярність простатопротекторів природного походження обумовлена їх достатньою ефективністю при мінімальному ризику розвитку побічних реакцій, високою довірою пацієнтів, доброю переносимістю, сприятливим фармакоекономічним профілем [4, 6].

Огляд ринку простатопротекторів рослинного походження в Україні свідчить про переважну більшість імпорتنих лікарських засобів, яка складає 75 %, переважно у вигляді капсул і таблеток. Доцільність розробки нового фітопрепарату у вигляді ректальної лікарської форми пояснюється більшою біодоступністю лікарських речовин при ректальному введенні, зменшенням навантаження на ШКТ та печінку хворих, оскільки лікування хронічного простатиту не передбачає монотерапію, маскуванням неприємного запаху інгредієнтів [5, 6].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом нашого дослідження стали ректальні супозиторії, які містили 126 мг олійного екстракту маклюри (МЕМ), технологію яких розроблено на кафедрі промислової технології ліків НФаУ під керівництвом проф. Є. В. Гладуха за участі доц. О. С. Кухтенко.

Фармакологічне дослідження простатопротекторної дії супозиторіїв з МЕМ у дозі 380 мг/кг проводили на моделі експериментального скипидарного простатиту у порівнянні з фітопрепаратом іноземного виробництва простаплантом форте, який застосовували дозою 35 мг/кг.

Досліди проводили на білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях масою 290-320 г. Скипидарний простатит викликали ректальним введенням тваринам 1 мл суміші скипидару з димексидом у співвідношенні 3:1. Суміш вводили два рази з інтервалом в одну добу. Димексид використовували як пенетрант,

© Колектив авторів, 2014

Таблиця 1

**ВПЛИВ СУПОЗИТОРІЇВ З МЕМ НА КЛІНІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ
НА МОДЕЛІ СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ, $\bar{X} \pm S_x$**

Група тварин, n=6	Показники		
	лейкоцити, $10^9/\text{л}$	ШОЕ, мм/час	рівень IL-1 β , пг/мл
8-ма доба дослідження			
ІК	10,67 \pm 0,80	8,23 \pm 0,60	–
КП	21,17 \pm 1,08*	18,27 \pm 0,56*	–
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	11,67 \pm 0,88**	11,02 \pm 0,64**	–
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	12,00 \pm 0,58**	10,48 \pm 0,44**	–
13-та доба дослідження			
ІК	11,17 \pm 0,87	8,15 \pm 0,52	11,23 \pm 1,61
КП	22,50 \pm 1,43*	18,68 \pm 0,62*	48,50 \pm 3,80*
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	11,67 \pm 0,67**	10,63 \pm 0,68**	10,93 \pm 1,64**
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	11,33 \pm 0,49**	9,78 \pm 0,19**	11,83 \pm 1,71**

* – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи ІК, $p < 0,001$;

** – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи КП, $p < 0,001$.

що підсилював проникність гістологічного бар'єру з метою більш активної абсорбції скипидару [9].

Тварини були розподілені на 4 експериментальні групи по 6 щурів у кожній групі: І – інтактні тварини; ІІ – тварини з нелікованим модельним простатитом; ІІІ – тварини, яким вводили ректальні супозиторії з МЕМ дозою 380 мг/кг; ІV – тварини, яким після розвитку простатиту вводили препарат порівняння простаплант форте дозою 35 мг/кг.

Супозиторії вводили ректально, простаплант форте – внутрішньошлунково один раз на добу, починаючи з четвертого дня і до кінця експерименту (13-та доба). Дозу препарату порівняння для щурів розраховували за допомогою коефіцієнта видової стійкості Ю. Р. Риболовлева і співавт., виходячи з добових доз для людини [2, 7].

Оцінку простатопротекторної дії проводили з урахуванням даних клінічних показників периферійної крові (рівня лейкоцитозу, швидкості осідання еритроцитів), даних біохімічного аналізу сироватки крові, а саме коливань маркерів запалення (цитокіну IL-1 β), вмісту продуктів мембранодеструкції (відновленого глутатіону, ТБК-активних продуктів, кислоти фосфатази) як у сироватці крові, так і в гомогенаті простати, вмісту статевих гормонів – тестостерону (Тс), естрадіолу (Е₂), дигідротестостерону (ДГТ), а також змін коефіцієнту маси (КМ) ПЗ, показників мікроскопічного вивчення відбитків секрету ПЗ. Останні свідчили про функціональну активність простати і щільно пов'язаний з цим рівень андрогенної насиченості організму [9, 11].

Характер та ступінь кристалізації секрету простати оцінювали в балах за наступною шкалою: «0» балів – вкрай низький рівень андрогенізації, аморфна структура секрету, кристали повністю відсутні; «1» бал – низький рівень андрогенізації, переважно аморфна структура, але мають місце окремі кристали у вигляді безформних та потовщених стебел; «2» бали – помір-

ний рівень андрогенізації, виразні порушення кристалізації (витончення гілок кристалів, відсутність чітких поперечних відгалужень); «3» бали – достатній рівень андрогенізації, картина відповідає нормі тільки в окремих ділянках, спостерігається деформація кристалів; «4» бали – високий рівень андрогенної насиченості, типовий рисунок феномену «листя папороті» [9].

Для проведення статистичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм «Statistica 6.0» [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток скипидарного простатиту характеризувався наростанням загальнозапальних реакцій, які супроводжувалися лейкоцитозом, підвищенням ШОЕ на 8-й та 13-й день експерименту (табл. 1). Показники, які вивчалися, у групі тварин з нелікованою патологією достовірно збільшувалися в ці терміни спостереження відповідно до показників інтактних тварин. Так, збільшувались ШОЕ та кількість лейкоцитів у 2 рази.

У групі тварин, які на фоні патології отримували свічки з МЕМ, на 8-му добу експерименту спостерігали достовірне зменшення показника ШОЕ в 1,7 рази і показника кількості лейкоцитів в 1,8 рази, що свідчило про зменшення інтенсивності системної запальної реакції у тварин. Така динаміка спостерігалася і на 13-ту добу експерименту. В цей період дослідження прослідковували подальше зменшення рівня ШОЕ в 1,9 рази, кількості лейкоцитів у 1,8 рази порівняно з показниками тварин групи інтактного контролю.

Разом з тим, в периферичній крові тварин на 13-у добу експерименту спостерігалася достовірне збільшення вмісту маркера специфічного імунного запалення IL-1 β (в 4,3 рази) щодо показників тварин групи інтактного контролю. Це свідчило про ак-

Таблиця 2

**ЗМІНИ КОЕФІЦІЄНТА МАСИ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ
НА МОДЕЛІ СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ, $\bar{X} \pm S_x$**

Група тварин, n=6	Маса до експерименту	Маса в кінці експерименту	Маса ПЗ	КМ ПЗ
ІК	298,33±2,11	324,17±3,00	2,125±0,072	0,650±0,024
КП	310,83±4,17	298,33±4,77	1,058±0,033*	0,355±0,008*
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	313,33±3,57	300,83±5,83	1,333±0,077*/**	0,443±0,023**
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	312,50±4,79	299,17±3,27	1,242±0,040*/**	0,415±0,010**

* – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи ІК, $p < 0,001$;

** – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи КП, $p < 0,005$.

тивне залучення імунної системи (активованих макрофагів) у розвиток патологічного процесу в тканині ПЗ (табл. 1).

Лікувальне введення супозиторіїв з МЕМ та препарату порівняння простапланту форте дозою 35 мг/кг з 3-го по 13-й день експерименту приводило до зменшення виразності та інтенсивності запального процесу в простаті.

Розвиток патологічного процесу провокував структурно-функціональні порушення в ПЗ. У тварин з нелікованою патологією було зареєстровано достовірне зменшення коефіцієнта маси (КМ) ПЖ на 46 % по відношенню до тварин групи інтактного контролю (табл. 2). Зазначені зміни напевно були пов'язані з загибеллю значної кількості епітеліоцитів та як наслідок призвели до зниження функціональної і секретотвірної функції залози.

Введення супозиторіїв з МЕМ та простапланту форте супроводжувалося збільшенням абсолютної та відносної маси ПЗ на 20 % і 15 % відповідно, однак цей показник у лікованих самців так і не досягав значень показників тварин групи інтактного контролю.

Доказом альтерації ПЗ стало достовірне підвищення активності простатоспецифічного ферменту КФ у сироватці крові в 2,6 рази з одночасним зниженням її активності в гомогенаті простати в 1,7 рази (табл. 3). Останнє підтверджувало розвиток мембранодеструкції, підвищення проникності мембран ацинусів ПЗ та вихід простатоспецифічного ферменту в кров. Патологічний процес супроводжувався активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зниженням антиоксидантного захисту організму тва-

рин, про що свідчило достовірне збільшення вмісту ТБК-АП у сироватці крові в 1,5 рази, ДК у 4,8 рази та статистично значуще зменшення рівня ВГ у 2 рази (табл. 4). Аналогічні зміни прооксидантно/антиоксидантного захисту спостерігалися і в гомогенаті органу.

Лікувальне введення супозиторіїв з МЕМ сприяло нормалізації вмісту КФ у сироватці крові та гомогенаті ПЗ, про що свідчила відсутність достовірних відмінностей досліджуваних показників відносно групи тварин інтактного контролю. Крім того, спостерігали достовірне гальмування процесів ПОЛ і нормалізація показників ТБК-АП, ДК. Разом з тим відзначалося підвищення активності антиоксидантного захисту, яке верифікувалося збільшенням вмісту ВГ як у сироватці крові, так і в гомогенаті простати до значень показників здорових тварин. Отримані експериментальні результати свідчили про здатність досліджуваних фітопрепаратів стабілізувати мембрани клітин простатичного епітелію ацинусів, зменшувати інтенсивність запалення та пошкодження ПЗ (табл. 3). За своєю ефективністю супозиторії з МЕМ не поступалися препарату порівняння простапланту форте за здатністю відновлювати прооксидантно/антиоксидантний баланс організму тварин, гальмувати процеси мембранодеструкції та запалення у щурів зі скипидарним простатитом.

Вищезазначені результати обумовлені, напевно, наявними серед БАР МЕМ флавоноїдів, тритерпенів, стероїдів, поліненасичених жирних кислот, яким притаманна виражена протизапальна, мембранопротекторна, антиоксидантна дія (Havsteen A., 2002, Rathee P., Rathee S., 2005).

Таблиця 3

**ВПЛИВ СУПОЗИТОРІЇВ З МЕМ НА АКТИВНІСТЬ КИСЛОЇ ФОСФАТАЗИ
НА МОДЕЛІ СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ, $\bar{X} \pm S_x$**

Група тварин, n=6	ІК	КП	П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг
Сироватка крові КФ, мкмоль/л*хв	16,34±0,37	42,67±1,12*	21,12±0,55*/**	19,98±0,61*/**
Гомогенат простати КФ, мкмоль/г*хв	22,06±1,24	12,79±0,64*	18,75±0,65**	18,84±0,44**

* – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи ІК, $p < 0,001$;

** – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи КП, $p < 0,001$.

Таблиця 4

**ВПЛИВ СВИЧОК З МЕМ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО/АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ НА МОДЕЛІ СКІПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ, $\bar{X} \pm S_x$**

Група тварин, n=6	ТБК, ммоль/л	ДК, ммоль/л	ВГ, ммоль/л
Сироватка крові			
ІК	0,32±0,02	0,037±0,004	28,08±0,73
КП	0,49±0,03*	0,178±0,015*	13,68±0,47*
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	0,33±0,04**	0,052±0,004**	24,98±1,11**
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	0,34±0,03**	0,038±0,003**	28,08±1,46**
Гомогенат простати			
ІК	30,98±2,28	0,97±0,62	22,06±1,24
КП	68,59±1,65*	2,92±0,49*	15,68±0,43*
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	31,62±2,14**	1,01±0,62	19,87±0,82**
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	30,34±1,80**	0,95±0,58**	24,07±0,98**

* – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи ІК, $p < 0,001$;

** – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи КП, $p < 0,001$.

Динаміка змін вмісту Тс, E_2 , ДГТ відображає функціональний стан репродуктивної функції самців. У групі тварин контрольної патології на фоні порушень в ПЗ поряд із зменшенням КМ простати спостерігалася достовірне зниження рівня Тс в периферійній крові в 1,7 рази, ДГТ в 2,7 рази по відношенню до показників тварин групи інтактного контролю (табл. 5). Перебіг модельної патології не супроводжувався достовірними змінами рівня E_2 , що, мабуть, пов'язано з відсутністю впливу флогогену на центральні механізми гормональної регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи.

Разом з тим зниження рівня активного метаболіту Тс – ДГТ свідчило про порушення гонадопростатичних зв'язків, зниження активності 5- α -редуктази при збереженні активності ароматази. Введення супозиторіїв з МЕМ у дозі 380 мг/кг дозволило нормалізувати рівень Тс та вміст ДГТ у сироватці крові. Такий ефект може бути пояснений відновленням гонадопростатичних зв'язків, посиленням активності 5- α -редуктази, нормалізацією андрогенної насиченості організму тварин. Введення препарату порівняння простапланту форте в дозі 35 мг/кг також приводило до підвищення показника вмісту Тс і нормалізації рівня ДГТ.

За ефективністю впливу на сироватковий рівень статевих гормонів у самців щурів на моделі скипидарного простатиту супозиторії з МЕМ не поступалися препарату порівняння простапланту форте.

Секретоутворююча функція ПЗ контролюється андрогенами. Тому коливання їх вмісту віддзеркалюються якісними та кількісними змінами кристалографічних відбитків ПЗ на предметному склі одразу ж після вилучення органу.

Тип кристалізації секрету ПЗ інтактних щурів становив 3,2 бали, кристали секрету мали вигляд типового феномену «листя папороті», що відповідало нормальному рівню андрогенізації організму та корелювало з динамікою Тс в нашому експерименті (рис. 1а).

Запальний процес, що виникав у залозі щурів після введення скипидару, спричиняв виразні зміни структури: бокові гілки кристалів були скорочені, чисельність їх зменшена, кут відходу гілочок кристалів від основного стебла збільшений. Часто гілки кристалів були відсутні, стебла потовщені. Такий стан секрету оцінювався у середньому по групі у 2,25 бали, що свідчило про зменшення андрогенної насиченості організму (рис. 1б).

Після лікування тварин екстрактом маклюри виявлено, що у більшості щурів характер секрету ПЗ від-

Таблиця 5

**ВПЛИВ СВИЧОК З МЕМ НА ВМІСТ ТЕСТОСТЕРОНУ, ЕСТРАДІОЛУ, ДИГІДРОТЕСТОСТЕРОНУ
НА МОДЕЛІ СКІПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ, $\bar{X} \pm S_x$**

Група тварин, n=6	Вміст Тс, нмоль/л	Вміст E_2 , нмоль/л	Вміст ДГТ, пмоль/л	Співвідношення Тс/ E_2	Співвідношення ДГТ/Тс
ІК	27,59±3,14	0,218±0,011	604,28±91,15	126,56±17,15	0,022±0,0015
КП	15,70±2,13*	0,207±0,070	241,70±41,35*	75,85±3,98*	0,015±0,016*
П + Супозиторії з МЕМ, 380 мг/кг	29,15±3,99**	0,240±0,019	588,22±72,78**	121,46±11,05**	0,020±0,007**
П + Простаплант форте, 35 мг/кг	29,12±2,02**	0,233±0,019	530,13±66,30**	124,98±10,24**	0,0181±0,0045**

* – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи ІК, $p < 0,005$;

** – відхилення показника вірогідні відносно тварин групи КП, $p < 0,005$.

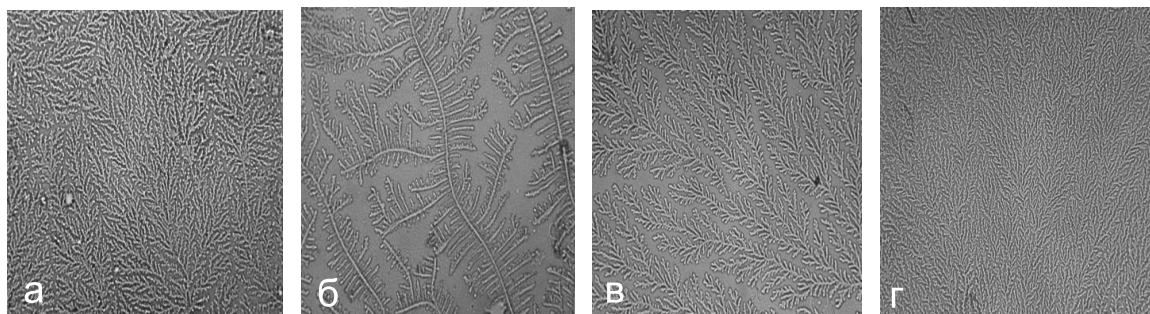


Рис. 1. Кристалограми секрету передміхурової залози: а – інтактного щура, типовий феномен «листя папороті», андрогенна насиченість організму у межах норми; б – щура групи контрольної патології, після введення скипидару, андрогенна насиченість організму знижена; в – щура, якому вводили свічки з МЕМ на фоні змодельованої патології, нормальний рисунок «листя папороті», андрогенна насиченість організму відповідає нормі; г – щура, якому вводили простаплант форте на фоні простатиту, нормальний рисунок кристалів, андрогенна насиченість організму достатня. Відбитки секрету. x200.

новився до норми. У решти тварин кристалографія відображала зниження андрогенної насиченості організму тварин. В цілому по групі оцінка становила 2,72 бали (рис. 1в).

Поряд з цим застосування препарату порівняння простапланту форте дозою 35 мг/кг дозволило відновити рівень андрогенної насиченості організму тварин (практично до рівня інтактних тварин). Лише у двох щурів він залишався на рівні контрольної патології. Середня оцінка по групі становила 2,75 бали (рис. 1г).

Результати вивчення характеру кристалізації простатичного секрету свідчили про здатність БАР маклюри нормалізувати гонадо-простатичні зв'язки, відновлювати чутливість простатичного епітелію до стимулюючого впливу андрогенів. Результатом такої дії є відновлення андрогенної рецепції, нормалізація процесів утворення стероїдних гормонів, покращення секреторної функції ПЗ.

ВИСНОВКИ

1. Дворазове ректальне введення скипидару з димексидом викликає розвиток простатиту, який характеризується системними та локальними запальними проявами патологічного процесу, глибокими структурно-функціональними та гормональними порушеннями у щурів.
2. Введення супозиторіїв з олійним екстрактом маклюри у дозі 380 мг/кг у лікувальному режимі тваринам з модельною патологією протягом 10 діб приводило до зменшення проявів системного запального процесу, яке проявлялося у зниженні рівня лейкоцитозу, ШОЕ та вмісту IL-1 β .
3. На моделі експериментального простатиту досліджувані супозиторії виявляли мембраностабілізуючу та антиоксидантну дію, яка верифікувалася зниженням активності простатоспецифічного ферменту кислої фосфатази, зменшенням рівня продуктів пероксидації ліпідів клітин-

них мембран (ТБК-АП та ДК) у сироватці крові, підвищенням активності відновленого глутатіону як головного компонента ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту.

4. Під впливом супозиторіїв з олійним екстрактом маклюри, які вводилися на фоні простатиту, нормалізувався коефіцієнт маси передміхурової залози, що свідчило про гальмування процесів деструкції.
5. Лікувальна дія супозиторіїв з екстрактом маклюри супроводжувалася повним відновленням функціональної активності передміхурової залози, що підтверджувалося підвищенням вмісту статевих гормонів (Тс та ДГТ) та рівня андрогенної насиченості організму тварин.
6. За виразністю простатопротекторної дії фітосупозиторії в дозі 380 мг/кг не поступалися ефективності препарату порівняння – простапланту форте дозою 35 мг/кг.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Вартапетов Б. А. Предстательная железа и возрастные нарушения половой деятельности / Б. А. Вартапетов, А. Н. Демченко. – К.: Здоров'я, 1975. – 214 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Видавничий дім «Авіценна», 2001. – 528 с.
3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К., 2001. – 320 с.
4. Мирошников В. М. Лекарственные растения и препараты растительного происхождения в урологии: [учеб. пособие] / В. М. Мирошников. – М.: МЕДпресс – информ, 2005. – 240 с.
5. Практическая урология: [руковод. для врачей] / Под ред. П. В. Глыбочко, Ю. Г. Аляева. – М.: Медфорум, 2012. – 352 с.

6. Рациональная фармакотерапия в урологии: [руковод. для практикующих врачей] / Под ред. Н. А. Лопаткина. – М.: Литтера, 2006. – 824 с.
7. Рыболовлев Ю. Р., Рыболовлев Р. С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Докл. АН СССР. – 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513-1516.
8. Тиктинский О. Л. Андрология / О. Л. Тиктинский, С. Н. Калинина, В. В. Михайличенко. – М.: ООО «МедИнформАгентство», 2010. – 576 с.
9. Яковлева Л. В. Доклінічне вивчення лікарських засобів, призначених для лікування простатитів: [метод. рекомендації] / [Л. В. Яковлева, Г. В. Зайченко, Ю. Б. Лар'яновська та ін.]. – К., 2005. – 35 с.
10. Hedelin H. The chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and pain catastrophizing: A vicious combination // Scand. J. Urol. Nephrol. – 2012. – Mar. 27.
11. Nadermann E. Hexosamine content of normal and pathological human sperm / E. Nadermann, H. P. Nissen, H. W. Kreysel // Andrologia. – 1983. – Nov. – Dec. – № 15 (6). – P. 655-658.

УДК 615.322: 616.697: 616.65**А. В. Зайченко, Ю. А. Тацкий, В. А. Коротков, А. В. Андрияненок, А. А. Иванова****ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СУППОЗИТОРИЕВ С МАСЛЯНЫМ ЭКСТРАКТОМ МАКЛЮРЫ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТА У КРЫС**

В статье приведены результаты исследования простатопротекторного действия суппозиториев с масляным экстрактом маклюры (МЭМ) в дозе 380 мг/кг на модели экспериментального скипидарного простатита у крыс. Установлено, что применение суппозиториев с МЭМ приводит к уменьшению системных и локальных воспалительных реакций, способствует восстановлению функциональной активности предстательной железы, угнетению процессов ПОЛ, повышению активности антиоксидантной системы, нормализации уровня андрогенизации у крыс-самцов. По выразительности простатопротекторного действия свечи с МЭМ не уступают лечебному действию препарата сравнения простапланта форте.

Ключевые слова: предстательная железа; скипидарный простатит; масляный экстракт маклюры; самцы крыс

UDC 615.322: 616.697: 616.65**A. V. Zaychenko, Yu. A. Tatskiy, V. A. Korotkov, A. V. Andriyanenkov, A. A. Ivanova****PHARMACOLOGICAL STUDY OF SUPPOSITORIES WITH OIL EXTRACT OF MACLURA POMIFERA ON THE EXPERIMENTAL MODEL TURPENTINE PROSTATITIS IN RATS**

The results of the experimental study of prostate protective action of suppositories with oil extract *Maclura pomifera* on the model of turpentine prostatitis in rats have been suggested. It is found that the use of suppositories with phytoextracts results in reducing the signs of general and systemic inflammatory responses, inhibition of lipid peroxidation processes, increasing of activity of antioxidant system, normalization of androgenization's level of male rats, recovering of the functional activity of the prostate. Suppositories with oil extract of *Maclura pomifera* doesn't concede in protective action to prostatic forte of dose 35 mg/kg.

Key words: prostate; prostatitis turpentine; oil extract of *Maclura pomifera*; male-rats

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Тел. (0572) 67-93-63.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:
03.03.2014 р.

УДК 615.276:547.583.5:547.459.5

М. В. ЗУПАНЕЦЬ, С. М. ДРОГОВОЗ, С. Г. ІСАЄВ, А. О. ДЕВЯТКІНА

Національний фармацевтичний університет

СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМОНІЄВИХ СОЛЕЙ ТА D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМІДІВ 3-ОКСАМОЇЛЗАМІЩЕНИХ N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ

Проведено синтез нових речовин D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот та D-(+)-глюкозиламідів 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот. Будова та чистота досліджуваних речовин підтверджені сучасними фізико-хімічними методами елементного, ІЧ-, ПМР-спектрального, хроматографічного аналізу та якісними реакціями. Експериментально встановлено, що досліджувані речовини в еквімолекулярних дозах по відношенню до натрію диклофенаку проявляють протизапальну активність. Встановлено ряд закономірностей зв'язку «будова-активність» у новосинтезованих сполуках. Серед останніх спостерігається феномен фармакодинамічного синергізму, що проявлявся взаємопотенціюванням протизапальних ефектів глюкозаміну та N-фенілантранілової кислоти. Дані досліджень свідчать про перспективність подальшого вивчення цих речовин як майбутніх протизапальних препаратів.

Ключові слова: артрит; глюкозамін; N-фенілантранілова кислота; нестероїдні протизапальні препарати

ВСТУП

На теперішній день артрит – це одна з найпоширеніших хвороб, що вражає суглоби. Згідно із статистикою на неї страждає кожен сотий житель Землі, переважно жінки у віці старше 30 років. Хвороба скорочує життя приблизно на 10 років [3].

Основою традиційної протизапальної терапії є нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), які тимчасово знижують інтенсивність проявів симптомів захворювання (запалення, біль, обмеження рухливості) [2]. На фармацевтичному ринку світу кількість НПЗП нараховує близько 110 оригінальних препаратів та більше ніж 550 торговельних назв, які відрізняються за хімічною будовою, фармакологічною дією та особливостями застосування [4, 7]. Сучасні НПЗП у більшості своїй мають ряд побічних ефектів, що обмежують їх застосування [6, 9].

Для розробки оригінальних субстанцій з протизапальними властивостями і принципово новими механізмами дії вчені часто використовують модифікації відомих субстанцій з новими властивостями. Глюкозамін (ГА) є найбільш поширеним природним аміноцукром, який входить до складу глікозаміногліканів, полісахаридів, глікопротеїнів у структури біологічних мембран, матриксу суглобного хряща, міжклітинної речовини та інші елементи сполучно-

тканинного походження [8]. Тому було доцільно продовжити пошук у ряду похідних солей глюкозаміну (ГА) 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот як сполук з протизапальною дією.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджувані субстанції синтезовані на кафедрі медичної хімії Національного фармацевтичного університету професором С. Г. Ісаєвим та іншими.

Синтез похідних D-(+)-глюкозиламідів та D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот проводили шляхом взаємодії 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот з основою D-глюкозаміну, одержаного в результаті дії на гідрохлорид D-глюкозаміну еквімолекулярної кількості металічного натрію в розчині метанолу [5]. Кристалізація солей (I-IX) проходить на холоді протягом 8-12 годин. Будову речовин підтверджено даними елементного аналізу, методом ІЧ-спектроскопії, індивідуальність – методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Катіонно-аніонний характер солі (I-IX) підтверджено наявністю в ІЧ-спектрах смуг поглинання в межах 1632-1615 cm^{-1} (ν), 1440-1428 cm^{-1} (N), та 2930-2918 cm^{-1} (N).

Було вивчено протизапальну активність 13 сполук: 6 похідних D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот (рис. 1) та 7 похідних D-(+)-глюкозиламідів 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот (рис. 2). У досліді

© Зупанець М. В., Дроговоз С. М., Ісаєв С. Г.,
Девяткіна А. О., 2014

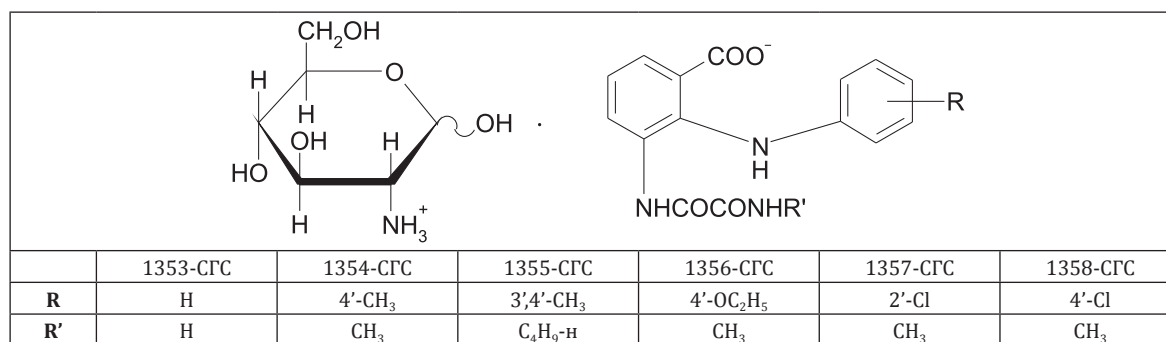


Рис. 1. Хімічна структура похідних D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот.

використано 96 білих нелінійних мишей масою 18-22 г, які були розподілені на 13 дослідних, одну контрольну групу та дві групи з препаратами порівняння (вольтарен «Novartis Pharma S.A.S.», табл. по 25 мг та Мефенамінова кислота – Дарниця «ЗАТ ФФ «Дарниця», табл. по 500 мг).

Речовини розчиняли в дистильованій воді та вводили внутрішньошлунково в еквімолекулярній дозі по відношенню до 8 мг/кг натрію диклофенаку. Кожну речовину досліджували на 6 тваринах, які мали приблизно однакову масу тіла. Через 1 годину після введення досліджуваної речовини викликали асептично-ексудативне запалення шляхом субплантарного введення у праву задню лапу 0,05 мл 1 % розчину карагеніну [1]. З цією метою було використано λ-карагенін виробництва «Fluka» (Швейцарія). Через 3 години після цього тварин виводили з дослідження шляхом декапітації під ефірним наркозом та проводили ампутацію задніх кінцівок на рівні тазостегнового суглоба. Протизапальну активність оцінювали у відсотках за ступенем зменшення набряку лапи у тварин, які отримували дослідні речовини, в порівнянні з тваринами групи контрольної патології та розраховували за формулою.

Результати дослідження також оброблялися методом математичної статистики з використанням t-критерію Стюдента, а значущими вважали результати $P \leq 0,05$ [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень протизапальної активності різних за кількісним складом композицій на основі похідних D-(+)-глюкозиламідів та D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот, наведених у таблиці.

Як видно з таблиці, найбільш перспективними з групи похідних D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот є речовина I (1353-СГС), так як вона проявила протизапальну активність на рівні 33,73 %, що перевищує мефенамінову кислоту. Слід відзначити, що введення в структуру N-фенілантранілових кислот глюкозаміну підвищує протизапальну дію, що узгоджується з попередніми дослідженнями [2, 3, 4]. Порівнюючи антиексудативний ефект з хімічною структурою серед похідних D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот (шифри СГС 1353-1358), слід зазначити, що їх активність зале-

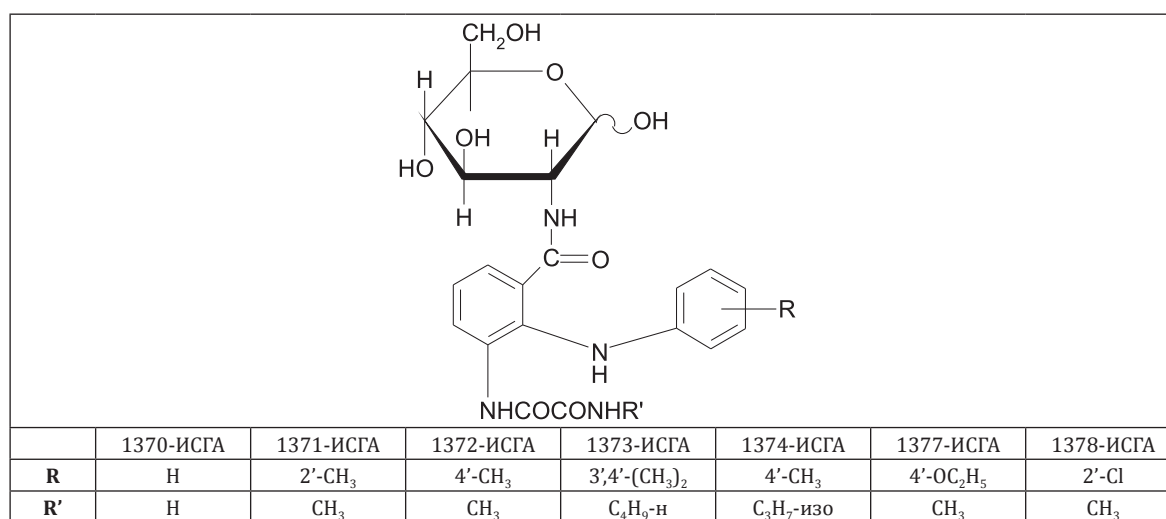


Рис. 2. Хімічна структура похідних D-(+)-глюкозиламідів 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот.

Таблиця

**ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ
D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМОНІЄВИХ СОЛЕЙ
3-ОКСАМОІЛЗАМІЩЕНИХ
N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ**

Сполука	Шифр речовини	Протизапальна активність	
		доза, мг/кг	%
I	1353-СГС	11,95*	33,73
II	1354-СГС	12,73*	0
III	1355-СГС	14,77*	28,11
IV	1356-СГС	13,48*	1,14
V	1357-СГС	13,25*	1,81
VI	1358-СГС	13,25*	18,89
VII	1370-ИСГА	11,57*	1,46
VIII	1371-ИСГА	12,28*	5,06
IX	1372-ИСГА	12,28*	12,45
X	1373-ИСГА	14,47*	15,46
XI	1374-ИСГА	12,98*	19,68
XII	1377-ИСГА	13,03*	3,01
XIII	1378-ИСГА	12,79*	18,27
Натрію диклофенак		8,00	54,0
Мефенамінова кислота		100,00	30,0

* – речовини, еквімолекулярні натрію диклофенаку 8 мг/кг.

жить від природи замісника. З замісником гідрогену в структурі дані хімічні речовини мають більш виражені протизапальні властивості у своїй групі. Введення замісника у четвертому положенні (4'-CH₃; 4'-OC₂H₅) ароматичного кільця та у другому – хлору призводить до втрати антиексудативних властивостей (1354-, 1356-, 1357-СГС). Але при введенні замісника хлору у четверте положення можемо спостерігати протизапальну активність (1358-СГС).

З групи похідних D-(+)-глюкозиламідів 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот найбільш перспективними є речовина XI (1374-ИСГА), яка проявляє протизапальну активність на рівні 19,68 %. З метиловим замісником (R) та замісником ізопропілу в структурі оксамоїлу (R') речовина має більш виражені протизапальні властивості у своїй групі. Але введення замісника метилу, оксіетилу у другому положенні (R) та оксамоїлу (2'-CH₃; CH₃) призводить до слабкого прояву антиексудативних властивостей (5,06 %; 3,01 %).

Всі інші речовини цієї групи за своєю антиексудативною активністю були менш активними та не перевершували за протизапальною активністю диклофенак.

ВИСНОВКИ

- Таким чином, аналіз отриманих результатів дослідження новосинтезованих 13 хімічних сполук показав, що похідні D-(+)-глюкозиламонієвих солей заміщених N-фенілантранілових кислот виявляють протизапальну активність та є перспективною групою для подальшого пошуку безпеч-

них речовин з протизапальною активністю шляхом їх більш детального вивчення та модифікації.

- У ході нашого дослідження на моделі карагенінового запалення встановлено, що найбільш активними сполуками цього дослідження є речовини I (1353-СГС), III (1355-СГС) та XI (1374-ИСГА), які проявили протизапальну активність відповідно на 33,73 %, 28,11 %, 19,68 %.
- Введення в структуру N-фенілантранілових кислот фрагменту щавлевої кислоти та солі глюкозаміну сприяє посиленню протизапального ефекту.
- За результатами вивчення антиексудативних властивостей спостерігається феномен фармакодинамічного синергізму, що проявлявся взаємопотенціюванням фармакологічних ефектів ГА та N-фенілантранілової кислоти.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
- Дрововоз С. М. Перспективы создания противовоспалительных средств на основе D-(+)-глюкозиламмониевых солей 3-оксамоилзамещенных N-фенилантраниловых кислот и экстракта листьев рябины обыкновенной / С. М. Дрововоз, М. В. Зупанец, А. В. Кононенко // Научно-производ. журн. «Разработка и регистрация лекарственных средств». – 2013. – № 2 (3). – С. 64-67.
- Зупанець М. В. Пошук протизапальних речовин серед D-(+)-глюкозиламонієвих солей заміщених 5-нітро-N-фенілантранілових кислот / М. В. Зупанець, С. М. Дроговоз, С. Г. Ісаєв, М. М. Сулейман // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 52-55.
- Зупанець М. В. Синтез та фармакологічна активність D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранілових кислот / М. В. Зупанець, С. М. Дроговоз, С. Г. Ісаєв, М. М. Сулейман // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17, № 3. – С. 38-41.
- Ісаєв С. Г. Синтез, реакційна здатність і біологічна активність похідних орто-галогенобензойних, ароматичних амінокислот та акридину: Дис. ... д-ра фарм. наук. – Х., 2008. – 357 с.
- Туляков В. О. Розробка протиартрозних препаратів з хондропротекторною, протизапальною та анальгетичною дією на основі аміноцукру глюкозаміну: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук. – Х., 2008. – 36 с.
- Туляков В. О. Фармакологічні властивості глюкозаміну: мембраностабілізуючі, протизапальні, антиоксидантні та імунотропні / В. О. Туляков, К. О. Зупанець, С. К. Шебеко // Фармакол. та лікарська токсикол. – 2009. – № 2 (9). – С. 3-8.
- Persiani S. Synovial and plasma glucosamine concentration in osteoarthritic patients following oral

crystalline glucosamine sulfate at therapeutic dose / [S. Persiani, R. Rotini, G. Trisolino et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2007. – Vol. 15. – P. 764-772.

9. Tsutomu Nakahara, Akiko Mitani, Maki Saito et al. // Vascular Pharmacol. – 2004. – Vol. 41, № 1. – P. 21-25.

УДК 615.276:547.583.5:547.459.5

М. В. Зупанец, С. М. Дроговоз, С. Г. Исаев, А. А. Девяткина

СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

И D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМИДОВ 3-ОКСАМОИЛЗАМЕЩЕННЫХ N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

Проведен синтез новых веществ D-(+)-глюкозиламмониевых солей 3-оксамоилзамещенных N-фенилантраниловых кислот и D-(+)-глюкозиламидов 3-оксамоилзамещенных N-фенилантраниловых кислот. Строение и чистота исследуемых веществ подтверждена современными физико-химическими методами элементного, ИК-, ПМР-спектрального хроматографического анализа и качественными реакциями. Экспериментально установлено, что исследуемые вещества в эквимолекулярных дозах по отношению к натрию диклофенаку проявляют противовоспалительную активность. Установлен ряд закономерностей связи «строение-активность» в новосинтезированных соединениях. Среди последних наблюдается феномен фармакодинамического синергизма, который проявлялся взаимопотенцированием противовоспалительных эффектов глюкозамина и N-фенилантраниловой кислоты. Данные исследований свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения этих веществ как будущих противовоспалительных препаратов.

Ключевые слова: артрит; глюкозамин; N-фенилантраниловая кислота; нестероидные противовоспалительные препараты

UDC 615.276:547.583.5:547.459.5

M. V. Zupanets, S. M. Drogovoz, S. G. Isaev, A. A. Devyatkina

SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF D-(+)-GLUCOSYL AMMONIUM SALTS AND D-(+)-

GLUCOSYLAMIDS 3-OXAMOIL SUBSTITUTED OF N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS

New substances of the D-(+)-glucosylammonium salts 3-oxamoilsubstituted of N-phenylanthranilic acids of D-(+)-glucosylamids 3-oxamoilsubstituted of N-phenylanthranilic acids have been synthesized. The structure and purity of substances investigated were confirmed by modern physico-chemical methods of elemental, IR-, PMR- spectral chromatographic analysis and qualitative reactions. It was established experimentally that the test substances in equimolecular doses relative to diclofenac sodium have anti-inflammatory activity. The regularities of communication "structure-activity" in newly synthesized compounds have been established. Among the last the phenomenon of pharmacodynamic synergies has been observed, which was shown as strengthening anti-inflammatory effects of glucosamine and N-phenylanthranilic acid. These researches testify the prospects of further study of these substances as future anti-inflammatory preparation.

Key words: arthritis; glucosamine; N-phenylanthranilic acid; non-steroidal anti-inflammatory preparations

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

Тел. (057) 706-30-69.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:

04.03.2014 р.

УДК 615.272.4

І. С. ЧЕКМАН, Г. А. ПОГотова, Т. Ю. НЕБЕСНА, Н. О. ГОРЧАКОВА

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця

КВАНТОВО-ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛІМАРИНУ

У роботі досліджені квантово-хімічні параметри електронної та просторової структури молекули силібіну: топологічні характеристики, заряди на атомах, локалізація граничних молекулярних орбіталей, розподіл електростатичного потенціалу в молекулі, енергетичні параметри.

Ключові слова: силімарин; силібін; гепатопротектор; квантова фармакологія

ВСТУП

Силімарин – стандартизований рослинний екстракт, отриманий з насіння розторопші плямистої (лат. *Silybum marianum*). Силімарин застосовується в якості гепатопротекторного препарату для профілактики і лікування захворювань печінки різної етіології [3, 8]. Основним компонентом цього екстракту є силібін (рис. 1), але силімарин також містить інші флаволідгани (силідіанін, силікрістин, ізосилібін, дигідросилібін), флавоноїди (таксифолін і кверцетин) та інші поліфенольні сполуки. Силібін представлений в рослинах як суміш двох діастереомерів в еквімолярному співвідношенні [15].

Флаволідгани з силімарину мають антирадикальні властивості, зменшують перекисне окиснення ліпідів мембран та ліпопротеїнів низької щільності. Антиоксидантні властивості силімарину корелюють з іншими видами біологічної активності цієї сполуки, а саме здатністю впливати на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що контролюють ріст та диференціацію клітин, процеси апоптозу [12, 15]. Силімарин також проявляє протизапальну, протифіброзну дію, стимулює біосинтез білків та регенерацію печінки, підсилює лактацію та чинить імуномодуючу дію [8].

Дослідження залежності антиоксидантної активності флавоноїдів від структури інтенсивно проводились протягом останніх років, однак механізми антирадикальної та антиоксидантної активності силімарину кінцево не з'ясовані.

Метою даної роботи було дослідження електронних та просторових властивостей молекули силібіну як основного компоненту силімарину для встановлення механізмів антиоксидантної активності даної сполуки. Робота виконана в рамках продовження циклу досліджень квантово-фармакологічних вла-

стивостей лікарських засобів метаболітного типу дії [4-7].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для молекули силібіну проведено пошук найбільш стабільної конформації квантово-хімічним методом теорії функціоналу густини B3PW91/6-311+G(d, p) за допомогою програми FireFly (PC GAMESS) version 7.1.G [2, 6].

У методах теорії функціоналу густини при розрахунках властивостей досліджуваної системи багатеелектронна хвильова функція замінена електронною густиною. Це призводить до суттєвого спрощення розрахунків, оскільки багатеелектронна хвильова функція залежить від $3N$ змінних (3 просторових координати на кожен з N електронів), у той час як густина – функція лише трьох просторових координат [2].

B3PW91 – метод теорії функціоналу густини, який включає три параметри та належить до гібридних методів. B3PW91 складається з двох частин: функціонал B3, розроблений К. Becke, та функціонал PW91, розроблений J. P. Perdew та Y. Wang у 1991 р.

Розраховані квантово-хімічні показники для молекули силібіну: загальні розміри молекул (Å), відстані між атомами (Å); розміри кутів між зв'язками (°); розподіл електростатичного потенціалу та електронної густини в молекулі; заряди на атомах (од. заряду); енергії та локалізація вищої зайнятої (ВЗМО) і нижчої вакантної (НВМО) молекулярних орбіталей (eV) [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 2 представлена тривимірна структура молекули силібіну, отримана в результаті квантово-хімічних розрахунків, з позначенням типів атомів.

Згідно з результатами досліджень розміри молекули силібіну за осями складають: $X - 6,46 \text{ Å}$; $Y - 5,09 \text{ Å}$; $Z - 12,74 \text{ Å}$. Відстані між атомами показані в табл. 1.

© Чекман І. С., Поготова Г. А., небесна Т. Ю.,
Горчакова Н. О., 2014

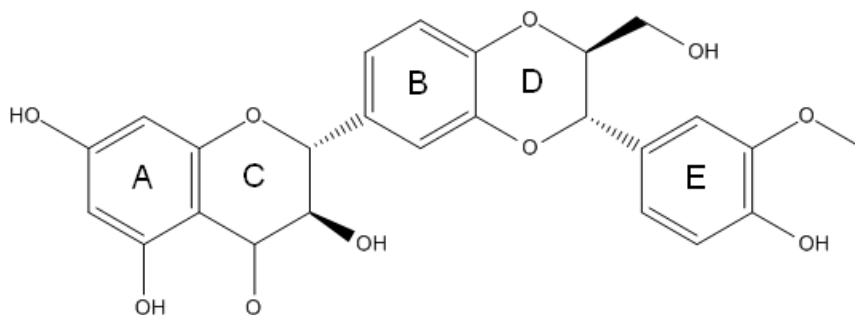


Рис. 1А. Структура молекули силібіну.

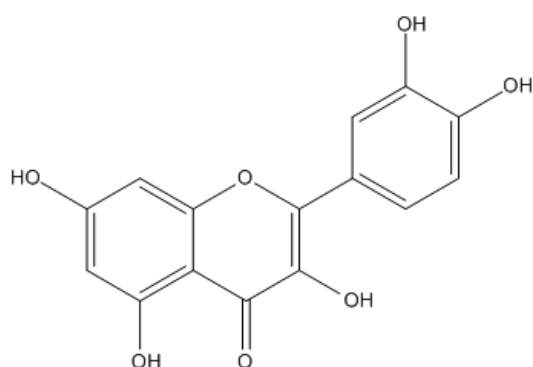


Рис. 1В. Структура молекули кверцетину.

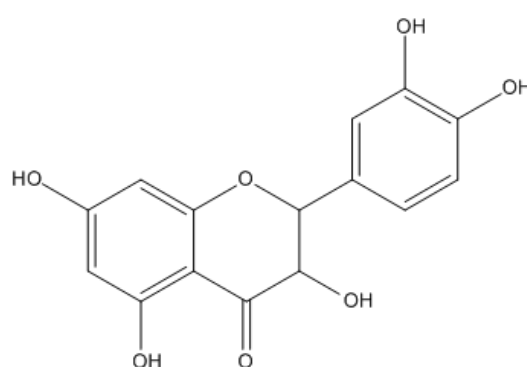


Рис. 1С. Структура молекули таксифоліну.

Міжмолекулярні взаємодії силібіну в організмі людини можуть бути описані різними якісними показниками: зарядами на атомах, потенціалами іонізації (енергія ВЗМО), спорідненістю до електрона (енергія НВМО), індексами реакційної активності. Враховуючи той факт, що молекули-мішені флаволігнанів в організмі людини кінцево не встановлені, дослідження реакційних центрів цих сполук є особливо цікавим та актуальним завданням.

У табл. 2 наведені значення зарядів на атомах у молекулі силібіну.

Найбільш негативні заряди в молекулі силібіну спостерігаються на атомах кисню O6 (-0,57), O5 (-0,55), O17 (-0,55) та атомі вуглецю C26 (-0,43). Найбільші позитивні заряди мають атоми вуглецю C27 (0,45)

Таблиця 1

ВІДСТАНІ МІЖ АТОМАМИ В МОЛЕКУЛІ СИЛІБІНУ

1	R(19-22)	3,89
2	R(12-28)	3,93
3	R(23-12)	9,11
4	R(20-22)	4,15
5	R(11-34)	3,53
6	R(20-34)	8,07
7	R(22-34)	10,65
8	R(27-32)	9,52
9	R(22-33)	10,17
10	R(23-34)	11,14

Примітка. R(1-2)* – відстань між атомами, номери яких вказані в дужках відповідно до рис. 1, Å.

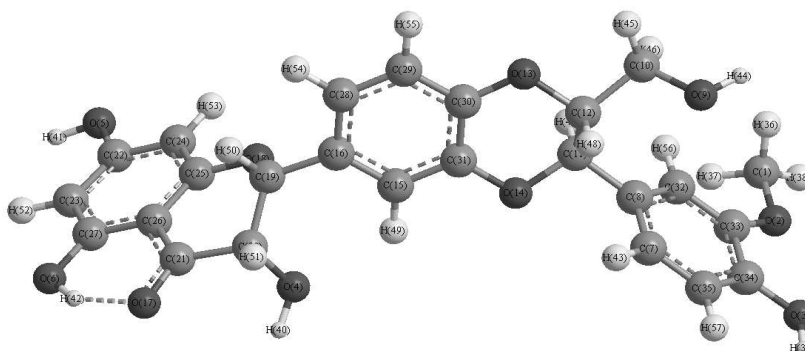


Рис. 2. Тривимірна структура молекули силібіну з позначенням типів атомів: атом водню гідроксогрупи O(6)–H(42) утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з киснем O(17).

Таблиця 2

**ЗАРЯДИ, ЕЛЕКТРОСТАТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ
ТА ЕЛЕКТРОННА ГУСТИНА НА АТОМАХ
В МОЛЕКУЛІ СИЛІБІНУ**

Тип атома	Заряд, од. заряду	Електронна густина, од. заряду	Електростатичний потенціал, од. заряду
1 (C)	-0,24	119,57	-14,71
2 (O)	-0,48	295,08	-22,32
3 (O)	-0,55	295,10	-22,32
4 (O)	-0,55	295,13	-22,34
5 (O)	-0,55	295,10	-22,31
6 (O)	-0,57	295,08	-22,33
7 (C)	-0,07	119,67	-14,77
8 (C)	-0,06	119,65	-14,75
9 (O)	-0,55	295,09	-22,35
10 (C)	-0,04	119,57	-14,71
11 (C)	-0,03	119,59	-14,69
12 (C)	0,09	119,62	-14,69
13 (O)	-0,53	295,13	-22,32
14 (O)	-0,50	295,20	-22,32
15 (C)	-0,11	119,69	-14,77
16 (C)	-0,11	119,65	-14,75
17 (O)	-0,55	295,41	-22,36
18 (O)	-0,49	295,21	-22,32
19 (C)	0,01	119,60	-14,68
20 (C)	-0,01	119,60	-14,69
21 (C)	0,53	119,81	-14,67
22 (C)	0,36	119,71	-14,68
23 (C)	-0,26	119,62	-14,77
24 (C)	-0,24	119,62	-14,77
25 (C)	0,44	119,71	-14,68
26 (C)	-0,43	119,59	-14,75
27 (C)	0,45	119,71	-14,68
28 (C)	-0,13	119,69	-14,76
29 (C)	-0,17	119,67	-14,76
30 (C)	0,27	119,66	-14,70
31 (C)	0,28	119,65	-14,71
32 (C)	-0,21	119,66	-14,76
33 (C)	0,30	119,65	-14,70
34 (C)	0,26	119,66	-14,70
35 (C)	-0,19	119,66	-14,76

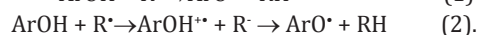
та C21 (0,53). Найбільша електронна густина (густини імовірності знаходження електрона в даній точці простору) характерна для атомів O17 (295,41) та O18 (295,21). Найбільш негативний електростатичний потенціал мають атоми O9 (-22,35) та O17 (-22,36).

Встановлення ділянок молекули, що мають негативний електростатичний потенціал, є важливим етапом для прогнозування взаємодії молекули з електрофілами. Однак аналіз електростатичного потенціалу молекул дозволяє вирішувати і більш складні завдання. Зокрема, всі сучасні комп'ютерні програми для моделювання процесів взаємодії ферментів з субстратами та рецепторів з лігандами розраховують розподіл молекулярного електростатичного потенціалу як інтегральну величину, що характеризує реакційну активність молекул [1].

На рис. 3-4 показана локалізація граничних орбіталей в молекулі силібіну.

Значення енергій граничних орбіталей є найбільш важливим дескриптором антиоксидантної активності [9, 10]. З літератури відомо, що редокс-потенціал антиоксидантів фенольної природи збільшується зі збільшенням негативної енергії НВМО, антиоксидантна активність похідних вітаміну Е підвищується при зменшенні негативної енергії ВЗМО [11, 13]. Антиоксидантна активність каротиноїдів залежить від різниці енергій ВЗМО та НВМО ($E_{В-Н}$). При зменшенні значення $E_{В-Н}$ та потенціалу іонізації антиоксидантна активність каротиноїдів зростає [10, 13, 14].

Сполуки фенольної структури можуть реалізовувати антиоксидантні властивості за двома механізмами: шляхом переносу атома водню (1) або транспорту електрона (2):



Реакція (1) пов'язана з гомолітичною дисоціацією зв'язку О-Н і може відбуватися на кожній ОН-групі фенольної сполуки (молекули флаволігнану) залежно від ентальпії дисоціації зв'язку. Чим нижче значення ентальпії дисоціації, тим більша імовірність участі даної ОН-групи в антиоксидантній дії сполуки. Реакція (2) перебігає з утворенням проміжної сполуки-катиону, отже залежить від потенціалу іонізації молекули, який визначається енергією ВЗМО [15].

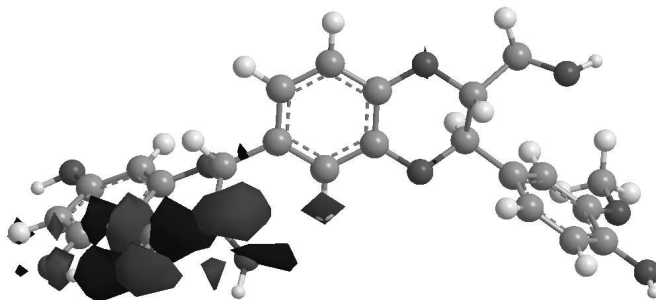


Рис. 3. Локалізація ВЗМО в молекулі силібіну.

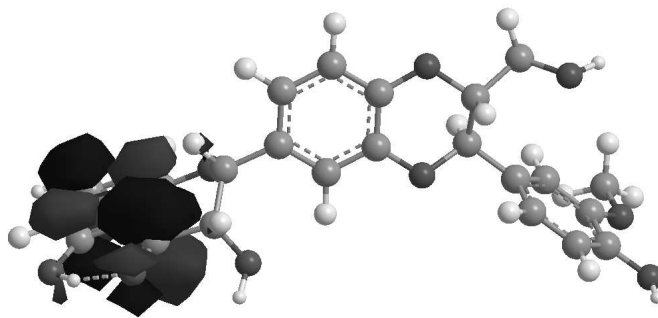


Рис. 4. Локалізація НВМО в молекулі силібіну.

Для силібіну реакція (2) має більше значення, в реалізації антиоксидантного ефекту беруть участь гідроксильні групи 7-OH та 20-OH [15].

В молекулі силібіну нараховується 141 молекулярна орбіталь. ВЗМО (№ 91) локалізується на карбонильній групі та має енергію -10,48 еВ. НВМО (№ 92) займає атоми вуглецю у центрі молекули та має енергію -3,75 еВ.

Показово, що ВЗМО силібіну знаходиться саме на кільці С біля рухомого атома водню гідроксогрупи O(6)–H(42), а водень цієї гідроксогрупи утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з киснем O(17). Атом кисню O(6) біля рухомого атома водню має найбільший негативний заряд в усій молекулі силібіну. Антиоксиданти флавоноїдної структури (кверцетин, таксифолін) мають спільну з силібіном частину (кільця А, С, рис. 1) та найбільш імовірно проявляють антиоксидантні властивості завдяки рухомому водню в кільці А.

ВИСНОВКИ

1. Встановлені топологічні (відстані між атомами) та квантово-хімічні (розподіл зарядів, електростатичного потенціалу, електронної густини, граничних молекулярних орбіталей) параметри молекули флаволігнану силібіну, що дозволяє поглибити сучасні уявлення про відношення цієї сполуки до компонентів живих систем з метою розуміння механізмів її фармакологічної дії.
2. У молекулі силібіну ВЗМО локалізується на кільці С.
3. Результати квантово-фармакологічних досліджень свідчать, що атом водню гідроксогрупи O(6)–H(42) має важливе значення для реалізації антиоксидантних властивостей силібіну.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Апостолова Е. С., Михайлюк А. И., Цирельсон В. Г. Квантово-химическое описание реакций. – М.: РХТУ, 1999. – 61 с.
2. Соловьев М. Е., Соловьев М. М. Компьютерная химия. – М.: Солон-пресс, 2005. – 325 с.
3. Цаприлова С. В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / С. В. Цаприлова, Р. А. Родионова // Вісник фармації. – 2008. – № 3 (41). – С. 92-104.
4. Чекман И. С. Изучение квантово-фармакологических свойств дигоксина / [И. С. Чекман, О. А. Казакова, Т. Ю. Небесная и др.] // Доп. Національної академії наук України. – 2008. – Т. 4. – С. 182-187.
5. Чекман И. С. Квантово-хімічні та топологічні дескриптори в дослідженнях залежності «структура-активність»: [огляд літератури та власних досліджень] / І. С. Чекман, О. О. Казакова, Т. Ю. Небесна // Журн. Академії медичних наук України. – 2008. – Т. 14, № 4. – С. 636-649.
6. Чекман И. С. Методи комп'ютерних розрахунків у квантовій фармакології / І. С. Чекман, О. О. Казакова, Т. Ю. Небесна // Фармакол. та лікарська токсикол. – 2008. – № 1. – С. 48-57.
7. Яковлева І. Ю. Дослідження квантово-фармакологічних властивостей диметиламіноетилового ефіру янтарної кислоти (яктону) і прогнозування його фармакологічних властивостей на основі структури молекули / [І. Ю. Яковлева, І. С. Чекман, Т. Ю. Небесна та ін.] // Вісник проблем біол. і медицини. – 2008. – Вип. 1. – С. 160-168.
8. Abenavoli L. Milk thistle in liver diseases: past, present, future / [L. Abenavoli, R. Capasso, N. Milic et al.] // Phytother. Res. – 2010. – Vol. 24, № 10. – P. 1423-1432.
9. Chaudière J., Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms // Food Chem. Toxicol. – 1999. – Vol. 37, № 9-10. – P. 949-962.
10. Kleinová M. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials / [M. Kleinová, M. Hewitt, V. Brezová et al.] // Gen. Physiol. Biophys. – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 97-103.
11. Lien E. J. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants / [E. J. Lien, S. Ren, H. H. Bui et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26, № 3-4. – P. 285-294.
12. Sangeetha N. Oral supplementation of silibinin prevents colon carcinogenesis in a long term preclinical study.

- cal model / [N. Sangeetha, S. Aranganathan, J. Panneerselvam et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2010. – Vol. 643, № 1. – P. 93-100.
13. Soffers A. E., Van Haandel M. J., Boersma M. G. et al. Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data / [A. E. Soffers, M. J. Van Haandel, M. G. Boersma et al.] // Free Radic. Res. – 1999. – Vol. 30, № 3. – P. 233-240.
14. Sun Y-J. Quantitative Structure-activity Relationship Study on the Antioxidant Activity of Carotenoids / [Y.-J. Sun, J. Pang, X.-Q. Ye et al.] // Chinese J. Struct. Chem. – 2009. – Vol. 28, № 2. – P. 2163-2170.
15. Trouillas P. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavolignans: a joint experimental and theoretical study / [P. Trouillas, P. Marsal, A. Svobodova et al.] // J. Phys. Chem. – 2008. – Vol. 112, № 5. – P. 1054-1063.

УДК 615.272.4**И. С. Чекман, Г. А. Поготова, Т. Ю. Небесная, Н. А. Горчакова****КВАНТОВО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ СИЛИМАРИНА**

В работе исследованы квантово-химические параметры электронной и пространственной структуры молекулы силибина: топологические характеристики, заряды на атомах, локализация граничных молекулярных орбиталей, распределение электростатического потенциала в молекуле, энергетические параметры.

Ключевые слова: силимарин; силибин; гепатопротектор; квантовая фармакология

UDC 615.272.4**I. S. Chekman, G. A. Pogotova, T. Yu. Nebesna, N. A. Gorchakova****QUANTUM-PHARMACOLOGICAL STUDY OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SILYMARIN**

In the article quantum-chemical parameters of the electronic and spatial structure of silybin molecule have been analyzed: topological characteristics, the charges of atoms, localization of HOMO and LUMO, electrostatic potential distribution in molecules, energies parameters.

Key words: silymarin; silybin; hepatoprotector; quantum pharmacology

Адреса для листування:

04114, м. Київ, вул. Ежена Потьє, 14.
Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця

Надійшла до редакції:

05.03.2014 р.

УДК 547.553.2:547.52/.59]-02:616.8-09.63.004.58.

Н. В. Руда, Г. І. Степанюк, О. П. Драчук

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ АМІНОКИСЛОТОВІСНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ В УМОВАХ, УСКЛАДНЕНИХ ГІПО- ТА ГІПЕРТЕРМІЄЮ

В експериментах на щурах встановлено, що після одноразового внутрішньоочеревинного введення в організм амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону (сполуки III – 10,2 мг/кг та VI – 7,4 мг/кг) як і бемітилу (34 мг/кг) фізична витривалість тварин (плавальний тест) підвищується в умовах гіпертермії (38-40 °C) на 61,7; 83,6 та 48,7 %, а на тлі гіпотермії (10-12 °C) – на 39,2; 46,0 та 51,6 % ($p < 0,05$) відповідно. Така дія вказаних сполук свідчить про наявність у них актопротекторного ефекту. Сполука VI, яка містить у своїй структурі залишок гліцину, представляє інтерес для поглибленого вивчення її актопротекторних властивостей та механізмів дії.

Ключові слова: актопротекторна дія; похідні 1,4-нафтохінону; гіпо- та гіпертермія

ВСТУП

Попередні дослідження показали, що амінокислотовмісні похідні 1,4-нафтохінону (1,4-НХ) є носіями актопротекторної активності. У відповідь на одноразове введення досліджуваних сполук, як і еталонного актопротектора бемітилу, це проявлялось підвищенням фізичної витривалості щурів за плавальним тестом (у звичайних умовах при t 24-26 °C). В зазначених умовах експерименту найбільшу ефективність проявляли сполуки з лабораторними шифрами III та VI, які містять у структурі залишок α -аланіну та гліцину відповідно [1]. У зв'язку з цим цікаво було дослідити дію зазначених амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ в ускладнених умовах експерименту, оскільки актопротектори використовуються переважно з метою підсилення фізичної витривалості організму в екстремальних умовах – фізичне перевантаження, гіпоксія, високі та низькі температури, радіаційний вплив тощо [2], що і слугувало підставою для проведення даного дослідження.

Мета роботи полягала у порівняльній характеристиці актопротекторної дії вказаних амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ та бемітилу в умовах гіпо- та гіпертермії для визначення сполуки, найбільш перспективної для поглибленого вивчення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В досліді використані субстанції амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ, синтезованих на кафедрі

рі технологій біологічно активних сполук, фармації та біотехнології (зав. каф. – проф. В. П. Новіков) Національного університету «Львівська політехніка». Експерименти проведені на 156 нелінійних щурах обох статей масою тіла 160-220 г. Фізичну витривалість тварин оцінювали за плавальним тестом (тривалістю плавання) у гарячій (38-40 °C) та холодній (10-12 °C) воді з додатковим навантаженням 10 % від маси тіла. Кожну сполуку та бемітил вводили одноразово групі тварин ($n=7$) внутрішньоочеревинно за 40 хв до тестування в дозах, які становили їх ЕД₅₀ (ефективна доза, яка викликала зростання величини показника плавання на 50 %) за попередніми дослідженнями. Контрольним тваринам вводили таким же чином еквівалентну кількість 0,9 % розчину NaCl.

Величину актопротекторного ефекту досліджуваних речовин оцінювали за динамікою (y %) показника тривалості плавання щурів до повної втоми (відмова від плавання, 10-ти секундне занурювання) відносно контролю. Цифрові дані обробляли методом варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента, різницю між показниками вважали вірогідною при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведене дослідження показало, що в умовах гіпертермії (38-40 °C) середня тривалість плавальної проби в інтактних тварин (контроль) становила $341,4 \pm 43,2$ с. Під дією амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ з лабораторними шифрами III та VI, як і під впливом бемітилу, тривалість плавання щурів у за-

Таблиця 1

**ВПЛИВ СПОЛУК III, VI ТА БЕМІТИЛУ
НА ТРИВАЛІСТЬ ПЛАВАЛЬНОГО ТЕСТУ У ЩУРІВ
В УМОВАХ ГІПЕРТЕРМІЇ ($M \pm m$, $n = 7$)**

Сполука	Доза, мг/кг	Тривалість плавання, с	Динаміка відносно контролю, %
Контроль	–	341,4 \pm 43,2	–
III	10,2	552,0 \pm 80,4*	+ 61,7
VI	7,4	627,0 \pm 54,0*	+ 83,6
Бемітил	34,0	507,6 \pm 24,6*	+ 48,7

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю.

даних умовах експерименту вірогідно зросла відповідно на 61,7; 83,6 та 48,7 % відносно контрольного показника. За ефективністю досліджуваних речовин можна розташувати у такий ряд: VI \geq III \geq бемітил (табл. 1).

Посилення фізичної витривалості щурів на тлі сполук III та VI подібно з препаратом порівняння спостерігалось також в умовах гіпотермії (10-12 °C): середня тривалість плавання щурів контрольної групи становила 183,6 \pm 18,6 с, а під впливом вказаних речовин цей показник виріс відповідно на 39,2; 46,0 та 51,6 %. При цьому за ефективністю в даних умовах експерименту досліджуваних речовин можна розташувати у такий послідовності бемітил \geq VI \geq III (табл. 2). Спроможність досліджуваних амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ посилювати фізичну витривалість організму в умовах гіпо- та гіпертермії можна розцінити як наявність у них актопротекторного ефекту в екстремальних умовах. При цьому обидві речовини діяли дещо більш ефективно при гіпертермії, в той час як еталонний актопротектор проявляв практично однакову ефективність при обох температурних режимах.

Достатньо виразна актопротекторна дія обох амінокислотовмісних похідних 1,4-НХ, як і бемітилу, при гіпер- та гіпотермії є досить цінною властивістю. Потреба в таких речовинах сьогодні не зменшується в цілому світі та в Україні зокрема. Гіпертермія досить часто зустрічається у людей, які працюють у глибоких шахтах, на пожежах, у космосі, в регіонах із жарким кліматом [2].

Досить серйозні наслідки для теплотовного організму, в т. ч. і для людини, може викликати гіпотермія, коли спостерігається переважання тепловіддачі над теплопродукцією. Частіше за все такий стан виникає у жителів та мандрівників у холодних регіонах земної кулі або при різноманітних аваріях та екстремальних ситуаціях у зимовий час. Як свідчать літературні дані [2], індивідуальні засоби захисту людини від дії низьких температур (одежа, взуття) не завжди ефективні, до того ж вони обмежують рухову діяльність, мають високу вартість, неефективні в холодній воді. При цьому такі лікарські засоби як

Таблиця 2

**ВПЛИВ СПОЛУК III, VI ТА БЕМІТИЛУ
НА ТРИВАЛІСТЬ ПЛАВАЛЬНОГО ТЕСТУ У ЩУРІВ
В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЇ ($M \pm m$, $n = 7$)**

Сполука	Доза, мг/кг	Тривалість плавання, с	Динаміка відносно контролю, %
Контроль	–	183,6 \pm 18,6	–
III	10,2	255,6 \pm 33,0	+ 39,2
VI	7,4	268,8 \pm 25,8*	+ 46,0
Бемітил	34,0	278,4 \pm 15,6*	+ 51,6

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю.

сіднокарб, фенамін, бромантан, томерзол та інші, які використовуються з метою профілактики холодової травми, здебільшого мають недостатній за величиною захисний ефект при гіпертермії, їх дія при цьому проявляється у вузькому діапазоні доз [2].

Наведені дані вказують на доцільність пошуку та розробки нових речовин з актопротекторним ефектом, придатних для створення на їх основі нових лікарських засобів з вказаною дією. З цієї точки зору результати проведеного дослідження є досить обнадійливими. Амінокислотовмісні похідні 1,4-НХ сполуки з лабораторними шифрами III та VI за спроможністю підвищувати витривалість організму в умовах гіпер- та гіпотермії не поступалися бемітилу, а сполука VI на тлі гіпертермії переважала за ефективністю еталонний актопротектор в 1,7 рази ($p > 0,05$). Іншою перевагою досліджуваних похідних 1,4-НХ III та VI перед бемітилом є їх більш висока активність: за величиною показника ED_{50} вони переважають еталонний актопротектор відповідно у 3,3 та 4,6 рази. Механізм актопротекторного ефекту досліджуваних похідних 1,4-НХ певною мірою пов'язаний з наявністю у них протигіпоксичних та протиішемічних властивостей [3].

Враховуючи більшу активність та дещо більш високу ефективність сполуки VI в обох дослідженнях, можна зробити висновок, що саме ця сполука є привабливою для подальших досліджень фармакологічних властивостей. Наявність у хімічній структурі сполуки VI залишку гліцину дає підставу зробити припущення, що саме ця амінокислота в певній мірі визначає ступінь її актопротекторного ефекту в ускладнених умовах експерименту. Таке припущення цілком узгоджується з даними літератури про те, що призначення гліцину як лікарського засобу практично здоровим пацієнтам перед підйомом на висоту 6000 м сприяє збереженню у них початкового функціонального стану ЦНС (операторська діяльність) та підвищенню фізичної витривалості організму в умовах гіпоксії [4].

ВИСНОВКИ

1. Амінокислотні похідні 1,4-НХ з лабораторними шифрами III (10,4 мг/кг) та VI (7,4 мг/кг) при од-

норазовому внутрішньоочеревинному введенні щурам подібно до бемітилу (34 мг/кг) вірогідно підвищують фізичну витривалість організму (плавальний тест) в умовах гіпертермії (38-40 °C) на 61,7; 83,6 та 48,7 %.

2. На тлі гіпотермії (10-12 °C) сполуки III, VI та бемітил при аналогічному введенні в організм збільшують тривалість плавального тесту відповідно на 39,2; 46,0 та 51,6 % ($p < 0,05$).
3. В подальшому доцільно дослідити актопротекторну дію сполук III та VI в умовах тривалої гіпокінезії та охарактеризувати їх вплив на перебіг біоенергетичних процесів у скелетних м'язах для з'ясування механізмів зазначеного ефекту.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Руда Н. В. Актопротекторна дія нових амінокислотомісних похідних 1,4-нафтохінону / Н. В. Руда, О. П. Драчук, А. В. Саєнко, М. С. Курка // VI Міжнар. наук. конф. студ. та молодих учених: [Сьогодення та майбутнє медицини]. Вінниця, 9-10 квітня 2009 року: матер. конф. – Вінниця, 2009. – С. 198-199.
2. Фармакологическая коррекция физической работоспособности / Под ред. Н. Н. Самойлова. – М.: Зеркало, 2002. – 120 с.
3. Шеремета Р. О. Церебропротекторні властивості нових амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону (експериментальне дослідження): Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.05. – К., 2008. – 22 с.
4. Ястребов Д. В. Экспериментальная оценка антигипоксического действия глицина / Д. В. Ястребов, Е. Б. Шустов, В. В. Горанчук // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии. – С.Пб.: Политехника, 1999. – С. 246.

УДК 547.553.2:547.52/.59]-02:616.8-09.63.004.58.**Н. В. Руда, Г. І. Степанюк, О. П. Драчук****ХАРАКТЕРИСТИКА АКТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТОСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-НАФТОХИНОНА В УСЛОВИЯХ, ОСЛОЖНЕННЫХ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИЕЙ**

В опытах на крысах установлено, что после однократного внутрибрюшинного введения в организм аминокислотосодержащих производных 1,4-нафтохинона (соединения III – 10,2 мг/кг и VI – 7,4 мг/кг), как и бемитила (34 мг/кг), физическая выносливость животных (плавательный тест) повышается в условиях гипертермии (38-40 °C) на 61,7; 83,6 и 48,7 %, а на фоне гипотермии (10-12 °C) – на 39,2; 46,0 и 51,6 % ($p < 0,05$) соответственно. Такое действие указанных соединений свидетельствует о наличии у них актопротекторного эффекта. Соединение VI, содержащее в своей структуре остаток глицина, представляет интерес для углубленного изучения актопротекторных свойств и механизмов действия.

Ключевые слова: актопротекторное действие; производные 1,4-нафтохинона; гипо- и гипертермия

UDC 547.553.2:547.52/.59]-02:616.8-09.63.004.58.**N. V. Ruda, G. I. Stepanyuk, O. P. Drachuk****CHARACTERISTICS OF ACTOPROTECTIVE ACTION OF AMINOACIDS DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE UNDER CONDITIONS OF HYPO- AND HYPERTHERMY**

It was shown in experiments on the rats that after unitary intraperitoneal introduction of aminoacids derivatives 1,4-naphtoguinone (substances III – 10,2 mg/kg and VI – 7,4 mg/kg) as a bemithylum (34 mg/kg) into organism physical endurance of animals (swimming test) rises under hyperthermic conditions (38-40 °C) on 61,7; 83,6 and 48,7 % and under hypothermic conditions (10-12 °C) rises on 39,2; 46,0 and 51,6 % ($p < 0,05$) accordingly. Such action of these compounds indicates that they have actoprotective effect. Compound VI, contains in its structure a glycine residue, is interested for in-depth study of its actoprotective properties and mechanisms of action.

Key words: actoprotective action; derivatives of 1,4-naphtoguinone; hypo- and hyperthermy

Адреса для листування:

21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Тел. (0432) 61-14-00, 097-296-86-36.

Вінницький національний медичний університет
ім. М. І. Пирогова*Надійшла до редакції:*

06.03.2014 р.

УДК 615.35.015:577.15:615.243:615.272

Д. В. СЕМЕНІВ

Івано-Франківський медичний університет

ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ МАЗІ З ОЛІЄЮ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ

За даними медичної статистики поширеність патологій, що супроводжуються рановим процесом, надзвичайно висока. Враховуючи спрямованість фармакологічно активних речовин аронії чорноплідної, ми довели, що перспективним є створення м'якої лікарської форми з олією аронії чорноплідної. Метою даної роботи було проведення дослідження антиальтеративної активності мазі з олією аронії чорноплідної в порівнянні з олією обліпихи на моделі асептичного хронічного запалення шкіри і підшкірної клітковини у щурів. У ході проведених досліджень встановлено, що за показниками антиальтеративної активності (площа ран, швидкість загоєння і % рубцювання ран, температура шкіри) мазь з олією аронії проявила більш виражену фармакологічну активність, ніж олія обліпихи.

Ключові слова: мазь з олією аронії; рановий процес; антиальтеративна активність; обліпихова олія

ВСТУП

Розробка топікальних лікарських форм залишається однією з актуальних проблем сучасної медицини і фармації. На теперішній час відмічається тенденція до більш широкого використання мазей рослинного походження. Перевагою їх є добра переносимість, відсутність побічних ефектів, м'яка дія. Крім того, мазі рослинного походження завдяки вмісту комплексу біологічно активних речовин виявляють різнобічну дію: протизапальну, репаративну, мембраностабілізуювальну. Враховуючи спрямованість фармакологічно активних речовин аронії чорноплідної, ми довели, що перспективним є створення м'якої лікарської форми з олією аронії (ОА) чорноплідної [2]. Аналіз даних літератури щодо фітохімічного складу плодів аронії показав наявність у її плодах поліфенольних сполук, каротиноїдів, оксикоричних кислот, дубильних і пектинових речовин, вітамінів, мікроелементів [1, 3, 4, 5, 8, 9, 10], що дозволяє ліпофільному екстракту виявляти різноманітні види дії: протизапальну, репаративну, антиоксидантну, мембранопротекторну. Здатність препарату виявляти протизапальну дію є важливою особливістю лікування ранової патології. Як відомо, початковим етапом ранового процесу є альтеративна та ексудативна фази запалення, тому доцільним було визначити протизапальну дію мазі з ОА.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Найбільш поширеною моделлю для вивчення антиальтеративної активності є модель асептичного запалення шкіри і підшкірної клітковини у щурів, яка

дозволяє простежити захисну дію мазі з ОА при альтеративному процесі та її вплив на загоєння ран.

Дану патологію викликали підшкірним введенням 9 % розчину оцтової кислоти в об'ємі 0,5 мл на кожну тварину разом з внутрішньоочеревиною ін'єкцією декстрану в дозі 300 мг/кг для збільшення реактивності організму тварини до оцтової кислоти [6, 7]. Мазь з ОА в дозі 30 мг/см² та референс-препарат обліпихову олію в дозі 10 мг/см² застосовували 1 раз на добу в лікувальному режимі з 8 дня досліді до повного загоєння ран (26-й день експерименту). Основними показниками антиальтеративної дії мазі були площа виразок (S), швидкість загоєння (V) і відсоток щурів з рубцями, температура шкіри. Площу некрозу вимірювали у мм² за методом Л.Н.Попової, прикладаючи до рани прозорий графарет і обмальовуючи її краї. Швидкість загоєння ран розраховували за формулою:

$$V = \frac{S_{\text{макс.}} - S_{\text{досл.}}}{S_{\text{досл.}}},$$

де: $S_{\text{макс.}}$ – максимальна площа рани на 8-й день досліді, мм²;

$S_{\text{досл.}}$ – площа рани в день вимірювання, мм².

В експерименті було використано 18 білих безпородних щурів масою 170-190 г. Всі тварини були розділені на 3 групи по 6 щурів у кожній: 1-а – група контрольної патології, тварини якої не отримували лікування (на 8-й день виражена патологія); тваринам 2-ої групи через 7 днів на тлі патології наносили мазь з ОА в дозі 30 мг/см²; тваринам 3-ої групи на тлі патології наносили референс-препарат обліпихову олію в дозі 10 мг/см².

Таблиця 1

ПОКАЗНИКИ АНТИАЛЬТЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ МАЗІ З ОА НА МОДЕЛІ АСЕПТИЧНИХ РАН

Дні досліджу	Показники	Контрольна патологія (n=6)	Ліковані маззю з ОА (n=6)	Ліковані олією обліпіхи (n=6)
8-й	S, мм ²	Вихідні дані		
		225,65±21,82	264,80±20,60	270,50±25,41
11-й	S, мм ² V	200,40±14,60 0,12	223,20±15,40 0,18	238,1±11,20 0,13
14-й	S, мм ² V	160,00±7,95 0,41	151,60±11,30 0,75	158,1±7,60 0,71
16-й	S, мм ² V	135,45±8,10 0,66	118,4±13,52* 1,23	150,1±4,61* 0,80
18-й	S, мм ² V	110,15±25,02 1,04	89,60±10,20* 1,95	114,1±9,61* 1,37
20-й	S, мм ² V % рубцювання	92,80±15,08 1,43 -	68,00±6,80* 2,89 16,7	87,7±7,40* 2,08 16,7
22-й	S, мм ² V % рубцювання	71,32±19,75 2,16 -	54,00±4,45* 3,90 50,1	60,7±3,95* 3,45 33,34
24-й	S, мм ² V % рубцювання	55,65±12,01 3,05 34,4	39,00±2,65* 5,79 66,67	44,5±2,10* 5,08 50,1
26-й	S, мм ² V % рубцювання	40,85±10,60 4,52 66,67	- - 100	- - 100

Примітка: * – достовірно відносно групи контрольної патології (p≤0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень представлені в табл. 1 та 2.

У результаті підшкірного введення оцтової кислоти у тварин усіх 3-х експериментальних груп на 8-й день експерименту розвивалася виразка шкіри, площа якої склала в середньому 225,65±21,82 мм² (контрольна патологія); 264,80±20,60 мм² – у тварин, яким наносили мазь з ОА; 270,50±25,41 мм² – олію обліпіхи (табл. 1). Аналіз результатів експериментальних досліджень з вивчення антиальтеративної активності мазі з ОА показав, що даний препарат проявив виражену антиальтеративну активність, про що свідчило достовірне прискорення швидкості загоєння (1,23) і зменшення площі ран (118,4±13,52 мм²) під впливом мазі з 16-го дня експерименту у порівнянні з групою тварин з контрольною патологією (0,66 і 135,45±8,10 мм², відповідно) (табл. 1).

У цей період спостереження (табл. 1) під впливом препарату порівняння олії обліпіхи також відбувалося достовірне прискорення швидкості загоєння ран (0,80) і зменшення площі ран (150,1±4,61 мм²). Проте протягом 8 днів лікування (з 8 по 16 день) швидкість загоєння ран у тварин, яких лікували маззю з ОА перевищувала швидкість загоєння у тварин групи контрольної патології і групи тварин, яких лікували олією обліпіхи (табл. 1).

Динаміка зменшення площі виразок під впливом порівнюваних препаратів відбувалася таким чином: мазь з ОА з 8-го по 16-й день зменшувала цей

Таблиця 2

ДИНАМІКА ТЕМПЕРАТУРИ (t°) ШКІРИ ЩУРІВ НА МОДЕЛІ АСЕПТИЧНИХ РАН

Дні досліджу	Контрольна патологія (n=6)	Ліковані маззю з ОА (n=6)	Ліковані олією обліпіхи (n=6)
Вихідні дані	34,6±0,14	34,8±0,14	34,7±0,18
8-й	36,3±0,16*	36,2±0,19*	36,3±0,21*
11-й	36,2±0,13*	35,1±0,17*	36,1±0,20*
14-й	36,1±0,14*	35,2±0,13*	36,0±0,13*
16-й	35,8±0,17*	35,3±0,14*	35,7±0,11*
18-й	35,7±0,15*	35,3±0,17	35,0±0,20
20-й	34,8±0,16	34,9±0,15	35,0±0,25

Примітка: * – достовірно відносно вихідних даних (p≤0,05).

показник в середньому на 20 %, з 18-го по 24-й день – на 30 %; під впливом референс-препарату з 11-го по 14-й день змін площі виразок не відбувалося, з 16-го по 20-й день – в середньому на 11 %, з 22-го по 24-й день – на 15 % по відношенню до групи тварин з контрольною патологією, тобто референс-препарат в 1,5 рази був менш активним за показником зменшення площі виразок протягом всього експерименту, ніж мазь з ОА.

Аналогічним чином впливали порівнювані препарати на швидкість загоєння ран: при нанесенні мазі з ОА з 8-го по 11-й день даний показник збільшився в середньому в 1,5 рази, при нанесенні облі-

пихової олії змін не спостерігалось; з 14-го по 18-й – в 1,8 рази при лікуванні маззю з ОА, в 1,7 рази – при нанесенні обліпихової олії; з 20-го по 24-й день – у 2 рази під дією досліджуваної мазі; в 1,7 рази – референс-препарату по відношенню до групи тварин з контрольною патологією. Тобто знову і за цим показником антиаль-теративної активності препарат аронії чорноплідної перевищував обліпихову олію.

На 26-й день експерименту у нелікованих щурів ще були рани, але їх площа зменшилася за півмісяця спостереження з $225,65 \pm 21,82 \text{ мм}^2$ до $40,85 \pm 10,60 \text{ мм}^2$, тоді як під дією мазі з ОА аналогічні величини були вже на 24-й день досліді, а % рубцювання на 24-й день склав 66,7 % у порівнянні з групою нелікованих тварин, де % рубцювання склав 34,4 %. При нанесенні обліпихової олії даний показник складав 50,1 %, тобто на 17 % менше, ніж у досліді з маззю, яка досліджувалась. Процес рубцювання ран у щурів, яких лікували маззю з ОА, почався з 20-го дня і повністю закінчився на 26-й день, тоді як у майже 30 % нелікованих щурів рани ще не зарубцювалися. Після моделювання патології у всіх піддослідних тварин утворилися рани з вираженим запальним процесом довколишніх тканин (ексудація, гіперемія, набряк), що супроводжувалось підвищенням локальної температури в зоні пошкодження з 8-го по 20-й день дослідження (табл. 2).

Аналіз результатів експерименту, представлених у табл. 2, показав, що в результаті 12-тиденного лікування маззю з ОА і олією обліпихи (з 8 по 20-й день) нормалізувалися показники температури шкіри щурів. Так, зниження температури шкіри в області виразки в групі тварин, яким наносили мазь з ОА, спостерігалось вже на 11-й день, а у тварин, які отримували референс-препарат, – на 16-й день експерименту, що характеризувало також менш виражені проти-запальні властивості олії обліпихи, ніж у мазі з ОА. У нелікованих тварин температура шкіри спонтанно нормалізувалася також на 16-й день досліді.

Таким чином, аналіз результатів експериментальних досліджень з вивчення протизапальної (антиаль-теративної) дії мазі з ОА на моделі асептичних ран показав, що вже на 20-й день експерименту відбувалося повне загоєння ран, нормалізація температури тіла, що свідчило про виражені антиальтеративні і ранозагоювальні властивості досліджуваного препарату аронії. Отримані дані свідчать про те, що мазь з олією аронії є перспективним препаратом для застосування в комплексній терапії захворювань шкіри, що супроводжуються запаленням.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Деренько С. А. Динаміка нагромадження аскорбінової кислоти і каротиноїдів у плодах горобини звичайної / С. А. Деренько // Фармац. журн. – 1979. – № 5. – С. 55-58.
2. Дмитрієвська І. Д. Розробка лікувальних та профілактичних засобів з плодів горобини чорноплідної / І. Д. Дмитрієвська, П. П. Ветров, Ю. Л. Гальченецька // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: матер. VI Нац. з'їзду фармацевтів України. – Х.: Вид-во НФаУ, 2005. – С. 211-212.
3. Зузук Б. М. Аронія чорноплідна – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot: [аналітичний огляд] / Б. М. Зузук, Д. В. Семенів, Р. В. Куцук // Провізор. – 2007. – № 6. – С. 35-39.
4. Туманов В. А. Природні поліфеноли як лікарські засоби / [В. А. Туманов, В. А. Барабой, О. В. Стефанов та ін.] // Фітотерапія. Часопис. – 2002. – № 3-4. – С. 1-7.
5. Юдицькайте С. П. Исследование флавановых гликозидов, антоцианов и лейкоантоцианов плодов аронии черноплодной / С. П. Юдицькайте. Новые культуры в народном хозяйстве и медицине. – К.: Наук. думка, 1976. – Ч. 1. – С. 55-56.
6. Яковлева Л. В. Дослідження механізму протизапальної дії нової вітчизняної мазі «Естан» на різних моделях гострого запалення / Л. В. Яковлева, К. П. Бездітко // Клінічна фармація. – 2008. – № 3. – С. 30-34.
7. Яковлева Л. В. Скринінгове вивчення репаративної активності різних композицій експериментальної мазі «Мірамеф» / Л. В. Яковлева, Ю. В. Федорчук, О. В. Чуєшов // Вісник фармації. – 2002. – № 2 (30). – С. 125-127.
8. Ipatova O. M. Antioxidant properties of a procyanidin-containing extract from Aronia (*Aronia melanocarpa*) / O. M. Ipatova, N. N. Prozorovskaya, I. F. Rusina, V. N. Prozorovskiy // Biomedical Chem. – 2003. – Vol. 49, № 2. – P. 165-176.
9. Sueiro L. Chemopreventive Potential of Flavonoid Extracts from Plantation-Bred and Wild Aronia melanocarpa (Black Chokeberry) Fruits // [L. Sueiro, M. H. Grace, M. A. Lila et al.] // J. of Food Sci. – 2006. – Vol. 71, № 8. – P. 480-488.
10. Szajdek A. Biologically active substances and antioxidant properties of fruits and juices of aronia and black currant / A. Szajdek, J. Borowska, S. Czaplicki // Fruit-Growing. – 2004. – Vol. 16, № 15. – P. 321-325.

УДК 615.35.015:577.15:615.243:615.272

Д. В. Семенів

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МАЗИ С МАСЛОМ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

По данным медицинской статистики распространенность патологий, которые сопровождаются раневым процессом, чрезвычайно высокая. Учитывая направленность фармакологически активных веществ аронии черноплодной перспективным является создание мягкой лекарственной формы, содержащей масло аронии черноплодной. Целью данной работы было проведение исследований по изучению антиаль-теративной активности мази с маслом аронии в сравнении с облепиховым маслом на модели асептического хронического воспаления кожи и подкожной клетчатки у крыс. В ходе проведенных исследований было установлено, что по показателям антиальтеративной и ранозаживляющей активности (площадь ран, скорость заживления и % рубцевания ран, температура кожи) мазь с маслом аронии проявила более выраженную фармакологическую активность, чем облепиховое масло.

Ключевые слова: мазь с маслом аронии; раневой процесс; антиальтеративная активность; облепиховое масло

UDC 615.35.015:577.15:615.243:615.272

D. V. Semeniv

STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTION OF OINTMENT WITH ARONIA MELANOCARPA OIL

According to medical statistics the prevalence of pathologies accompanied by wound process is extremely high. Considering orientation of pharmacologically active substances ointment with Aronia melanocarpa oil is perspective to create a soft medicinal form with Aronia melanocarpa oil. The aim of this study was conducting research of anti-alterative activities of ointment with Aronia melanocarpa oil in comparison with sea buckthorn oil on the model of aseptic chronic inflammation of the skin and subcutaneous tissue in rats. During these studies it was found that according to anti-alterative activity (area of wounds, speed healing, temperature of skin) ointment with Aronia melanocarpa oil showed more pronounced pharmacological activity then sea buckthorn oil.

Key words: ointment with Aronia melanocarpa oil; wound process; anti-alterative activities; sea buckthorn oil

Адреса для листування:
Семенів Дмитро Васильович.
76006, м. Івано-Франківськ,
вул. І. Миколайчука, 14/66, а/с 30.

Надійшла до редакції:
12.03.2014 р.

УДК 615.322:615.26:616.517:577.127.4

А. Л. Загайко, Л. В. Галузинская

Национальный фармацевтический университет

ПОИСК НОВЫХ СУБСТАНЦИЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

В комплексном лечении псориаза важная роль отводится препаратам с противовоспалительной и репаративной активностью. В связи с этим поиск новых эффективных средств для местного применения, влияющих на облегчение течения псориаза, остается актуальным. Полученные данные свидетельствуют о том, что крем «Энопсор» проявил выраженные противовоспалительные и репаративные свойства на модели воспаления кожи с преобладанием альтерации – ультрафиолетовой эритемы. Это позволяет высказать предположение, что в механизме противовоспалительного и репаративного действия ведущую роль играет стабилизация клеточных мембран, опосредованная ингибированием ПОЛ и восстановлением антиоксидантной защиты организма.

Ключевые слова: псориаз; противовоспалительная активность; альтерация; полифенолы

ВСТУПЛЕНИЕ

Псориаз – хроническое воспалительное заболевание, дерматоз, характеризующийся шелушащимися папулезными высыпаниями на коже, в патогенезе которого отчетливую роль играют наследственность и различные провоцирующие факторы [8, 9]. Псориаз характеризуется нарушениями размножения и созревания основных клеток кожи – кератиноцитов, а также многообразными биохимическими, иммунологическими и сосудистыми изменениями в коже и определенной связью с функциональным состоянием нервной системы. В последнее время большое значение в патогенезе псориаза придается нарушениям иммунной системы. Терапия псориаза должна быть комплексной и сочетать применение препаратов для местной (наружной) и системной терапии [2, 10]. Выбор того или иного препарата местного действия зависит от стадии болезни. При данной патологии целесообразно использовать противовоспалительные средства и гормональные местные препараты, которые снимают воспаление, ускоряют регенерацию, однако при их длительном применении высока вероятность осложнений в виде аллергических реакций или дерматитов [5].

Арсенал современных противопсориазных средств местной терапии, представленный на фармацевтическом рынке Украины, не удовлетворяет современным требованиям к эффективности, особенностям технологии, безвредности и цене. Среди элементов комплексного лечения псориаза немаловажная роль принадлежит препаратам с противовос-

палительной, репаративной активностью. В связи с этим поиск новых эффективных средств для местного применения, оказывающих влияние на облегчение течения псориаза, остается актуальным [1].

Одним из перспективных направлений современной фармакологии является использование биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения. В частности, для создания противопсориазных средств интерес представляют экстракты из семян Винограда культурного, которые содержат полифенолы, демонстрирующие репаративные, противовоспалительные, антиоксидантные свойства, которые могут обеспечить ранозаживляющее действие [7]. Для получения концентратов полифенолов винограда в Украине существует достаточная сырьевая база. Вышеназванные факторы стали предпосылкой для фармакологического изучения крема с полифенольным концентратом Винограда культурного под условным названием «Энопсор».

Целью данного исследования являлось изучение влияния нового крема с полифенольным концентратом Винограда культурного на механизмы раневого процесса и безопасность при лечении патологий кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Влияние крема «Энопсор» на течение раневого процесса с преобладающими альтеративными изменениями изучали на модели ультрафиолетовой эритемы у морских свинок [4]. В качестве препарата сравнения использовали гель с экстрактом ромашки «Камагель». Предварительно удаляли шерстный покров на животе животных, морских свинок фиксировали

Таблица 1

**ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРЕМА «ЭНОПСОР»
НА МОДЕЛИ УФ-ЭРИТЕМЫ (M±m, n=8)**

Условия опыта	Степень повреждения, у.е.				
	1-е сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	10 сутки
Контроль	23,5±1,05	20,5±1,1	17,2±3,1	7,2±0,7	2,9±0,05
«Камагель»	22,8±2,0	18,3±1,2	13,2±0,9	3,0±0,2	0,1±0,0
«Энопсор»	21,90±2,3	14,00±0,93*	10,50±0,71*	1,90±0,02	0,00±0,00

Примечание: * – отклонение достоверно относительно контроля $P \leq 0,05$.

животом вверх, кожу закрывали пластинкой, непроницаемой для УФ-лучей с четырьмя отверстиями площадью 1 см² каждое (температура воздуха над поверхностью кожи не должна превышать 30°C и в случае необходимости следует обдувать кожу вентилятором) и облучали ультрафиолетовым светом. Источник – ртутно-кварцевая лампа 400 ватт, помещенная на расстоянии 10 см от поверхности кожи, облучение – в течение 60 сек. Через 5 часов оценивали степень гиперемии каждого пятна по 4-х бальной системе (максимально возможная степень покраснения у каждого животного – 16 баллов). Учитывали степень угнетения гиперемии кожи у леченных животных в сравнении с контрольными показателями и выражали в процентах [4].

Изучение возможного аллергизирующего действия крема с полифенольным концентратом Винограда культурного проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6]. В эксперименте использовали беспородных морских свинок массой 350-410 г. Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа служила контролем, 2-я группа – животные, которым на выстриженные участки кожи наносили крем «Энопсор» ежедневно. Тестирование проводили в 1-ю и 2-ю фазу по кожной сенсibilизации. В 1-й фазе сенсibilизирующих свойств кожи не выявлено. Отсутствие явлений сенсibilизации позволило продолжить нанесение аппликаций до 2-й фазы. На 20-й день тестирование повторили. На месте нанесения разрешающей дозы отмечали состояние кожи в 1-й час, а затем через 24 часа и выражали в баллах: 1 балл – точечная слабая гиперемия; 2 балла – точечная гиперемия выражена; 3 балла – сплошная умеренная гиперемия; 4 балла – сплошная выраженная гиперемия и инфильтрация.

Все полученные результаты исследований обрабатывали с использованием специальной программы Statistica 5,0 for Windows для ПК. Статистическая обработка результатов проведенных исследований осуществлена с помощью коэффициентов Стьюдента (t) и Вилкоксона-Манна-Уитни (w) [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ультрафиолетовое облучение участка кожи у экспериментальных животных вызвало повреждение, характеризующееся гиперемией и отеком. Восста-

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ КРЕМА «ЭНОПСОР» НА СОСТОЯНИЕ
КОЖНОГО ПОКРОВА МОРСКИХ СВИНОК
(M±m, n=8)**

Группа животных	Толщина кожной складки, мм		
	Сроки исследования, дни		
	исходные данные	10-й день	20-й день
Контроль	3,10±0,01	3,100±0,033	2,90±0,02
«Энопсор»	3,20±0,02	3,200±0,031	2,600±0,019

новление кожного покрова у морских свинок группы контрольной патологии в данном эксперименте длилось 10 дней.

Полученные результаты указывают на выраженные противовоспалительные и репаративные свойства крема «Энопсор» и «Камагель» (табл. 1). На 3-и сутки после ультрафиолетового облучения под влиянием крема «Энопсор» и «Камагель» наблюдалось снижение интенсивности повреждения по сравнению с группой контрольной патологии на 32 % и 13 %, соответственно, на 5-е сутки – на 42 % и 34 %, соответственно, на 7-е – на 74 % и 59 %, соответственно (табл. 1).

Последние данные свидетельствуют о заживлении ультрафиолетовой эритемы. Это подтверждают и результаты макроскопического обследования экспериментальных животных: под влиянием крема «Энопсор» и «Камагель» на 2-е сутки снижалась отечность поврежденных участков, на 4-5-е сутки – начиналось шелушение, а на 6-7-е сутки – наступало полное заживление, тогда как у контрольных животных снижение отека происходило на 3-4 сутки, а полное заживление наступало на 9-10 день.

Изучение возможного аллергизирующего действия крема «Энопсор» проводили в соответствии с методическими рекомендациями, используя метод накожных аппликаций. Результаты представлены в табл. 2.

Проведенные исследования показали, что ежедневные аппликации изучаемого препарата не влияли на общее состояние животных. Морские свинки были активными, кожный покров соответствовал норме, каких-либо изменений в виде гиперемии, инфильт-

раций, шелушений, отеков не наблюдалось. Толщина кожной складки также практически не изменилась как в контроле, так и в опытной группе.

ВЫВОДЫ

Таким образом, крем «Энопсор» проявил выраженные противовоспалительные и репаративные свойства на модели воспаления кожи с преобладанием альтерации – ультрафиолетовой эритемы. Полученные результаты на данной модели позволяют высказать предположение, что в механизме противовоспалительного и репаративного действия за счет содержания полифенолов существенную роль играет стабилизация мембран клеток, опосредуемая ингибированием ПОЛ и восстановлением антиоксидантной защиты организма. При изучении алергизирующего действия крема «Энопсор» со стороны кожных покровов каких-либо видимых изменений в виде гиперемии, инфильтрации и других нарушений не возникло, что свидетельствует об отсутствии сенсibiliзирующего действия крема из полифенольного концентрата Винограда культурного.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Буянова О. В. Стан проблеми етіопатогенезу, лікування хворих на псоріаз в Україні, розробка сучасних теорій: [огляд сучасних літературних даних та обґрунтування перспективних напрямків подальших досліджень] / О. В. Буянова, Х. Д. Аль-Рамлаві // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. – 2005. – № 5. – С. 36-39.
2. Владимиров В. В. Современные представления о псориазе и методы его лечения / В. В. Владимиров, Л. В. Меньшикова // Рус. мед. журн. – 2001. – Т. 6, № 20. – С. 1318-1323.
3. Глянц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / Під ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
5. Кочергин Н. Г. Выбор наружного стероидного средства – где истина? / Н. Г. Кочергин, Л. М. Смирнова, Л. В. Траксель // Клин. дерматол., венерол. – 2003. – № 3. – С. 74-76.
6. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. – М., 1988. – 19 с.
7. Сторожок Н. Н. Биологическое действие природных антиоксидантов / Н. Н. Сторожок // Провизор. – 1998. – №2. – С. 50-52.
8. Dreno B. Follow-up psoriasis: observation and therapeutic / [B. Dreno, A. Finlay, M. Corvest et al.] // JEADV. – 2001. – Vol. 14., Suppl. 1. – P. 231.
9. Finlay A. Psoriasis and everyday life: first results on 1866 subjects / [A. Finlay, M. Corvest, P. Lefrancois et al.] // JEADV. – 2002. – Vol. 16. – P. 231.
10. Krueger J. G. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis / J. G. Krueger, A. Bowcock // Ann. Rheumat. Dis. – 2005. – Vol. 64. – P. 1130-1136.

УДК 615.322:615.26:616.517:577.127.4**А. Л. Загайко, Л. В. Галузінська****ПОШУК НОВИХ СУБСТАНЦІЙ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПСОРІАЗУ**

У комплексному лікуванні псоріазу важлива роль відводиться препаратам з протизапальною та репаративною активністю. У зв'язку з цим пошук нових ефективних засобів для місцевого застосування, що впливають на полегшення перебігу псоріазу, залишається актуальним. Отримані дані свідчать про те, що крем «Енопсор» проявив виражені протизапальні та репаративні властивості на моделі запалення шкіри з переважанням альтерації – ультрафіолетової еритеми. Це дозволяє висловити припущення, що в механізмі протизапальної та репаративної дії провідну роль відіграє стабілізація клітинних мембран, опосередкована інгібуванням ПОЛ та відновленням антиоксидантного захисту організму.

Ключові слова: псоріаз; протизапальна активність; альтерація; поліфеноли

UDC 615.322:615.26:616.517:577.127.4**A. L. Zagayko, L. V. Galuzinskaya****THE SEARCH OF NEW SUBSTANCES OF PLANT ORIGIN FOR TREATMENT OF PSORIASIS**

The medicines with anti-inflammatory and reparative activities have the important role in the complex treatment of psoriasis. In connection with this fact the search of new effective means for the local use, what influence on the facilitation of the psoriasis clinical course, remains actual. These data prove that the cream "Enopsor" has shown a pronounced anti-inflammatory and reparative properties on the model of skin inflammation with dominated alteration – ultraviolet erythema. This allows us to suppose that the leading role has the stabilization of cell membranes, mediated inhibition of LPO (lipid peroxidation) and restoring the antioxidant defense of organism.

Key words: psoriasis; anti-inflammatory activity; alteration; polyphenols

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (057) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:
03.03.2014 р.

Фармацевтична, токсикологічна хімія та фармакогнозія

Рецензенти рубрики:

Вишневська Л. І.,
д. фарм. н., професор

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

Прийменко Б. О.,
д. фарм. н., професор

Бондар В. С.,
д. фарм. н., професор



УДК 615.32:582.883.4:581.45

Ю. Н. Авідзба, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, А. М. Комісаренко

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ КОМПЛЕКСНОЇ ПЕРЕРОБКИ ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ ПІСЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ

Вивчено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук гідрофільних екстрактів з листя евкаліпту, одержаних зі шроту та дистилату після виробництва ефірної олії. Встановлено, що екстракти містять амінокислоти, полісахариди, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, значну кількість дубильних речовин, що гідролізуються. Вивчено їх якісний склад та кількісний вміст основних груп БАР. Досліджено антимікробну, протизапальну та анаболізуючу активність сумарного сухого екстракту з листя евкаліпту, одержаного шляхом комплексної переробки.

Ключові слова: *Eucalyptus viminalis* Labill.; листя; гідрофільний екстракт; хімічний склад; антимікробна, анаболізуюча, протизапальна активність

ВСТУП

Перспективним напрямом розвитку сучасної фітохімії є створення нових лікарських препаратів шляхом комплексної переробки різної рослинної сировини. Це дозволить забезпечити розширення номенклатури вітчизняних препаратів, раціонально використовувати природні ресурси, підвищити рентабельність виробництва та зменшити його негативний вплив на навколишнє середовище.

Раніше нами було проведено вивчення біологічно активних речовин листя евкаліпту прутноподібного (*Eucalyptus viminalis* Labill.). На основі порівняльного вивчення якісного складу та кількісного вмісту біологічно активних речовин (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, полісахаридів та амінокислот) листя та шроту листя *Eucalyptus viminalis* Labill. після виробництва густого екстракту хлорофілиту науково обґрунтовано можливість створення комплексної технології отримання нового лікарського засобу «Евкабол» [4, 6].

Продовжуючи дослідження в цьому напрямку, було доцільно дослідити хімічний склад та фармакологічну активність продуктів комплексної переробки листя евкаліпту після одержання ефірної олії, оскільки щорічно в Україні відходами виробництва ефірної олії евкаліпту стають близько 100 тонн шроту листя евкаліпту та 3000000 л водної витяжки, які містять значну кількість БАР.

Отже, метою наших досліджень було вивчення хімічного складу та фармакологічної активності ек-

страктів з листя евкаліпту, одержаних шляхом комплексної переробки.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом нашого дослідження був водний екстракт, 50 % спиртовий екстракт та сумарний сухий екстракт з листя евкаліпту (*Folia E. viminalis* Labill.), які були одержані шляхом комплексної переробки після одержання ефірної олії.

Для одержання екстрактів 1,0 кг листя евкаліпту заливали 30 л води очищеної, проводили перегонку ефірної олії протягом 1 години. Водну витяжку зливали, робили відбір проби, яку в подальшому і аналізували (екстракт 1). До шроту, який залишився після одержання ефірної олії, додавали 3,0 л 50 % спирту етилового і проводили екстракцію протягом доби. Екстракцію повторювали тричі. 50 % спиртові екстракти об'єднували, робили відбір проби, яку в подальшому і аналізували (екстракт 2). В подальшому залишки одержаних водних та 50 % спиртових витяжок об'єднували, упарювали при температурі 85-95 °C під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 680-700 мм рт. ст. до об'єму водного залишку 2,0 л. Кубовий залишок – це густа прозора темно-коричнева рідина, яку залишали для відстоювання на 4-5 діб у холодильнику. Одержаний водний концентрат сушили у розпилювальній сушильні з температурою теплоносія на вході 160 °C і 80-90 °C на виході до сухого екстракту (екстракт 3).

Для встановлення якісного складу екстрактів використовували загальноприйняті методи досліджень – якісні реакції, паперову (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ) [2, 4, 6].

© Авідзба Ю. Н., Кошовий О. М., Кухтенко О. С.,
Комісаренко А. М., 2014

Таблиця 1

КІЛЬКІСНИЙ ВМІСТ ОСНОВНИХ ГРУП БАР В ЕКСТРАКТАХ З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ

Група БАР, що визначалась, та використаний метод	Кількісний вміст, %		
	екстракт 1	екстракт 2	екстракт 3
Сухий залишок			
Гравіметрія згідно з ДФУ	7,92	5,43-	–
Похідні гідроксикоричної кислоти			
Спектрофотометричний метод в перерахунку на хлорогенову кислоту	3,32±0,02	2,76±0,01	2,91±0,03
Флавоноїди			
Спектрофотометричний метод у перерахунку на рутин	1,63±0,03	6,11±0,05	4,41±0,05
Фенольні сполуки			
Спектрофотометричний метод у перерахунку на галову кислоту	21,4	37,9	32,01±0,03

Попереднє хроматографічне вивчення якісного складу амінокислот в екстрактах з листя евкаліпту проводили методом висхідної хроматографії на хроматографічному папері «Filtrak № 4» у системі розчинників н-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:2). Для порівняння використовували стандартний набір амінокислот (ТУ 6-09-3147-83) у концентрації 0,1 %. Хроматограми обробляли 0,2 % розчином нігіндрину в ацетоні та висушували у сушильній шафі при температурі 60-80 °С. Амінокислоти ідентифікували порівнянням значень R_f з вірогідними зразками при паралельному хроматографуванні. В цілому виявлено 7 амінокислот.

Ідентифікацію моноцукрів проводили за допомогою паперової хроматографії низхідним способом в системі н-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:2) з достовірними зразками нейтральних моноцукрів. Хроматограми проявляли розчином анілінфталату. В екстракті були ідентифіковані глюкоза, галактоза та рамноза, а після гідролізу ще й арабіноза.

Гідроксикоричні кислоти та флавоноїди вивчали методом двовимірної ПХ у порівнянні з вірогідними зразками гідроксикоричних кислот та флавоноїдів у системах н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2) та 5 % оцтова кислота з наступною обробкою хроматограм парами аміаку.

Для виявлення кумаринів екстракти хроматографували (ПХ) в системах хлороформ (формамід 25 %) та гексан (формамід 25 %) з наступним переглядом хроматограм у фільтрованому УФ-світлі до та після обробки 10 % спиртовим розчином калію гідроксиду.

У результаті хроматографічного вивчення екстрактів та продуктів їх гідролізу (5 % сірчана кислота) за допомогою ПХ в системах: I – н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2), II – 5 %, III – 30 % та IV – 60 % оцтова кислота з використанням 1 % спиртового розчину заліза хлориду (III) як хромогенного реактиву встановили наявність галової, елагової кислот, гало- та елаготанінів.

У результаті попереднього хімічного та хроматографічного дослідження отриманих екстрактів вста-

новлено наявність таких груп БАР, як похідні гідроксикоричної кислоти, флавоноїди та поліфенольні сполуки, амінокислоти та цукри.

У цілому в екстрактах з листя *Eucalyptus viminalis* Labill. було виявлено: 2 фенолкарбонові кислоти – галову та елагову; 5 похідних гідроксикоричної кислоти – *n*-кумарову, кавову, ферулову, хлорогенову та неохлорогенову; 6 кумаринів – кумарин, умбеліферон, скополетин, дафноретин, скимін і скополін; 8 флавоноїдів і їх глікозидів – лютеолін, мірицетин, кверцетин, кемпферол, ізорамнетин, ізокверцитрин, астрагалін та ізорамнетину-3-О-β-D-глюкопіранозид.

Кількісне визначення БАР проводили спектрофотометричним методом. Похідні гідроксикоричної кислоти в перерахунку на хлорогенову кислоту визначали при довжині хвилі 327 нм; флавоноїди в перерахунку на рутин після утворення комплексу з алюмінієм хлоридом – при 417 нм; поліфенольні сполуки в перерахунку на галову кислоту – при довжині хвилі 270 нм. Оптичну густину вимірювали у кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі Specol 1500 (Швейцарія). Для статистичної достовірності результатів визначення проводили не менше 5 разів (табл. 1) [2, 4, 6].

Вивчення антибактеріальної активності екстрактів проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ під керівництвом канд. біол. н. Осолодченко Т. П. [1, 6]. Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* 885/653 ATCC. Використовували 1 % водні розчини екстрактів. Екстракти зі шроту листя евкаліпту виявляють антибактеріальну дію по відношенню до *S.aureus*, *E.coli* та *B.subtilis*.

Протизапальну активність сумарного сухого екстракту досліджували у дослідах на білих мишах масою 17-22 г на моделі формалінового набряку [1]. Пре-

Таблиця 2

**ВПЛИВ 10-ТИ ДЕННОГО ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОГО ВВЕДЕННЯ ЕКСТРАКТУ
З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ НА ВМІСТ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА ТА ДНК В М'ЯЗАХ ЩУРІВ**

Препарат	Доза, мг/кг	N	ДНК		Загальний білок	
			мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %	мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %
Контроль	–	7	445±50,1	–	121±5,13	–
Екстракт евкаліпту	200	5	526±62,3	+18	124±3,88	+1
	600	5	623±51,2	+40	143±3,51	+18
Калію оротат	200	5	521±45,5	+17	131±1,85	+8

паратом порівняння обрали вольтарен [3]. Дослідні тварини поділили на три групи: контрольна група, група тварин, яких лікували екстрактом евкаліпту, та група тварин, яких лікували препаратом порівняння. Ступінь протизапальної активності екстракту оцінювали за антиексудативним ефектом. Для відтворення гострого асептичного ексудативного запалення використовували як флоген 2 % розчин формаліну, який вводили субплантарно в кількості 0,05 мл через 1 годину після перорального введення досліджуваного екстракту евкаліпту, препарату порівняння вольтарену і у контрольній групі – води. Активність досліджуваних засобів вивчали за їх здатністю зменшувати розвиток набряку в порівнянні з контролем.

Отримані на моделі формалінового набряку у мишей результати свідчать про виражену протизапальну активність сухого екстракту з листя евкаліпту, отриманого шляхом комплексної переробки. Максимальний антиексудативний ефект екстракту 64,54 % спостерігався у дозі 20 мг/кг.

Співробітниками ДП ДНЦЛЗ за нашою участю в лабораторії загальної фармакології під керівництвом к. м. н. Чайки Л. О. проведені дослідження з виявлення та вивчення анаболічної активності сухого екстракту з листя евкаліпту. Дослідження проводились в порівнянні з відомим нестероїдним анаболічним препаратом калію оротатом («Борщагівський ХФЗ», сер. 1411, придатний до Х1.2012 г.) [3, 6].

Як показники анаболічної дії, вибрали вміст ДНК та загального білка, котрі визначали в тканинах м'язів [5, 6, 7].

Дослідження проводили на 23 нелінійних щурах-самцях. Препарати вводили внутрішньошлунково кожен день протягом 10 діб: екстракт евкаліпту – в дозах 200 та 600 мг/кг (по насипній масі), що відповідає 2 % та 6 % від вищої разової дози екстракту; калію оротат – у дозі 200 мг/кг (по калію оротату). Контрольній групі тварин вводили воду очищену в еквівалентному об'ємі.

Через 24 години після останнього введення дослідних препаратів щурів декапітували, вилучали печінку та м'яз задньої сторони стегна. М'яз заморожували і зберігали в рідкому азоті. Для проведення дослідження тканини подрібнювали: печінку пропускали через прес, м'яз розтирали у фарфоровій ступці в рід-

кому азоті. В подрібнених тканинах визначали вміст ДНК за методом Трудолюбової М. Г. [5] та загального білка за методом Miller G. I. [7].

Десятиденне внутрішньошлункове введення щурів екстракту з листя евкаліпту в дозі 200 мг/кг створює помітну тенденцію до підвищення вмісту ДНК у м'язі на 18 %. Вміст білка при цій дозі екстракту не змінюється (табл. 2). При введенні екстракту в дозі 600 мг/кг зареєстровано значне достовірне підвищення рівня ДНК в м'язі на 40 % при достовірному зростанні вмісту загального білка на 18 %. Калію оротат у дозі 200 мг/кг на вміст ДНК та загального білка в м'язі щурів спричиняє ефект, порівняний для дози екстракту 200 мг/кг.

При визначенні вмісту ДНК та загального білка в печінці щурів, які отримували екстракт у зазначених дозах, не виявлено будь-яких змін в їх рівні. Тобто, десятиденне внутрішньошлункове введення екстракту в дозах 200 та 600 мг/кг спричиняє дозозалежну анаболізуючу активність на м'яз щурів, підвищуючи вміст ДНК та загального білка.

Отримані результати попереднього дослідження показали перспективність подальшого дослідження дії сухого екстракту з листя евкаліпту на синтезуючу білок систему організму.

Проведені фармакологічні дослідження вказали на перспективність використання екстракту з листя евкаліпту, отриманого шляхом комплексної переробки як антибактеріального, протизапального та анаболізуючого засобу.

ВИСНОВКИ

Вивчено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у сухому екстракті з листя евкаліпту, одержаного шляхом комплексної переробки, досліджено його антимікробну, протизапальну та анаболізуючу активність, що свідчить про перспективність використання його для створення нових лікарських засобів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Здоров'я, 2001. – С. 292-306.

2. Ковальова А. М. Розробка методу стандартизації нового лікарського засобу піфламін / [А. М. Ковальова, Г. В. Георгієвський, В. М. Ковальов та ін.] // Фармаком. – 2002. – № 2. – С. 92-97.
3. Компендиум. Лекарственные препараты 2011 г. / Под ред. проф. В. Н. Коваленко и проф. А. П. Витторова. – К.: Морион, 2011. – 2911 с.
4. Кошовий О. М. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпту / [О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко, А. М. Ковальова та ін.] // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 151-161.
5. Трудюлюбова М. Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных. Современные методы биохимии / Под ред. В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – С. 113-116.
6. Koshoviy O. M. A new herbal remedy with anabolic activity on the basis of hydrophilic compounds of Eucalyptus leaves / [O. M. Koshoviy, V. S. Kyslichenko, V. V. Velma et al.] // Herba Polonica. – 2008. – Vol. 55, № 1. – P. 72-77.
7. Miller G. I. Protein determination for large number of sample / G. I. Miller // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31, № 5. – P. 964-966.

УДК 615.32:582.883.4:581.45

Ю. Н. Авидзба, О. Н. Кошевой, А. С. Кухтенко, А. Н. Комиссаренко

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЭФИРНОГО МАСЛА

Изучен качественный состав и количественное содержание фенольных соединений гидрофильных экстрактов из листьев эвкалипта, полученных из шрота и дистиллята после производства эфирного масла. Установлено, что экстракты содержат аминокислоты, полисахариды, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, значительное количество гидролизуемых дубильных веществ. Изучен их качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ. Исследована антимикробная, противовоспалительная и анаболизирующая активность суммарного сухого экстракта из листьев эвкалипта, полученного путем комплексной переработки.

Ключевые слова: Eucalyptus viminalis Labill.; листья; гидрофильный экстракт; химический состав; антимикробная, анаболизирующая, противовоспалительная активность

UDC 615.32:582.883.4:581.45

Yu. N. Avidzba, O. M. Koshoviy, O. S. Kukhtenko, A. M. Komissarenko

STUDY OF INTEGRATED PROCESSING PRODUCTS FROM EUCALYPTUS LEAVES AFTER PRODUCTION ESSENTIAL OIL

The qualitative and quantitative composition of phenolic compounds content of eucalyptus leaves hydrophilic extracts derived from the waste and the distillation liquid after essential oil production were studied. It has been established that the extracts contain aminoacids, polysaccharides, hydroxycinnamic acids, flavonoids, a significant amount of the hydrolyzable tannins. Qualitative and quantitative composition of basic biological active substances were studied. Antimicrobial, anti-inflammatory and anabolic activity of total dry extract from Eucalyptus leaves, obtained by complex processing were investigated.

Key words: Eucalyptus viminalis Labill.; leaves; hydrophilic extract; chemical composition; antimicrobial, anabolic, anti-inflammatory activity

Адреса для листування:

61146, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Тел. (0572) 67-57-97, 67-91-51.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:

12.02.2014 р.

УДК 543.888:615.322

А. В. Глущенко

Національний фармацевтичний університет

МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ В ЕКСТРАКТАХ КУРАЮ ПАГОРБКОВОГО (SALSOLA COLLINA L.)

У статті наведена методика кількісного визначення флавоноїдів в екстрактах з наземної частини кураю пагорбкового. Визначення флавоноїдів проведено у водному та спиртових (30 %, 50 % та 70 %) екстрактах з рослинної сировини у співвідношенні 1:20 спектрофотометричним методом за довжини хвилі 411 нм методом стандарту. Встановлено, що у надземній частині кураю пагорбкового міститься до 0,52 % флавоноїдів, причому їх найбільший вміст визначається у 70 % вилученні у перерахунку на рутин. Результати дослідження будуть використані для розробки методик контролю якості на дану сировину.

Ключові слова: курай пагорбковий; надземна частина; флавоноїди; спектрофотометричне визначення

ВСТУП

Питання стандартизації та контролю якості лікарської рослинної сировини і лікарських засобів з рослинної сировини, що виробляються в Україні, продовжують залишатися дуже актуальними, що пояснюється цілою низкою причин:

- динаміка кількості лікарських засобів, що реєструються в Україні, показує, що зростає загальна кількість як зарубіжних, так і вітчизняних лікарських засобів рослинного походження або отриманих з використанням компонентів рослинного походження;
- з'являються комплексні підприємства, що виробляють препарати з рослинної сировини, починаючи з обробки культивованих (або заготовлених дикорослих) рослин до переробки рослинної сировини, отримання різних зборів і фасованої продукції;
- у медичну практику вводяться нові види ЛРС, а також препарати на основі раніше відомих лікарських рослин вітчизняної флори і зарубіжних країн.

Вищезазначені фактори обумовлюють необхідність стандартизації рослинної сировини та розробки аналітичної нормативної документації, яка дозволить здійснити стандартизацію ЛРС з урахуванням індивідуальних властивостей і видової належності.

Відомо, що флавоноїди виявляють високу біологічну активність завдяки наявності у молекулі активних фенольних гідроксильних та карбонільних груп, які у ході різних біохімічних модифікацій беруть участь у ряді фізіологічних процесів та вияв-

ляють широкий спектр фармакологічної активності [2, 7, 9]. Особливої уваги набуває виражена антиоксидантна, імуномодельюча, гепатопротекторна дія та інші [11, 12].

Серед методик, які найчастіше зустрічаються для кількісного визначення суми флавоноїдів, можна виділити дві групи. Перша група – прямі спектрофотометричні методики з розрахунком кількісного вмісту методом показника поглинання після попереднього розділення або хроматографічного виділення флавоноїдів із сировини чи готового лікарського засобу [3, 4, 8]. Ці методики є тривалими, вони використовуються для фітохімічних досліджень нової лікарської сировини, оскільки дозволяють визначити окремі підкласи сполук і встановити власне видову належність тієї чи іншої рослинної сировини, звичайно, після попереднього хроматографічного розділення класів біологічно активних речовин (БАР). Такі методики практично не мають значення при створенні аналітичної нормативної документації на сировину чи готові лікарські засоби.

Друга група методик – це методики із застосуванням стандарту [5]. Попередньо проводиться гідроліз усіх форм флавоноїдів до агліконів, а потім для отримання забарвленого продукту використовують реакцію комплексоутворення алюмінію хлориду з виділеними агліконами. Ця методика застосовується для контролю якості ЛРС відповідно до вимог чинної ДФУ [1].

Згідно з даними, що доводять літературні джерела, кураї містять флавоноїди, представлені головним чином, похідними кемпферолу або кверцетину, і ізофлавоноїдами (5,2-дигідрокси-5-метокси-6,7-метилендіокси-ізофлавоон) [1].

© Глущенко А. В., 2014

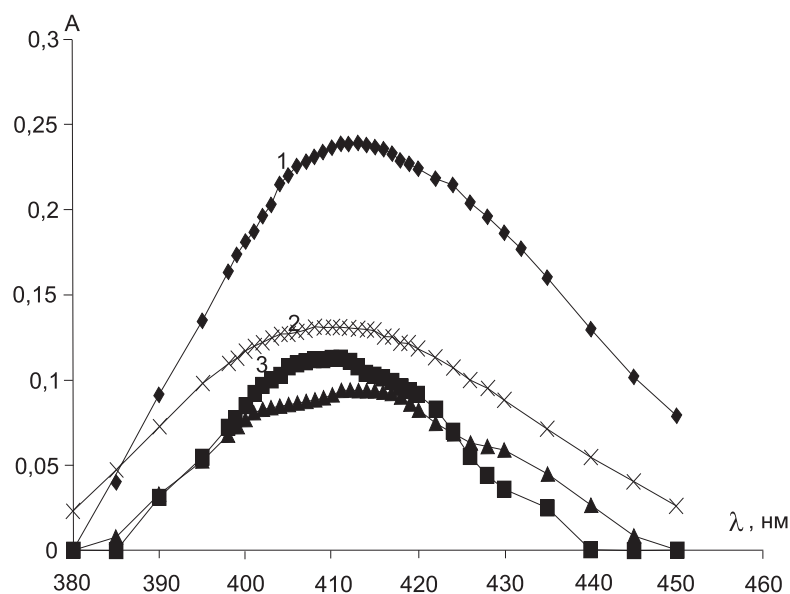


Рис. Спектр поглинання розчину рутину (1), 70 % спиртового екстракту кураю (2), 30 % спиртового екстракту кураю (3), 50 % спиртового екстракту кураю (4) після додавання розчину алюмінію хлориду.

Тому метою нашого дослідження є визначення кількісного вмісту флавоноїдів у надземній частині кураю пагорбкового (*Salsola collina* L.), який з нашої точки зору може стати перспективною сировиною для створення нового гепатозахисного препарату.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження є повітряно-суха подрібнена надземна частина кураю пагорбкового (*Salsola collina* L.) родини Мареві (*Chenopodiaceae*). Сировину заготовляли у 2012 р. у місті Барнаул у період масового цвітіння рослин і готували водні та спиртові (30 %, 50 % та 70 %) екстракти з рослинної сировини у співвідношенні 1:20.

Для роботи використовували мірний посуд класу А і реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги «AXIS», спектрофотометр Evolution 60S.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення флавоноїдів проведено за методикою, описаною в літературі [6]. Попередньо нами були проведені реакції наших досліджуваних екстрактів з розчином алюмінію хлоридом і записані абсорбційні спектри поглинання отриманих забарвлених розчинів на спектрофотометрі в області від 385 нм до 500 нм (рис.).

Встановлено, що абсорбційні спектри досліджуваних розчинів характеризуються наявністю максимуму поглинання за довжини хвилі 411 нм, який відповідає максимуму поглинання розчину рутину після реакції взаємодії з розчином алюмінію хлориду у кислому середовищі. Тому визначення флавоноїдів у кураю пагорбковому ми проводили за наступною методикою.

Методика визначення флавоноїдів у сировині.

До 1 мл вихідного розчину додавали 1 мл реактиву алюмінію хлориду Р і доводили об'єм розчину розчином 5% кислоти оцтової льодяної в етанолі Р до 25,0 мл.

Розчин порівняння. 0,02 г (точна наважка) СЗ рутину розчиняли в 30 мл 96 % спирту при нагріванні на водяній бані, охолоджували і доводили об'єм розчину тим же розчинником до 50 мл. До 1 мл отриманого розчину додавали 1 мл реактиву алюмінію хлориду Р і доводили об'єм розчину розчином 5 % кислоти оцтової льодяної в етанолі Р до 25,0 мл.

Компенсаційний розчин. 1 мл вихідного розчину доводили розчином 5 % кислоти оцтової льодяної в етанолі до об'єму 25,0 мл.

Оптичну густину отриманих випробовуваних розчинів і розчину стандартного зразка рутину визначали на спектрофотометрі за довжини хвилі 411 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст флавоноїдів (х), у відсотках, у перерахунку на рутин обчислювали за формулою:

$$x = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot (100 - d)} \cdot 100\%,$$

де: A_0 – оптична густина розчину стандартної речовини рутину за довжини хвилі 411 нм;

A_1 – оптична густина досліджуемого розчину за довжини хвилі 411 нм;

m_0 – маса наважки рутину, г;

m_1 – маса наважки надземної частини кураю пагорбкового для приготування спиртового екстракту, г;

V_1 – об'єм мірної колби (50 мл) для приготування розчину рутину, мл;

V_2 – об'єм аліквоти (1 мл) отриманого розчину рутину, мл;

Таблиця

РЕЗУЛЬТАТИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ
І МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Екстракт	\bar{x} , %	S	$\bar{x} \pm \Delta x(\%)$	ϵ , %
водний	0,29	$2,79 \times 10^{-3}$	$2,93 \times 10^{-3}$	1,00
30 % спиртовий	0,45	$2,74 \times 10^{-3}$	$2,87 \times 10^{-3}$	0,64
50 % спиртовий	0,38	$4,05 \times 10^{-3}$	$4,25 \times 10^{-3}$	1,12
70 % спиртовий	0,52	$1,42 \times 10^{-2}$	$1,49 \times 10^{-2}$	2,84

Примітка. $P \leq 0,05$; $t(P, v) = 2,0576$; $n = 6$

V_3 – об'єм мірної колби (25 мл) для розведення розчину рутину, мл;

V_4 – об'єм мірної колби (100 мл) для приготування екстракту з надземної частини кураю пагорбкового, мл;

V_5 – об'єм аліквоти (1 мл) екстракту з надземної частини кураю пагорбкового для приготування досліджуваного розчину, мл;

V_6 – об'єм мірної колби (25 мл) для приготування досліджуваного розчину, мл;

d – показник вологості лікарської рослинної сировини надземної частини кураю пагорбкового, %.

Результати кількісного визначення вмісту флавоноїдів в екстрактах кураю пагорбкового у перерахунку на рутин наведені в таблиці.

ВИСНОВКИ

В ході проведеного спектрофотометричного дослідження встановлено, що найбільша кількість флавоноїдів (0,52 %) міститься у 70 % спиртовому екстракті кураю пагорбкового у перерахунку на рутин. Результати дослідження будуть використані для розробки методик контролю якості на дану сировину.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., 2 доп. – Х.: РІПЕГ, 2008. – 620 с.
2. Доркина Е. Г. Изучение гепатозащитного действия природных флавоноидных соединений / Е. Г. Доркина // Эксперим. клин. фармакол. – 2004. – Т. 67, № 6. – С. 41-44.
3. Кемертелидзе Э. П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения / Э. П. Кемертелидзе, В. П. Георгиевский. – Тбилиси: Изд-во «Мецниереба», 1976. – 222 с.
4. Клыков А. Г. Сезонная динамика содержания рутина и репродуктивность надземной фитомас-

сы у трех видов *Fagopyrum* Mill., выращиваемых в Приморском крае / А. Г. Клыков, Л. М. Моисеенко, П. Г. Горовой // Растит. ресурсы. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 77-82.

5. Котова Э. Э. Стандартизация плодов боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» / Э. Э. Котова, А. Г. Котов, Н. П. Хованская // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 35-41.
6. Криворучко О. В. Кількісне визначення флавоноїдів і полісахаридів у лікарських засобах з листя смородини чорної / О. В. Криворучко, О. Ю. Ткаченко, В. С. Кисличенко // Фармац. журн. – 2003. – № 4. – С. 76-78.
7. Оценка антиоксидантной и антитоксической эффективности природного флавоноида дигидро-кверцетина / [О. В. Кравченко, С. В. Морозов, Л. И. Авреньева и др.] // Токсикол. вестник. – 2005. – № 1. – С. 14-20.
8. Слеува Е. К. Оценка содержания суммы флавоноидов в настое / [Е. К. Слеува, Е. Н. Жукович, Л. А. Шарикова и др.] // Фармация. – 2003. – № 1. – С. 13-15.
9. Чернов Ю. Н. Полифенольные соединения: структура, свойства и прикладные аспекты применения / Ю. Н. Чернов, А. В. Бузлама, Ю. М. Дронова // Фарматека. – 2004. – № 8. – С. 43-48.
10. Beyaoui A. New antioxidant bibenzyl derivative and isoflavonoid from the Tunisian *Salsola tetrandra* Folsk / [A. Beyaoui, A. Chaari, H. Ghouila et al.] // Natural Product Res. – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 235-242.
11. Jin Yong-Sheng Chemical and biologically active constituents of *Salsola collina* / [Yong-Sheng Jin, Jing-Ling Du, Yan Yang et al.] // Chemistry of Natural Compounds. – 2011. – Vol. 47 (2). – P. 257-260.
12. Syrchina A. I. Flavonoids of *Salsola collina* / [A. I. Syrchina, A. L. Vereshchagin, M. F. Larin et al.] // Chemistry of Natural Compounds. – 1989. – Vol. 25 (5). – P. 619-620.

УДК 543.888:615.322**А. В. Глущенко****МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ СОЛЯНКИ ХОЛМОВОЙ (SALSOLA COLLINA L.)**

В статье описана методика количественного определения флавоноидов в экстрактах из надземной части солянки холмовой. Определение флавоноидов проведено в водном и спиртовых (30 %, 50 % и 70 % спирт) извлечениях из растительного сырья в соотношении 1:20 спектрофотометрическим методом при длине волны 411 нм методом стандарта. Установлено, что в надземной части солянки холмовой содержится до 0,52 % флавоноидов, причем их наибольшее содержание определяется в 70 % извлечении в пересчете на рутин. Результаты исследования будут использованы для разработки методик контроля качества на анализируемое сырье.

Ключевые слова: солянка холмовая; надземная часть; флавоноиды; спектрофотометрическое определение

UDC 543.888:615.322**A. V. Glushchenko****QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN THE EXTRACTS OF SALSOLA COLLINA L.**

In the review the method of quantitative determination of flavonoids in the extracts from above-ground of the Salsola collina has been presented. The determination of flavonoids has been carried out in aqua and ethanol (30 %, 50 %, 70 %) extracts by spectrophotometric method at wavelength set 411 nm by method of standards. Above 0,52 % of flavonoids in the above-ground of the Salsola collina have been founded. The highest content of flavonoids has been determined in 70 % ethanol extract. Results of this research will be used for the development of quality control methods for the analyzed herbal materials.

Key words: Salsola collina; flavonoids; above-ground; spectrophotometric determination

Адреса для листування:

61140, м. Харків, пл. Повстання, 17.

Тел. (057) 732-81-03, (050)-6666-071.

E-mail: alla_glush@mail.ru

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:

03.03.2014 р.

УДК 547.791/.792.02.057:615.015.4

А. Г. КАПЛАУШЕНКО

Запорізький державний медичний університет

АЦИЛЮВАННЯ 4-МОНО- ТА 4,5-ДИЗАМІЩЕНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ ТА ПОКАЗНИКИ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ

Досліджено реакцію ацилювання ряду 4-R₁-1,2,4-триазоліл-3-тіонів та 5-R-4-R₁1,2,4-триазоліл-3-тіонів. При цьому розроблені препаративні методики отримання відповідних 3-ацилтіопохідних, що передбачають нетривале нагрівання вихідних речовин у м'яких умовах. Встановлено, що більш тривале нагрівання вихідних тіонів з ангідридом ацетатної кислоти призводить до утворення діацильованих похідних, наявність яких підтверджена хромато-мас-спектрометрією. Будову синтезованих речовин підтверджено комплексним використанням фізико-хімічних методів аналізу, таких як елементний аналіз, ІЧ-спектроскопія та ПМР-спектрометрія. Дослідження гострої токсичності отриманих 3-ацетилтіо-4-R₁- та 5-R-4-R₁1,2,4-триазолів показали, що значення LD₅₀ даних сполук знаходяться в межах 947-1248 мг/кг і згідно з класифікацією І.К.Сидорова досліджувані речовини відносяться до IV класу, тобто є малотоксичними речовинами.

Ключові слова: 1,2,4-триазоли; ацилювання; гостра токсичність

ВСТУП

Ацилювання гідрокси-, тіо- аміно- та іміногруп – це реакції введення ацильних замісників у згадані протогетероатомні структурні одиниці шляхом заміщення атома водню в них або внаслідок приєднання ацилюючого реагента до протогетероатомної групи субстрату з утворенням ацилзаміщеної сполуки чи приєднання ацильного залишку по незв'язаній електронній парі гетероатома з утворенням онієвої солі [1].

Якщо поглянути ширше, то ацильним залишком вважається дегідроксильована частина будь-якої кислоти. Частковим, проте частим, випадком ацилювання є випадки, що супроводжуються введенням ацетильного залишку (CH₃CO, Ac) в молекулу. Цю реакцію використовують принаймні в трьох випадках: для формування певних структурних елементів на стадіях синтезу субстанції; для захисту протогетероатомних груп під час синтетичних операцій; для надання певних властивостей, в тому числі фармакологічних кінцевому продукту [1, 5, 8]. Вивчення реакцій ацилювання з використанням в якості вихідних субстратів 1,2,4-триазол-3-тіонів і визначення гострої токсичності отриманих продуктів і стали метою нашої роботи.

Теоретично 4-R₁-1,2,4-триазоліл-3-тіони і 5-R-4-R₁1,2,4-триазоліл-3-тіони можуть існувати в двох таутомерних формах [3-5], тому ацилювання останніх можливе як по атомах нітрогену, так і по атому сульфуру з утворенням відповідних N- або S-похідних. Кван-

тово-хімічні розрахунки молекул 1,2,4-триазолін-3-тіонів [3, 4], а також аналогічні розрахунки попередніх дослідників [5] показують, що найбільший електронегативний заряд має атом сірки, тому ми вважаємо, що реакція ацилювання 4-R₁-1,2,4-триазоліл-3-тіонів та 5-R-4-R₁1,2,4-триазоліл-3-тіонів буде проходити по атому сульфуру.

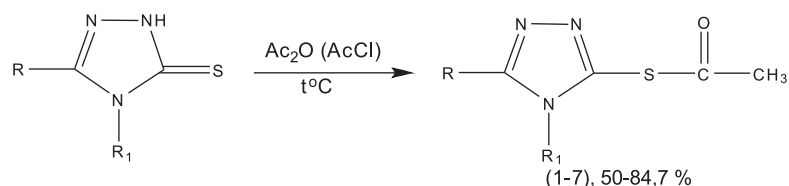
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як ацилюючі реагенти зазвичай використовуються ангідриди і хлорангідриди кислот, ціанати та ізоціанати, а також сульфохлориди кислот. Для ацилювання 4-моно- та 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіону на перших етапах ми використовували ангідрид та хлорангідрид ацетатної кислоти (рис. 1). Реакцію проводили нагріванням відповідних 4-R₁- та 5-R-4-R₁1,2,4-триазоліл-3-тіонів з ацилюючими агентами на водяній бані до повного розчинення вихідних речовин. В разі отримання 5-R-4-R₁-3-ацетилтіо-1,2,4-триазолів (5-7) суміш додатково нагрівали протягом 1 год на відкритому огрівнику.

Індивідуальність та будову 5-R-4-R₁-3-ацилтіо-1,2,4-триазолів (1-7, табл. 1) підтверджено методом тонкошарової хроматографії, а також методом хромато-мас-спектрометрії.

Так, при хроматографуванні 4-метил-3-ацетилтіо-1,2,4-триазолу (1) виявлено лише один пік (час утримування 0,450, рис. 2), що свідчить про індивідуальність та 100% чистоту досліджуваного зразка. У мас-спектрі [2] сполуки 2.106 (брутто-формула C₅H₉N₃OS, мол. маса 159 а.о.м.) зареєстровано пік

© Каплаушенко А. Г., 2014

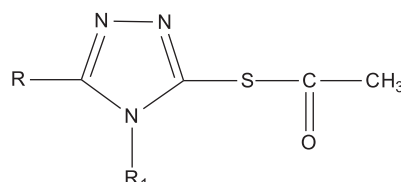


R=H, CH₃, C₅H₄N-4, R₁=CH₃, C₆H₅, C₆H₄-CH₃-2, C₆H₄-OCH₃-2

Рис. 1. Схема ацилювання 4-R₁- та 5-R-4-R₁-1,2,4-триазолі-3-тіонів.

Таблиця 1

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ КОНСТАНТИ 3-АЦЕТИЛТІО-4-R₁-5-R-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ



Сполука	R	R ₁	Т. пл., °C	Брутто-формула	Вихід, %	R _f x 100 ¹
1	H	CH ₃	171-173	C ₅ H ₉ N ₃ OS	73	85
2	H	C ₆ H ₅	193-195	C ₁₀ H ₉ N ₃ OS	84,5	76
3	H	C ₆ H ₄ -CH ₃ -2	241-243	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ OS	50	57
4	H	C ₆ H ₄ -OCH ₃ -2	222-224	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	61,3	53
5	CH ₃	C ₆ H ₄ -OCH ₃ -2	204-206	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	71	40
6	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₅	240 розкл.	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ OS	84,7	59
7	C ₅ H ₄ N-4	C ₆ H ₄ -OCH ₃ -2	250-252	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	61,3	92

Примітка. ¹ Коефіцієнти розподілу синтезованих речовин у системі ацетон:гексан:пропанол (2:1:1).

M⁺ з m/z 159. Фрагментація сполуки 1 проходить з відщепленням ацетильного фрагменту з утворенням іону з m/z 113, який розкладається до 3-тіо-1,2,4-триазолу (іон з m/z 97).

Напрямок проходження реакції ацилювання та будову синтезованих сполук підтверджено також з використанням елементного аналізу (табл. 2), ІЧ-спектроскопії (табл. 3) та ПМР-спектроскопії. В ІЧ-спектрах синтезованих сполук (1-7) виявлені смуги поглинання -C=N-груп при 1583-1550 см⁻¹, C-S-груп – 700-680 см⁻¹ та відсутні смуги при 2590-2550 см⁻¹, що характеризують валентні коливання SH-груп. Крім того, на відміну від ІЧ-спектрів вихідних тіонів аналогічні спектри 5-R-4-R₁-3-ацитіо-1,2,4-триазолів (1-7) наявні смуги поглинання CH₃CO-груп у межах 1360-1355 см⁻¹. В ІЧ-спектрах сполук, що містять ароматичний радикал (2-7), виявлені чіткі смуги коливань групи C₆H₅ при 1614-1602 см⁻¹ [2].

В ПМР-спектрі 4-метил-3-ацитіліо-1,2,4-триазолу (1) (рис. 3) наявні сигнали протонів метильної групи, зв'язаної з N₄ триазолового циклу (3,48 м.ч.), метильної групи ацетильного радикалу (2,50 м.ч.) та протону, зв'язаного з C₅ ядра 1,2,4-триазолу (8,54 м.ч.), і не знайдено сигналу протону тіогрупи [2].

Слід зазначити, що більш тривале нагрівання (5-7 год) вихідних тіонів з ангідридом ацетатної кислоти призводить до утворення суміші речовин. За допомогою хромато-мас-спектрометрії та паралельно ПМР-спектроскопії встановлено, що ацилювання проходить як по атому сульфуру, так і по N₂ (N₁) атому триазолового циклу. Але спроба виділити відповідні N-ацитіл-5-R-4-R₁-1,2,4-триазол-3-тіони не привела до успіху.

Дослідження на гостру токсичність проводили за експрес-методом В. Б. Прозоровського [6] на білих щурах лінії Вістар. Для визначення LD₅₀ 5-R₁-4-R₂-1,2,

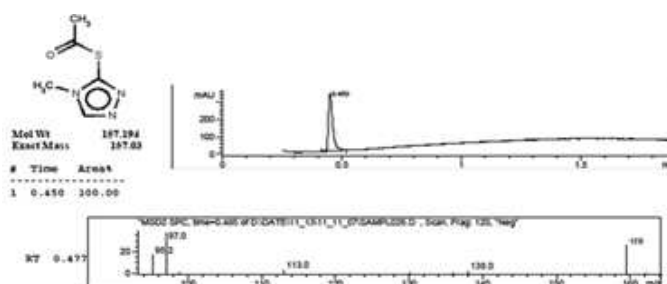


Рис. 2. Фрагмент хромато-мас-спектра 4-метил-3-ацитіліо-1,2,4-триазолу (1).

Таблиця 2

**РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕЛЕМЕНТНОГО СКЛАДУ 3-АЦЕТИЛТІО-4-R₁-5-R-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ
ТА 1-АЦЕТИЛ-3-ТІО-4-R₁-5-R-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ**

Сполука	Знайдено, %				Обчислено, %			
	C	H	N	S	C	H	N	S
1	38,17	4,15	26,84	20,78	38,20	4,49	26,73	20,40
2	54,83	4,11	18,78	14,75	54,78	4,14	19,16	14,62
3	56,51	4,83	17,91	13,93	56,63	4,75	18,01	13,74
4	53,07	4,31	16,93	12,63	53,00	4,45	16,86	12,80
5	53,64	4,62	18,23	14,58	54,28	5,01	18,99	14,49
6	61,21	4,13	22,01	12,26	61,40	3,96	22,03	12,61
7	58,47	4,47	16,96	9,50	58,54	4,88	17,07	9,76

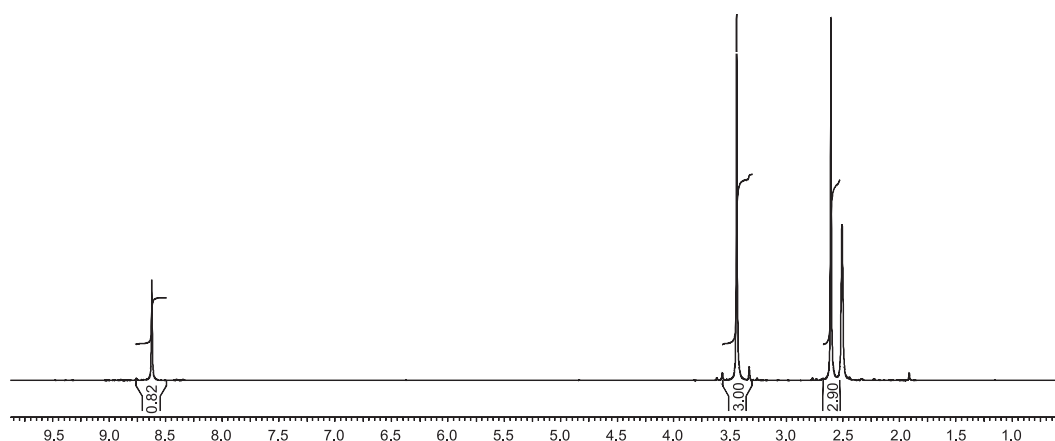


Рис. 3. ПМР-спектр 4-метил-3-ацетилтіо-1,2,4-триазолу (1).

4-триазол-3-тіонів та їх тіопохідних використовувались 5 груп тварин по 2 спостереження в кожній з додатковим використанням однієї попередньої та наступної дози. Сполуки (1-7) стабілізували твіном-80 і вводили через металевий зонд у шлунок. Спостереження проводились через 24 год.

Проведені досліді показали, що значення LD₅₀ нових похідних 1,2,4-триазол-3-тіону (табл. 3) знаходяться в межах 947-1248 мг/кг і згідно з класифікацією І. К. Сидорова [7] досліджувані сполуки відносяться до IV класу, тобто є малотоксичними речовинами. Будь-яких закономірностей впливу наявності та характеру замісників на гостру токсичність не виявлено.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

4-R₁-3-Ацетилтіо-1,2,4-триазоли (1-4, табл. 1). До 0,1 Моль відповідного 4-R₁-1,2,4-триазол-3-тіону додають 30 мл ангідриду ацетатної кислоти, нагрівають на водяній бані впродовж 5 год. Продукти реакції відфільтровують, висушують і кристалізують з ацетатної кислоти. Білі (1, 2) або жовті (3, 4) кристалічні речовини важко розчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках.

5-R-4-R₁-3-Ацетилтіо-1,2,4-триазоли (5-7, табл. 1). До 0,1 Моль відповідного 4-R₁-1,2,4-триазол-3-тіону додають 30 мл ангідриду ацетатної кислоти, нагрівають на водяній бані впродовж 5 год, кип'ятять про-

Таблиця 3

**МАКСИМУМИ ПОГЛИНАННЯ В ІЧ-СПЕКТРАХ ТА ЗНАЧЕННЯ LD₅₀
3-АЦЕТИЛТІО-4-R₁-5-R-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ ТА 1-АЦЕТИЛ-3-ТІО-4-R₁-5-R-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ**

Сполука	Частота поглинання, см ⁻¹				LD ₅₀ , мг/кг
	ν _{C=N} цикл	ν _{C-S}	ν _{CH₃CO}	ν _{Ar}	
1	1559	683	1358	—	1022 (975-1040)
2	1557	658	1360	1609	1010 (990-1050)
3	1573	623	1360	1614	947 (909-971)
4	1583	673	1356	1605	1248 (1210-1265)
5	1570	651	1360	1608	855 (790-900)
6	1548	670	1358	1614	970 (948-985)
7	1550	649	1355	1602	1205 (1175-1240)

тягом 1 год, охолоджують, осади відфільтровують, висушують і кристалізують з ацетатної кислоти. Біла (5) або жовта (6, 7) кристалічні речовини важко розчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені препаративні методики отримання відповідних 3-ацетилтіо-4- R_1 - та 5- R -4- R_1 1,2,4-триазолів, що передбачають нетривале нагрівання вихідних речовин на водяній бані.
2. Будову синтезованих речовин підтверджено комплексним використанням фізико-хімічних методів аналізу, таких як елементний аналіз, ІЧ-спектроскопія та ПМР-спектроскопія.
3. Дослідження гострої токсичності отриманих сполук показали, що значення їх LD_{50} знаходяться в межах 947-1248 мг/кг і згідно з класифікацією Сидорова І. К. досліджувані речовини відносяться до IV класу, тобто є малотоксичними речовинами.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Иванский В. П. Химия гетероциклических соединений. – М.: Высш. шк., 1978. – 559 с.
2. Казицына Л. А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектропии в органической химии / Л. А. Казицына. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – 236 с.
3. Каплаушенко А. Г. Методи синтезу та біологічна активність 1,2,4-триазол-3-тіонів / А. Г. Каплаушенко // Укр. біофармац. журн. – Х., 2009. – № 4 (4). – С. 48-56.
4. Каплаушенко А. Г. Пошук біологічно активних речовин серед 4-моно- та 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіонів та їх S-похідних / А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко // Фармац. часопис. – 2007. – № 1. – С. 32-35.
5. Кныш Е. Г. Синтез, физико-химические и биологические свойства N- и S-замещенных 1,2,4-триазола: дис. ... д-ра фармац. наук. – Х., 1987. – 350 с.
6. Прозоровский В. Б. О выборе метода построения кривой летальности и определения средней летальной дозы / В. Б. Прозоровский // Журн. общей биол. – 1960. – Т. 21, № 3. – С. 221-228.
7. Сидоров К. К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения // Токсикол. новых пром. веществ. – М., 1973. – Вып. 13. – С. 45-71.
8. Mohamed Bahaa G. Synthesis of 1-acyl-2-alkylthio-1,2,4-triazolobenzimidazoles with antifungal, anti-inflammatory and analgesis effects / Mohamed Bahaa G., Abdel-Alim Abdel-Alim M., Hussein Mostafa A. // Acta Pharm. – 2006. – Vol. 56, № 1. – P. 31-48.

УДК 547.791/.792.02.057 : 615.015.4

А. Г. Каплаушенко

АЦИЛИРОВАНИЕ 4-МОНО- И 4,5-ДИЗАМЕЩЕННЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНА И ПОКАЗАТЕЛИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

Исследованы реакции ацилирования ряда 4- R_1 -1,2,4-триазолил-3-тиона и 5- R_4 - R_1 -1,2,4-триазолил-3-тиона. При этом разработаны препаративные методики получения соответствующих 3-ацилтиопроизводных, предусматривающие непродолжительное нагревание исходных веществ на водяной бане. Установлено, что более длительное нагревание исходных тионов с ангидридом уксусной кислоты приводит к образованию диацильных производных, наличие которых подтверждено хромато-масс-спектрометрией. Строение синтезированных веществ подтверждено комплексным использованием физико-химических методов анализа, таких как элементный анализ, ИК-спектроскопия и ПМР-спектрометрия. Исследование острой токсичности полученных 3-ацетилтио-4- R_1 - и 5- R_4 - R_1 -1,2,4-триазола показало, что значение LD_{50} данных соединений находится в пределах 947-1248 мг/кг и согласно классификации Сидорова И.К. исследуемые вещества относятся к IV классу, то есть малотоксичным веществам.

Ключевые слова: 1,2,4-триазолы; ацилирование; острая токсичность

UDC 547.791/.792.02.057 : 615.015.4

A. G. Kaplaushenko

ACYLATION OF 4-MONO- AND 4,5-DISUBSTITUTED OF 1,2,4-TRIAZOL-3-THIONE AND DATA OF ACUTE TOXICITY OF REACTION PRODUCTS

Acylation reaction of 4- R_1 -1,2,4-triazolil-3-thiones and 5- R_4 - R_1 -1,2,4-triazolil-3-thiones derivatives has been studied. Thus preparative production methods of relevant 3-acylthio derivatives that involve short-term heating of initial substances on bain-marie have been developed. It was established that a prolonged heating of initial thiones with anhydride acetic acid results to formation of diacyl derivatives confirmed with chromatography-mass spectrometry. The structure of the synthesized compounds has been confirmed with combined using of physical chemical analysis methods such as elemental analysis, IR-spectroscopy and NMR-spectrometry. Investigation of acute toxicity for 3-acetylthio-4- R_1 - and 5- R_4 - R_1 -1,2,4-triazoles showed that LD_{50} values of these compounds are within 947-1248 mg/kg and these substances belong to the fourth toxicity class and they are low-toxic substances according to Sidorov's classification.

Key words: 1,2,4-triazoles; acylation; acute toxicity

Адреса для листування:

69035, м. Запоріжжя, вул. Маяковського, 26.

Тел. 095-350-67-04. E-mail: kaplaushenko@ukr.net

Запорізький державний медичний університет

Надійшла до редакції:

29.01.2014 р.

UDC 615.214.24:543.422.3-76:543.054

L. YU. KLIMENKO, S. M. TRUT, G. P. PETYUNIN, T. A. KOSTINA

*National University of Pharmacy**Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education*

DETERMINING ACCURACY IN VALIDATION OF UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHODS OF QUANTITATIVE MEASUREMENT IN FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Criteria and procedures for evaluating acceptability of accuracy offered by UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement of analytes in biological fluids used in forensic toxicological analysis have been determined. The accuracy evaluation is suggested for carrying out in two stages – on test solutions (no matrix) and on a matrix sample, whereas also in terms of two levels, i.e. within-run and between-run. The suggested approaches have been tested with respect to UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement of doxylamine in blood.

Key words: validation; accuracy; acceptability criteria; UV-spectrophotometry; doxylamine; bioanalytical methods

INTRODUCTION

This article is the continuation of authors' research [3-5, 12, 13] in the field of development of the approaches to validation of quantitative determination methods for purposes of forensic and toxicological analysis and devoted to the questions of the determination procedure development and formation of the acceptability criteria for validation parameter "accuracy".

The purpose of this paper is to analyse the present approaches to determination and acceptability estimation of validation parameter "accuracy" according to the requirements of the international guidances [7-11] and, respectively, to form the determination procedure and criteria for acceptability estimation of accuracy when carrying out the validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination for forensic and toxicological analysis in the variant of the method of calibration curve, and also to test the offered approaches by the example of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood.

MATERIALS AND METHODS

The process solutions: 1000.0 mg of doxylamine succinate were placed in the measuring flask with the capacity of 250.0 ml, dissolved in distilled water and the solution was diluted to the volume with the same solvent (the standard solution 1, the concentration was 4000 mcg/ml). 32.50; 30.00; 25.00; 20.00; 15.00; 10.00 and 5.00 ml respectively of the doxylamine succinate standard solution 1 were placed using burette in seven measuring flasks

with the capacity of 100.0 ml and the solutions were diluted to the volume with distilled water (the process solutions 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively, the concentrations were 1300, 1200, 1000, 800, 600, 400 and 200 mcg/ml respectively).

400.0 mg of doxylamine succinate were placed in the measuring flask with the capacity of 100.0 ml, dissolved in distilled water and the solution was diluted to the volume with the same solvent (the standard solution 2, the concentration was 4000 mcg/ml). 32.50; 30.00; 20.00; 10.00 and 5.00 ml respectively of the doxylamine succinate standard solution 2 were placed using burette in five measuring flasks with the capacity of 100.0 ml and the solutions were diluted to the volume with distilled water (the process solutions 8, 9, 10, 11 and 12 respectively, the concentrations were 1300, 1200, 800, 400 and 200 mcg/ml respectively).

The model solutions: 100.0 mg of doxylamine succinate were placed in the measuring flask with the capacity of 500.0 ml, dissolved in the 0.1 mole/l hydrochloric acid solution and the solution was diluted to the volume with the same solvent (the standard solution 3, the concentration was 200 mcg/ml). 26.00; 24.00; 20.00; 16.00; 12.00; 8.00 and 4.00 ml respectively of the doxylamine succinate standard solution 3 were placed using burette in seven measuring flasks with the capacity of 100.0 ml and the solutions were diluted to the volume with the 0.1 mole/l hydrochloric acid solution (the model solutions 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively, the concentrations were 1300, 1200, 1000, 800, 600, 400 and 200 mcg/ml respectively).

The reference solution: 400.0 mg of doxylamine succinate were placed in the measuring flask with the capacity

Table 1

**REQUIREMENTS TO THE ACCURACY DETERMINATION ACCORDING
TO THE FDA, EMA, UNODC AND SWGTOX PAPERS**

Paper	The number of runs (days)	The number of concentration levels	The number of replicates
FDA	–	not less 3	not less 5
EMA	not less 3 (not less 2)	not less 4	not less 5
UNODC	not less 3	not less 3	not less 3
SWGTOX	not less 5	not less 3	not less 3

of 100.0 ml, dissolved in the 0.1 mole/l hydrochloric acid solution and the solution was diluted to the volume with the same solvent (the standard solution 4, the concentration was 4000 mcg/ml). 18.00 ml of the doxylamine succinate standard solution 4 were placed using burette in measuring flask with the capacity of 100.0 ml and the solution was diluted to the volume with the 0.1 mole/l hydrochloric acid solution (the standard solution 5, the concentration was 720 mcg/ml). 2.00 ml of the doxylamine succinate standard solution 5 were placed in measuring flask with the capacity of 50.0 ml and the solution was diluted to the volume with the 0.1 mole/l hydrochloric acid solution (the reference solution, the concentration was 28.8 mcg/ml).

The calibration samples (calibrators): 3 lines in 7 samples (20.00 ml) of model blood (matrix) obtained from three different sources, which were spiked with 1.00 ml of the process solutions 1-7 respectively.

The model samples: 3 lines in 5 samples (20.00 ml) of model blood obtained from three different sources, which were spiked with 1.00 ml of the process solutions 8-12 respectively.

The solutions to be analysed: the solutions obtained by the method to be validated [5] for the calibration and model samples.

The absorbance of the solutions to be analysed, model solutions and reference solution was measured 3 times with taking out the cell at the wavelength of 262 nm by the spectrophotometer CF-46 in the cell with the layer thickness of 10 mm. The 0.1 mole/l hydrochloric acid solution was used as the compensation solution.

RESULTS AND DISCUSSION

The **accuracy** of an analytical procedure expresses the closeness of agreement between the value, which is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value, and the value found [ICH] [10].

This parameter is present in all guidances, which give the directed recommendations in regard to validation of bioanalytical methods, – “Guidance for Industry: Bioanalytical method validation” (U.S. FDA, 2001) [7], “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology” (SWGTOX, 2012) [11], “Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens” (UNODC, 2009) [8] and “Guide-

line on validation of bioanalytical methods” (EMA, 2011) [9], and in all guidances the formulation of ICH [10] with more precise definitions is in the basis of its definition. Thus, in the UNODC guidance [8], in the first place, the accuracy is called “ability of the procedure to get the true result” and “measure of systematic error of the procedure”.

As regards the procedure of accuracy determination for bioanalytical methods, all guidances recommend with this purpose to carry out the analysis of the special (not calibration) samples containing the known amounts of analyte. The information about number of concentration levels used for verification of accuracy and number of replicates for each concentration level has been resulted in Tab. 1.

The requirements to the number of concentration levels g used for accuracy verification are similar on the whole – not less than three, and only the EMA guidance [9] says about a minimum of four values of concentration (Tab. 1); as regards the position of these concentration levels within the range of method application, in all papers it is a question of “low, medium and high” concentrations. The EMA [9] and SWGTOX [11] guidances concretize these recommendations – it is a question of the lower limit of quantification (LLOQ), concentrations within three times the LLOQ (low sample) and at least 75 % [9] or 80 % [11] of the upper point of calibration curve (high sample); the medium sample is chosen as a middle of the method application range [9] or as a middle point between low and high samples [11].

As well as when linearity determination the requirements to the number of replicates for each concentration level (Tab. 1) are also considerably differed, and it is also not clear, what is meant under the term “replicate” – replicate experiment or replicate measurement? The FDA guidance [7] says about replicate “determinations”, EMA [9] insists on replicate “analysis of samples”, in the UNODC guidance [8] it is a question of “replicates”, and in the SWGTOX paper [11] it is recommended to carry out “triplicate measurements”.

As for the number of runs/days – the FDA guidance [7] does not discuss this question generally, the EMA [9], UNODC [8] and SWGTOX [11] papers even differ in the number of such runs (see Tab. 1), but are a unit that “replicates” are carried out within one run and the mean values obtained for each concentration level are used in calculations.

The EMA guidance [9] suggests to carry out five replicates for each concentration level only within the first run (verification of within-run accuracy), for other runs one sample for each concentration level is analysed (verification of between-run accuracy), but then the question arises: how should the values of responses be averaged for verification of between-run accuracy? In our opinion, it is incorrect to use 5 values from the first run and only in one for two another – the numbers of samples to be analysed within each run should be the same.

The UNODC [8] and SWGTOX [11] guidances do not consider determination of accuracy at the within-run and between-run levels – in all cases it is suggested to process the mean results calculated taking into account all obtained values for each concentration level.

As already discussed before [13] there are not clarity and unity in the texts of the considered papers [7-9, 11] in regard to the data that should be used for determination of calibration model – it is offered to plot either combined calibration curve using the mean values of responses for each concentration level, or combined calibration curve using all values of responses for each concentration level, and also individual calibration curve for each analytical run. Thereby the next question appears: how should the concentrations of model samples be calculated when verifying accuracy – using the mean values of responses or each obtained, using combined curve or within each run?

Separately in the EMA guidance [9] it is accentuated that the samples used for verification of accuracy should be spiked by analyte independently from the calibration samples using separately prepared solutions, and the UNODC guidance [8], in addition, insists that the concentrations of these samples should be differed from the samples used for plotting the calibration curve.

All considered papers [7-9, 11] suggest to determine accuracy using such biological matrix, for which the method is developed, but do not specify, from which sources the matrix is taken – from one or from different.

In all guidances [7-9, 11] it is recommended to present the accuracy in percent – differences concern only the value expressed in percent – “found/spiked” or “(found – spiked)/spiked”, but in all cases the difference of “found” from “spiked” should be within 15 % of the true value for all concentration levels, except the LLOQ, for which such difference should be within 20 % of the true value.

For accuracy estimation the FDA guidance [7] also suggests to calculate so-called “back-calculated” concentrations of the samples used for plotting the calibration model and advances the following requirements to them:

- the deviation of the calculated concentration from nominal for the standard sample corresponding to the lower limit of quantification (LLOQ) should not exceed 20 %;
- the deviations for standard samples, which are differ from LLOQ, should not exceed 15 %.

Thus a minimum of 4 from 6 standard samples should satisfy the given criterion, including LLOQ and standard sample of the highest concentration.

The EMA guidance [9] suggests to use the same approach with the same requirements to deviations of the calculated concentrations of calibration samples from their nominal concentration, but at least 75 % of standard samples (but not less than six concentration levels) should satisfy this criterion. In the case the replicates are used at least 50 % of calibration samples should satisfy this criterion.

Thus, the stated approaches to carrying out the experiment on accuracy confirmation when validating bio-analytical methods have ample quantity of the differences and contradictions and, in addition, are too bulky, especially taking into account the procedures of sample preparation used in domestic forensic and toxicological analysis. That leads to the necessity of elaboration of the uniform approaches to the determination procedure and acceptability estimation of the validation parameter “accuracy” for the methods used in forensic and toxicological analysis, particularly, for UV-spectrophotometric methods of analytes quantitative determination in biological liquids.

The domestic developments [1, 2] in the field of validation of analysis methods for medicines foresee the very clear and definite order of determination and acceptability criteria for the parameter “accuracy” within the developed validation standardized procedures. Therefore it has been suggested to be guided by the mentioned domestic developments and, particularly, by the approaches to methods validation in the variant of the method of calibration curve given in [1] for forming the procedure determination and acceptability criteria for accuracy when carrying out the validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination for forensic and toxicological analysis. The choice of the method of calibration curve is dictated by the primary orientation of all studied international guidances [7-9, 11] on the work exactly by this method.

As it has been stated before [4, 5, 12, 13], for validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination for forensic and toxicological analysis we use the normalized coordinates (i. e. transition from the equation of $A_i = b_1 \cdot C_i + a_1$ type to the equation of $Y_i = b_2 \cdot X_i + a_2$ type), which advantages of application are widely reported [1, 2] – the validation characteristics obtained in the normalized coordinates do not depend on the specificity of concrete analyte and can be regulated easier. In our case the expressions for the normalized coordinates have such appearance:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\%, \quad C_{st} = C_{reference};$$

$$Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot 100\%, \quad A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100}.$$

I. e. for normalization of the obtained experimental data the reference solution with the concentration of analyte ($C_{reference}$) corresponded to its concentration in the end solution to be spectrophotometric measured under the condition of zero losses for the point of 100 % in the normalized coordinates is used; the absorbance of such reference solution ($A_{reference}$) is corrected by the value of recovery R obtained at the preliminary stage of validation [12] and is used for normalization of absorbance values. Such approach is needed for decline of influence of the systematic error introduced by the components of blank-sample, which significance has been shown at the preliminary stage of validation [5]. As 100 % in the normalized coordinates it has been suggested earlier [13] to accept the mean toxic or lethal analyte concentration in biological liquid – depending on the purposes and tasks, for which the developed methods is intended.

It has been suggested earlier [13] to understand the complete carrying out the replicate experiment under the concept “replicate”.

We suggest to carry out accuracy confirmation of the method at two levels – within-run and between-run. According to the recommendations given in [2] the validation experiment should be as much as rational, and, as a result, its volume should be minimized, therefore we recommend to combine carrying out the experiment on verification of accuracy with carrying out the experiment on determination of specificity, recovery and linearity.

Determination of within-run accuracy. We recommend to confirm within-run accuracy simultaneously with determination of within-run linearity in the way of calculating the concentrations of calibration samples X_{calc} , % for each run by individual values of absorbance using the linear dependence obtained for this run.

Determination of between-run accuracy. We recommend to confirm between-run accuracy in two stages:

- to calculate the mean concentrations of calibration samples X_{calc} , % by the mean values of absorbance using the linear dependence obtained by the mean values of parallel runs;
- to calculate X_{calc} , % for model samples (concentrations correspond to the points of 25 %, 50 %, 100 %, 150 % and 175 % in the normalized coordinates), which are used for determination of specificity and recovery at the preliminary stage of validation, by means of the linear dependence obtained by the mean values of parallel runs.

At this stage the necessity of tight regulation of the origin of matrix used for preparation of model samples appears. As it has been already discussed before [12], the different degree of analyte extraction from the matrix, which, in turn, mainly depends on two reasons – the analyte amount in the matrix and the state of matrix – is the critical factor for making the decision about suitability or unsuitability of the method for further application.

In order to estimate the influence of these two factors on accuracy of the method to be validated we sug-

gest to carry out the investigations for three replicate runs, each one consists of 3 (for $D = 25-125$ %) or 4 (for $D = 25-150$ % and $25-175$ %) samples of biological matrix obtained from the same source, i. e. for analysis of each run the individual source of biological matrix is used. We recommend to carry out the analysis of runs in different days (one day is one run) – such approach allows to avoid the necessity to store the samples of biological matrix and give the possibility to estimate the influence of analyte amount and changing the matrix on the method accuracy, and also on its specificity and recovery.

The calculated values of concentrations of calibration and model samples X_{calc} , % are used for calculation of the parameter “found/spiked” RR , %:

$$RR, \% = \frac{X_{i,calc}}{X_{i,fact}} \cdot 100. \quad (1)$$

The mean value of this parameter \overline{RR} , % for each group of measurements is used for calculation of systematic error δ , which should be insignificant against extreme uncertainty of analysis Δ_{As} , % [2], i. e. should not exceed extreme systematic error $\max \delta$. Thus, in accordance with [2] it is possible to write down the following ratio:

$$\delta, \% = |100 - \overline{RR}| \leq \max \delta = 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot 20 \% [8] = 6.40 \%, \quad (2)$$

that is the criterion of acceptability for verification of the method accuracy.

It is necessary separately to discuss the following question: development of methods of analytes quantitative determination in biological liquids is carried out at the first stage using model solutions (without matrix) – linear dependence is plotted, linearity parameters are calculated, presence and significance of systematic error are verified, etc. This process also should be regulated somehow and the verification procedure and acceptability criteria should be elaborated for accuracy of the method using model solutions.

To verify the method accuracy by model solutions we offer to calculate the concentrations of these model solutions X_{calc}^{model} , % using the respective linear dependence. The obtained values of X_{calc}^{model} , % are used for calculation of systematic error δ^{model} in accordance with formulae (1) and (2).

It is possible to present the total uncertainty of analysis results Δ_{As} for methods of analyte quantitative determination in biological liquids by way of two components:

- the uncertainty of analyte quantitative determination in model solutions Δ_{As}^{model} ;
- the uncertainty of sample preparation procedure $\Delta_{sample\ preparation}$

therefore the total uncertainty of the method can be written down in following way [1, 2]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{As}^{model})^2 + \Delta_{sample\ preparation}^2} \leq \leq \max \Delta_{As} = 20 \% [8]. \quad (3)$$

Table 2

**RESULTS OF ACCURACY DETERMINATION FOR UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DOXYLAMINE SUCCINATE QUANTITATIVE DETERMINATION BY MODEL SOLUTIONS**

Factual concentration of doxylamine succinate in model solution ($C_{st} = 28.8$ mcg/ml)		Absorbance ($A_{st} = 0.801$)	Found in % to standard absorbance Y_i^{model} , %	Calculated concentration of doxylamine succinate in model solution $X_{i,calc}^{model}$, %	$RR, \% = \frac{X_{i,calc}^{model}}{X_{i,fact}^{model}} \cdot 100$
$C_{i,fact}^{model}$, mcg/ml	$X_{i,fact}^{model}$, %				
$D = 25-175$ % ($g = 7$)					
8.00	27.78	0.226	28.21	28.35	102.05
16.00	55.56	0.444	55.43	55.70	100.26
24.00	83.33	0.657	82.02	82.42	98.91
32.00	111.11	0.890	111.11	111.66	100.49
40.00	138.89	1.121	139.95	140.64	101.26
48.00	166.67	1.348	168.29	169.12	101.47
52.00	180.56	1.421	177.40	178.27	98.73
\overline{RR}^{model} , %					100.45
$\delta^{model} = 100 - \overline{RR}^{model} $			approach 1	≤ 4.52 %	0.45
			approach 2	≤ 2.05 %	
$D = 25-150$ % ($g = 6$)					
8.00	27.78	0.226	28.21	27.90	100.43
16.00	55.56	0.444	55.43	54.82	98.67
24.00	83.33	0.657	82.02	81.12	97.34
32.00	111.11	0.890	111.11	109.89	98.90
40.00	138.89	1.121	139.95	138.41	99.65
48.00	166.67	1.348	168.29	166.44	99.86
\overline{RR}^{model} , %					99.14
$\delta^{model} = 100 - \overline{RR}^{model} $			approach 1	≤ 4.52 %	0.86
			approach 2	≤ 2.05 %	
$D = 25-125$ % ($g = 5$)					
8.00	27.78	0.226	28.21	28.07	101.04
16.00	55.56	0.444	55.43	55.15	99.27
24.00	83.33	0.657	82.02	81.61	97.94
32.00	111.11	0.890	111.11	110.56	99.50
40.00	138.89	1.121	139.95	139.25	100.26
\overline{RR}^{model} , %					99.60
$\delta^{model} = 100 - \overline{RR}^{model} $			approach 1	≤ 4.52 %	0.40
			approach 2	≤ 2.05 %	

It is possible to offer 2 approaches for regulation of the value Δ_{As}^{model} and, respectively, δ^{model} .

Approach 1: the uncertainty of sample preparation procedure is equal to the uncertainty of analyte quantitative determination in model solutions, i. e.:

$$\max \Delta_{As}^{model} = \max \Delta_{sample\ preparation} \quad (4)$$

Then:

$$\begin{aligned} \max \Delta_{As}^{model} &= \max \Delta_{sample\ preparation} \leq \\ &\leq \max \Delta_{As} / \sqrt{2} = 0.707 \cdot \max \Delta_{As}, \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \delta^{model}, \% &= |100 - \overline{RR}^{model}| \leq \max \delta^{model} = \\ &= 0.32 \cdot \max \Delta_{As}^{model} = 0.32 \cdot 0.707 \cdot \max \Delta_{As} = \\ &= 0.32 \cdot 0.707 \cdot 20 \% [8] = 4.52 \%. \end{aligned} \quad (6)$$

Approach 2: the uncertainty of analyte quantitative determination in model solutions is insignificant against the total uncertainty of analysis results Δ_{As} , i. e.:

$$\Delta_{As}^{model} \leq \max \Delta_{As}^{model} = 0.32 \cdot \max \Delta_{As} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \delta^{model}, \% &= |100 - \overline{RR}^{model}| \leq \max \delta^{model} = \\ &= 0.32 \cdot \max \Delta_{As}^{model} = 0.32 \cdot 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = \\ &= 0.32 \cdot 0.32 \cdot 20 \% [8] = 2.05 \%. \end{aligned} \quad (8)$$

For illustration of the offered approaches to accuracy determination and estimation UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood [5] was used; the lethal doxylamine concentration in blood [6] – 25 mg/l (that corresponds to 36 mg/l of doxylamine succinate) has been accepted as 100 %.

Table 3

**RESULTS OF WITHIN-RUN ACCURACY DETERMINATION FOR UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD WITHOUT PRELIMINARY TLC-PURIFICATION**

Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance $(A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0.532)$			Found in % to standard absorbance Y_p %			Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}$ %			$RR, \% = \frac{X_{i,calc}}{X_{i,fact}} \cdot 100$		
$C_{i,fact}$ mcg/ml	$X_{i,fact}$ %	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day
$D = 25-175 \% (g = 7)$													
10.00	27.78	0.222	0.195	0.205	41.73	36.65	38.53	26.82	26.38	26.59	96.54	94.96	95.72
20.00	55.56	0.368	0.347	0.352	69.17	65.23	66.17	54.45	54.76	54.09	98.00	98.56	97.35
30.00	83.33	0.545	0.526	0.537	102.44	98.87	100.94	87.95	88.17	88.69	105.54	105.81	106.43
40.00	111.11	0.662	0.644	0.654	124.44	121.05	122.93	110.11	110.19	110.57	99.10	99.17	99.51
50.00	138.89	0.795	0.779	0.783	149.44	146.43	147.18	135.28	135.40	134.70	97.40	97.49	96.98
60.00	166.67	0.986	0.970	0.979	185.34	182.33	184.02	171.44	171.05	171.36	102.86	102.63	102.81
65.00	180.56	1.021	1.008	1.015	191.92	189.47	190.79	178.06	178.14	178.09	98.62	98.66	98.63
$\overline{RR}, \%$											99.72	99.61	99.63
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											0.28	0.39	0.37
$D = 25-150 \% (g = 6)$													
10.00	27.78	0.222	0.195	0.205	41.73	36.65	38.53	27.48	27.02	27.24	98.92	97.26	98.06
20.00	55.56	0.368	0.347	0.352	69.17	65.23	66.17	54.67	54.96	54.32	98.40	98.92	97.77
30.00	83.33	0.545	0.526	0.537	102.44	98.87	100.94	87.65	87.84	88.37	105.18	105.41	106.05
40.00	111.11	0.662	0.644	0.654	124.44	121.05	122.93	109.45	109.52	109.91	98.51	98.57	98.92
50.00	138.89	0.795	0.779	0.783	149.44	146.43	147.18	134.23	134.33	133.66	96.64	96.72	96.23
60.00	166.67	0.986	0.970	0.979	185.34	182.33	184.02	169.81	169.43	169.74	101.88	101.66	101.84
$\overline{RR}, \%$											99.92	99.76	99.81
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											0.08	0.24	0.19
$D = 25 - 125 \% (g = 5)$													
10.00	27.78	0.222	0.195	0.205	41.73	36.65	38.53	26.15	25.85	25.94	94.13	93.05	93.38
20.00	55.56	0.368	0.347	0.352	69.17	65.23	66.17	54.29	54.69	53.94	97.71	98.43	97.08
30.00	83.33	0.545	0.526	0.537	102.44	98.87	100.94	88.42	88.64	89.17	106.11	106.37	107.01
40.00	111.11	0.662	0.644	0.654	124.44	121.05	122.93	110.98	111.02	111.45	99.88	99.92	100.31
50.00	138.89	0.795	0.779	0.783	149.44	146.43	147.18	136.62	136.63	136.02	98.37	98.37	97.93
$\overline{RR}, \%$											99.24	99.23	99.14
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											0.76	0.77	0.86

Table 4

**RESULTS OF BETWEEN-RUN ACCURACY DETERMINATION FOR UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD WITHOUT PRELIMINARY TLC-PURIFICATION**

Calculation by calibration samples						Calculation by model samples					
Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance $(A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0.532)$	Found in % to standard absorbance Y_p %	Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}$ %	RR , %	Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance $(A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0.532)$	Found in % to standard absorbance Y_p %	Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}$ %	RR , %
$C_{i,fact}$ mcg/ml	$X_{i,fact}$ %					$C_{i,fact}$ mcg/ml	$X_{i,fact}$ %				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$D = 25-175$ % ($g = 7$)											
10.00	27.78	0.207	38.91	26.55	95.57	10.00	27.78	0.188	35.34	22.99	82.76
20.00	55.56	0.356	66.92	54.50	98.09	10.00	27.78	0.231	43.42	31.05	111.77
30.00	83.33	0.536	100.75	88.26	105.92	10.00	27.78	0.235	44.17	31.80	114.47
40.00	111.11	0.653	122.74	110.21	99.19	20.00	55.56	0.336	63.16	50.75	91.34
50.00	138.89	0.786	147.74	135.16	97.31	20.00	55.56	0.377	70.86	58.43	105.17
60.00	166.67	0.978	183.83	171.18	102.71	20.00	55.56	0.332	62.41	50.00	89.99
65.00	180.56	1.015	190.79	178.12	98.65	40.00	111.11	0.633	118.98	106.46	95.81
						40.00	111.11	0.675	126.88	114.34	102.91
						40.00	111.11	0.671	126.13	113.59	102.23
						65.00	180.56	1.034	194.36	181.69	100.63
						65.00	180.56	0.998	187.59	174.93	96.88
						65.00	180.56	1.040	195.49	182.82	101.25
\overline{RR} , %					99.63	\overline{RR} , %					99.60
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40$ %					0.37	$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40$ %					0.40
$D = 25 - 150$ % ($g = 6$)											
10.00	27.78	0.207	38.91	27.21	97.95	10.00	27.78	0.188	35.34	23.70	85.31
20.00	55.56	0.356	66.92	54.75	98.54	10.00	27.78	0.231	43.42	31.64	113.89
30.00	83.33	0.536	100.75	88.01	105.62	10.00	27.78	0.235	44.17	32.38	116.56
40.00	111.11	0.653	122.74	109.63	98.67	20.00	55.56	0.336	63.16	51.05	91.88
50.00	138.89	0.786	147.74	134.22	96.64	20.00	55.56	0.377	70.86	58.62	105.51
60.00	166.67	0.978	183.83	169.70	101.82	20.00	55.56	0.332	62.41	50.31	90.55
						40.00	111.11	0.633	118.98	105.94	95.35
						40.00	111.11	0.675	126.88	113.71	102.34
						40.00	111.11	0.671	126.13	112.97	101.67

Table 4 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	11	12
						60.00	166.67	0.995	187.03	172.85	103.71
						60.00	166.67	0.955	179.51	165.46	99.27
						60.00	166.67	0.965	181.39	167.30	100.38
$\overline{RR}, \%$					99.87	$\overline{RR}, \%$					100.54
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					0.13	$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					0.54
$D = 25\text{-}125 \%$ ($g = 5$)											
10.00	27.78	0.207	38.91	25.93	93.34	10.00	27.78	0.188	35.34	22.31	80.31
20.00	55.56	0.356	66.92	54.37	97.86	10.00	27.78	0.231	43.42	30.51	109.83
30.00	83.33	0.536	100.75	88.72	106.47	10.00	27.78	0.235	44.17	31.27	112.56
40.00	111.11	0.653	122.74	111.04	99.94	20.00	55.56	0.336	63.16	50.55	90.98
50.00	138.89	0.786	147.74	136.42	98.22	20.00	55.56	0.377	70.86	58.37	105.06
						20.00	55.56	0.332	62.41	49.79	89.61
						40.00	111.11	0.633	118.98	107.22	96.50
						40.00	111.11	0.675	126.88	115.24	103.72
						40.00	111.11	0.671	126.13	114.48	103.03
$\overline{RR}, \%$					99.17	$\overline{RR}, \%$					99.07
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					0.83	$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					0.93

Table 5

**RESULTS OF WITHIN-RUN ACCURACY DETERMINATION FOR UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD WITH PRELIMINARY TLC-PURIFICATION**

Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance ($A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0.510$)			Found in % to standard absorbance $Y_p, \%$			Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}, \%$			$RR, \% = \frac{X_{i,calc}}{X_{i,fact}} \cdot 100$		
$C_{i,fact}$ mcg/ml	$X_{i,fact}, \%$	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day	1 st day	2 nd day	3 ^d day
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$D = 25-175 \%$ ($g = 7$)													
10.00	27.78	0.159	0.147	0.151	31.18	28.82	29.61	30.87	28.56	29.26	111.12	102.81	105.33
20.00	55.56	0.297	0.295	0.287	58.24	57.84	56.27	57.66	57.32	55.60	103.78	103.17	100.07
30.00	83.33	0.415	0.420	0.410	81.37	82.35	80.39	80.56	81.62	79.44	96.68	97.95	95.33
40.00	111.11	0.583	0.579	0.573	114.31	113.53	112.35	113.18	112.52	111.02	101.86	101.27	99.92

Table 5 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
50.00	138.89	0.704	0.698	0.695	138.04	136.86	136.27	136.67	135.64	134.65	98.40	97.66	96.95
60.00	166.67	0.882	0.874	0.877	172.94	171.37	171.96	171.23	169.84	169.92	102.74	101.90	101.95
65.00	180.56	0.937	0.931	0.929	183.73	182.55	182.16	181.91	180.92	180.00	100.75	100.20	99.69
$\overline{RR}, \%$											102.19	100.71	99.89
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											2.19	0.71	0.11
$D = 25-150 \%$ ($g = 6$)													
10.00	27.78	0.159	0.147	0.151	31.18	28.82	29.61	30.90	28.56	29.26	111.23	102.81	105.33
20.00	55.56	0.297	0.295	0.287	58.24	57.84	56.27	57.72	57.32	55.60	103.89	103.17	100.07
30.00	83.33	0.415	0.420	0.410	81.37	82.35	80.39	80.64	81.62	79.44	96.77	97.95	95.33
40.00	111.11	0.583	0.579	0.573	114.31	113.53	112.35	113.29	112.52	111.02	101.96	101.27	99.92
50.00	138.89	0.704	0.698	0.695	138.04	136.86	136.27	136.81	135.64	134.65	98.50	97.66	96.95
60.00	166.67	0.882	0.874	0.877	172.94	171.37	171.96	171.40	169.84	169.92	102.84	101.90	101.95
$\overline{RR}, \%$											102.53	100.79	99.93
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											2.53	0.79	0.07
$D = 25 - 125 \%$ ($g = 5$)													
10.00	27.78	0.159	0.147	0.151	31.18	28.82	29.61	32.08	29.47	30.53	115.48	106.08	109.90
20.00	55.56	0.297	0.295	0.287	58.24	57.84	56.27	59.92	59.14	58.01	107.85	106.44	104.41
30.00	83.33	0.415	0.420	0.410	81.37	82.35	80.39	83.71	84.20	82.88	100.46	101.04	99.46
40.00	111.11	0.583	0.579	0.573	114.31	113.53	112.35	117.60	116.08	115.82	105.84	104.47	104.24
50.00	138.89	0.704	0.698	0.695	138.04	136.86	136.27	142.02	139.94	140.48	102.25	100.76	101.14
$\overline{RR}, \%$											106.38	103.76	103.83
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$											6.38	3.76	3.83

Table 6

**RESULTS OF BETWEEN-RUN ACCURACY DETERMINATION FOR UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD WITH PRELIMINARY TLC-PURIFICATION**

Calculation by calibration samples						Calculation by model samples					
Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance $(A_{st} = \frac{A_{reference}}{100} \cdot R = 0.510)$	Found in % to standard absorbance $Y_p, \%$	Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}, \%$	$RR, \%$	Factual concentration of doxylamine succinate in blood ($C_{st} = 36$ mcg/ml)		Absorbance $(A_{st} = \frac{A_{reference}}{100} \cdot R = 0.510)$	Found in % to standard absorbance $Y_p, \%$	Calculated concentration of doxylamine succinate in blood $X_{i,calc}, \%$	$RR, \%$
$C_{i,fact},$ mcg/ml	$X_{i,fact},$ %					$C_{i,fact},$ mcg/ml	$X_{i,fact},$ %				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$D = 25-175 \%$ ($g = 7$)											
10.00	27.78	0.152	29.80	29.48	106.12	10.00	27.78	0.138	27.06	26.77	96.36
20.00	55.56	0.293	57.45	56.82	102.27	10.00	27.78	0.154	30.20	29.87	107.52
30.00	83.33	0.415	81.37	80.48	96.58	10.00	27.78	0.158	30.98	30.64	110.30
40.00	111.11	0.578	113.33	112.10	100.89	20.00	55.56	0.279	54.71	54.11	97.39
50.00	138.89	0.699	137.06	135.57	97.61	20.00	55.56	0.290	56.86	56.24	101.22
60.00	166.67	0.878	172.16	170.29	102.17	20.00	55.56	0.297	58.24	57.61	103.69
65.00	180.56	0.933	182.94	180.95	100.22	40.00	111.11	0.592	116.08	114.82	103.34
						40.00	111.11	0.566	110.98	109.77	98.79
						40.00	111.11	0.582	114.12	112.88	101.59
						65.00	180.56	0.944	185.10	183.09	101.40
						65.00	180.56	0.923	180.98	179.01	99.14
						65.00	180.56	0.917	179.80	177.84	98.49
$\overline{RR}, \%$					100.84	$\overline{RR}, \%$					101.60
$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					0.84	$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$					1.60
$D = 25-150 \%$ ($g = 6$)											
10.00	27.78	0.152	29.80	29.48	106.12	10.00	27.78	0.138	27.06	26.77	96.36
20.00	55.56	0.293	57.45	56.82	102.27	10.00	27.78	0.154	30.20	29.87	107.52
30.00	83.33	0.415	81.37	80.48	96.58	10.00	27.78	0.158	30.98	30.64	110.30
40.00	111.11	0.578	113.33	112.10	100.89	20.00	55.56	0.279	54.71	54.11	97.39
50.00	138.89	0.699	137.06	135.57	97.61	20.00	55.56	0.290	56.86	56.24	101.22
60.00	166.67	0.878	172.16	170.29	102.17	20.00	55.56	0.297	58.24	57.61	103.69
						40.00	111.11	0.592	116.08	114.82	103.34
						40.00	111.11	0.566	110.98	109.77	98.79
						40.00	111.11	0.582	114.12	112.88	101.59

Table 6 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
						60.00	166.67	0.865	169.61	167.76	100.65		
						60.00	166.67	0.887	173.92	172.03	103.22		
						60.00	166.67	0.893	175.10	173.19	103.91		
					$\overline{RR}, \%$	100.94						$\overline{RR}, \%$	102.33
					$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$	0.94						$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$	2.33
$D = 25\text{-}125 \%$ ($g = 5$)													
10.00	27.78	0.152	29.80	30.63	110.26	10.00	27.78	0.138	27.06	27.81	100.11		
20.00	55.56	0.293	57.45	59.04	106.26	10.00	27.78	0.154	30.20	31.04	111.74		
30.00	83.33	0.415	81.37	83.63	100.36	10.00	27.78	0.158	30.98	31.84	114.61		
40.00	111.11	0.578	113.33	116.47	104.82	20.00	55.56	0.279	54.71	56.23	101.21		
50.00	138.89	0.699	137.06	140.86	101.42	20.00	55.56	0.290	56.86	58.44	105.18		
						20.00	55.56	0.297	58.24	59.86	107.74		
						40.00	111.11	0.592	116.08	119.30	107.37		
						40.00	111.11	0.566	110.98	114.06	102.66		
						40.00	111.11	0.582	114.12	117.29	105.56		
					$\overline{RR}, \%$	104.62						$\overline{RR}, \%$	106.24
					$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$	4.62						$\delta = 100 - \overline{RR} \leq 6.40 \%$	6.24

The results of measuring the absorbance values of model solutions, calculated values of concentrations of model solutions and values RR , % for different ranges of method application are given in Tab. 2. The data of Table 2 about the value δ^{model} are the evidence that the requirements to systematic error are satisfied both for *Approach 1* and *Approach 2*.

The results of measuring the absorbance values for calibration and model samples, respective values X_{calc} , % and values RR , % for different ranges of method application are given in Tab. 3-6. It is obviously from the data given in Tab. 3-6 that the requirements to systematic error δ are satisfied for all offered variants of ranges of method application and for both variants of the method – with TLC-purification and without it. For the application range of 25-125 % in the case of carrying out the analysis with preliminary TLC-purification the value of systematic error reaches critical number – 6.38 % and 6.24 %, therefore it is better to use more wide range of application for this variant of the method.

CONCLUSIONS

Thus, the following criteria and procedure of acceptability estimation of accuracy for UV-spectrophotometric methods of analytes quantitative determination in biological fluids used in forensic and toxicological analysis have been offered:

- application of the normalized coordinates;
- accuracy confirmation of the method is carried out in two directions – by model solutions (without matrix) and by matrix samples;
- verification of the method accuracy by model solutions is carried out by calculation of their concentrations using the respective linear dependence;
- estimation of the method accuracy by matrix samples is carried out at two levels – within-run and between-run – using calibration and model samples;
- determination of within-run accuracy is carried out in the way of calculating the concentrations of calibration samples for each run by individual values of absorbance using the linear dependence obtained for this run;
- determination of between-run accuracy is carried out in two stages – by calculation of the concentrations of model samples and mean concentrations of calibration samples using the linear dependence obtained by the mean values of parallel runs;
- investigations of model samples are carried out for three replicate runs; the samples of biological matrix are obtained from the different source; for $D = 25$ -125 % each run consists of 3 model samples (concentrations correspond to the points of 25 %, 50 % and 100 % in the normalized coordinates), for $D = 25$ -150 % and 25-175 % – of 4 samples (concentrations correspond to the points of 25 %, 50 % and 150 % or 175 % in the normalized coordinates);

- the calculated values X_{calc} , % and X_{calc}^{model} , % are used for calculation of δ and δ^{model} respectively;
- the acceptability criteria have been offered for estimation of value δ^{model} within two approaches based on: 1) assumption of equality of the uncertainty of sample preparation procedure and the uncertainty of analyte quantitative determination in model solutions ($\delta^{model} \leq 4.52$ %); 2) assumption of insignificance of the uncertainty of analyte quantitative determination in model solutions ($\delta^{model} \leq 2.05$ %);
- it is proceeded from insignificance of systematic error for estimation of value δ ($\delta \leq 6.40$ %).

REFERENCES

1. Гризодуб А. И. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика / А. И. Гризодуб, О. Л. Левашова, Г. И. Борщевский // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 5-26.
2. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х т. / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Х.: НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
3. Клименко Л. Ю. Анализ подходов к определению специфичности / селективности при проведении валидации аналитических методик в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин // Укр. мед. альманах. – 2013. – Т. 16, № 1. – С. 47-49.
4. Клименко Л.Ю. Подходы к определению специфичности / селективности при валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин, Т. А. Костина // Фармация Казахстана. – 2013. – № 8. – С. 53-56.
5. Клименко Л.Ю. Модификация и валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови: специфичность / селективность / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Г. П. Петюнин, И. М. Иванчук // Укр. журн. клін. та лаборатор. медицини. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. 191-199.
6. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed. / Ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London: The Pharm. Press, 2011. – 2609 p.
7. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2001. – 22 p.

8. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens / United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section. – New York: United Nations, 2009. – 70 p.
9. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – Geneva: ICH, 1995. – 13 p.
11. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (draft) / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). – 2012. – 52 p.
12. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, I. M. Ivanchuk // Фармація Казахстану. – 2013. – № 12. – С. 42-48.
13. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and range / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, E. Yu. Akhmedov // Фармац. часопис. – 2014. – № 1 (30). – С. 41-52.

УДК 615.214.24:543.422.3-76:543.054

Л. Ю. Клименко, С. М. Трут, Г. П. Петюнін, Т. А. Костіна

**ВИЗНАЧЕННЯ ПРАВИЛЬНОСТІ В ХОДІ ВАЛІДАЦІЇ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ В СУДОВО-ТОКСИКОЛОГІЧНОМУ АНАЛІЗІ**

Сформовані критерії та процедура оцінки прийнятності правильності УФ-спектрофотометричних методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах, що застосовуються в судово-токсикологічному аналізі. Оцінку правильності запропоновано проводити в два етапи – на модельних розчинах (без матриці) і на зразках матриці та на двох рівнях – within-run і between-run. Запропоновані підходи апробовані на УФ-спектрофотометричній методиці кількісного визначення доксиламіну в крові.

Ключові слова: валідація; правильність; критерії прийнятності; УФ-спектрофотометрія; доксиламін; біоаналітичні методики

УДК 615.214.24:543.422.3-76:543.054

Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Г. П. Петюнин, Т. А. Костина

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРАВИЛЬНОСТИ В ХОДЕ ВАЛИДАЦИИ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СУДЕБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

Сформированы критерии и процедура оценки приемлемости правильности УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе. Оценку правильности предложено проводить в два этапа – на модельных растворах (без матрицы) и на образцах матрицы и на двух уровнях – within-run и between-run. Предложенные подходы апробированы на УФ-спектрофотометрической методике количественного определения доксиламина в крови.

Ключевые слова: валидация; правильность; критерии приемлемости; УФ-спектрофотометрия; доксиламин; биоаналитические методики

Адреса для листування:
61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Тел. (050) 401-37-62. E-mail: lynnne2@ukr.net.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:
27.01.2014 р.

УДК 544.723.212:547.792-026.86

М. О. ЩЕРБАК, А. Г. КАПЛАУШЕНКО

Запорізький державний медичний університет

ВПЛИВ АДСОРБЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 3-АЛКІЛТІО-5-(2-,3-,4-НІТРОФЕНІЛ)- 4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ НА ЇХ ТОКСИЧНІСТЬ ТА АКТОПРОТЕКТОРНУ АКТИВНІСТЬ

Одним з найважливіших соціальних та економічних завдань фармацевтичної галузі на сьогоднішній день є створення нових вітчизняних лікарських засобів, конкурентоспроможних у порівнянні з дорогими імпортованими препаратами. Ключовим етапом створення оригінальних лікарських препаратів є цілеспрямований синтез біологічно активних речовин з вираженим фармакологічним ефектом та низькою токсичністю. Відомо, що збільшення довжини вуглецевого ланцюга ПАР призводить до підвищення величини адсорбції, підсилення фармакологічної активності та зростання токсичності. Проведено визначення впливу величин поверхневої активності та відносної адсорбції 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів, що є представниками одного гомологічного ряду та проведено кореляцію отриманих даних з показниками токсичності і актопротекторної активності синтезованих речовин.

Ключові слова: 1,2,4-триазол; поверхневий натяг; поверхнева активність; адсорбція; токсичність; актопротекторна активність

ВСТУП

Постійний попит на фармацевтичні препарати потребує все більших зусиль по створенню нових оригінальних лікарських засобів. Останнім часом все більшу увагу вітчизняних [3, 4] і зарубіжних [9] учених привертають дослідження гетероциклічних систем як потенційних біологічно активних сполук. Велику зацікавленість в цьому плані викликають S-похідні 5-R-1,2,4-триазол-3-тіонів. Аналіз науково-технічної літератури показав, що ядро 1,2,4-триазолу є структурним фрагментом лікарських препаратів з протигрибковим (флуконазол, ітраконазол), антидепресивним (тразодон, альпразолам), гепатопротекторним, ранозагоюючим та противірусним (тіотриазолін) ефектами. Але недостатньо вивчено фармакологічну активність у ряду 4-аміно-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-триазол-3-тіонів. Тому синтез, вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей S-похідних 4-аміно-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-триазол-3-тіонів, з нашої точки зору, мають наукову новизну, теоретичну та практичну значимість.

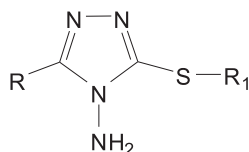
У життєдіяльності організмів поверхневі явища мають велике значення. В організмі на поверхні по-

ділу фаз відбуваються процеси обміну, синтезу, адсорбції, десорбції, ферментативні реакції. Дія лікарських препаратів на організм також відбувається на поверхні поділу фаз. Після адсорбції на поверхні поділу фаз лікарський препарат потрапляє до біологічних мішеней шляхом пасивної дифузії. Зі збільшенням величини адсорбції збільшується біодоступність лікарської речовини, що є позитивним явищем, а також підвищення токсичності сполук, що доцільно враховувати. Відомо, що збільшення довжини вуглецевого ланцюга ПАР призводить до підвищення величини адсорбції, підсилення фармакологічної активності та зростання токсичності. Тому розробникам потенційних ліків необхідно враховувати обидва показники при моделюванні молекули та прагнути встановлення оптимального співвідношення: токсичності, що не викликає побічних ефектів, та активності, що проявляє необхідну дію.

Метою дослідження є визначення величини поверхневої активності та відносної адсорбції речовин, що є представниками одного гомологічного ряду, а саме 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів, на поверхні поділу рідина-газ та проведення кореляції отриманих даних з показниками їх токсичності і актопротекторної активності, а також підтвердження чи спростування правила Траубе.

© Щербак М. О., Каплаушенко А. Г., 2014

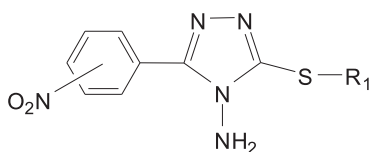
Таблиця

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ТА АКТОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ
3-АЛКІЛТІО-5-(2-, 3-, 4-НІТРОФЕНІЛ)-4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ

Сполука, №	R	R ₁	$\sigma \cdot 10^{-3}$	$\Gamma \cdot 10^{-6}$	Токсичність	Активність %
1	C ₆ H ₄ NO ₂ -2	C ₃ H ₇	6,2	5,00	521(510-543)	104,68
2	C ₆ H ₄ NO ₂ -2	C ₆ H ₁₃	4,3	9,10	670(661-691)	120,36
3	C ₆ H ₄ NO ₂ -2	C ₇ H ₁₅	3,5	13,80	796(783-813)	124,58
4	C ₆ H ₄ NO ₂ -3	C ₇ H ₁₅	3,0	16,20	783(776-794)	122,75
5	C ₆ H ₄ NO ₂ -3	C ₉ H ₁₉	1,6	21,80	845(835-864)	126,12
6	C ₆ H ₄ NO ₂ -3	C ₁₀ H ₂₁	1,0	23,60	987(978-998)	130,25
7	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	C ₃ H ₇	6,7	4,80	512(505-526)	105,98
8	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	C ₆ H ₁₃	4,5	8,00	652(639-673)	131,23
9	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	C ₇ H ₁₅	3,3	14,20	690(677-706)	114,68
10	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	C ₉ H ₁₉	1,2	22,70	835(822-851)	133,64
11	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	C ₁₀ H ₂₁	0,8	24,20	956(941-962)	101,79

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА БІОЛОГІЧНА
ЧАСТИНА

Об'єктами дослідження є отримані нами [8], 3-алкілтіо-5-(2-,3-,4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолі:



R₁ = C₃H₇, C₆H₁₃, C₇H₁₅, C₉H₁₉, C₁₀H₂₁

Дослідження гострої токсичності проводились на кафедрі клінічної фармації, фармакотерапії та УЕФ ФПО Запорізького державного медичного університету (відповідальний виконавець к. фарм. н. Є. С. Пругло).

Дослідження проводили за експрес-методом В. Б. Прозоровського [6] на білих щурах лінії Вістар. Для визначення LD₅₀ 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіонів використовувались 5 груп тварин по 2 спостереження в кожній з додатковим використанням однієї попередньої та наступної дози. Сполуки стабілізували твіном-80 і вводили через металевий зонд у шлунок. Спостереження проводили через 24 години.

Проведені дослідження показали, що значення LD₅₀ нових похідних 1,2,4-триазол-3-тіону знаходяться в межах 500-1000 мг/кг. Згідно з класифікацією І. К. Сидорова [7] досліджувані сполуки відносяться до IV класу токсичності (малотоксичні речовини). Результати дослідження наведені в таблиці.

Дослідження актопротекторної дії (в табл. «Активність») 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів проведено на групі білих нелінійних

щурів вагою 200-260 г. При вивченні актопротекторної активності нами був використаний метод примусового плавання з навантаженням в 10 % від ваги щура. Навантаження фіксували в основі хвоста тварин. Плавання виконували до виснаження, яке фіксували після 10-ти секундного занурення лабораторних тварин під воду. Щурів занурювали поодиночі в ємність великого розміру з величиною шару води, що перевищує 60 см. Температура води складала 24-26 °С. Досліджувані сполуки вводили внутрішньоочеревинно за 20 хв до початку занурення тварин у дозі 100 мг/кг. Час запливу реєстрували в секундах. Для порівняння використовували також контрольну групу тварин, які отримували внутрішньоочеревинно фізіологічний розчин за 20 хв до занурення (табл.).

На основі результатів дослідження гострої токсичності та актопротекторної активності виявлена закономірність хімічна будова – фармакологічна дія. З результатів видно, що зі збільшенням довжини вуглеводного ланцюга збільшуються показники токсичності та актопротекторної активності. Даний факт можна пояснити тим, що синтезовані нами сполуки відносяться до таких, що мають бути поверхнево активними. З теоретичної точки зору дані сполуки містять у своєму складі неполярний вуглеводневий ланцюг, а також гідрофільну групу. При цьому зі збільшенням довжини вуглецевого ланцюга на одну метиленову групу за правилом Траубе [2] має відбуватися підвищення поверхневої активності, біодоступності та фармакологічної активності і токсичності. Для підтвердження даного припущення ми вирішили визначити схильність синтезованих речовин до адсорбції і підтвердити чи спростувати вищезазначені теоретичні припущення.

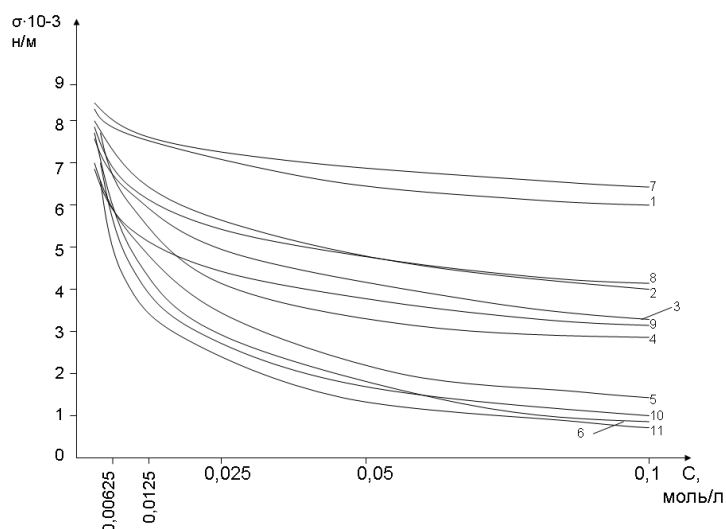


Рис. 1. Залежність поверхневого натягу від концентрації для сполук 1-11.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ФІЗИКО-ХІМІЧНА ЧАСТИНА

Для вивчення схильності до адсорбції (підтвердження правила Траубе) і проведення кореляції результатів дослідження з фармакологічними дослідженнями нами встановлено величину поверхневої активності за визначенням поверхневого натягу синтезованих речовин на межі поділу рідина – газ.

Поверхневий натяг визначали за методом Ребіндера [1], що відноситься до найбільш застосовуваних та точних динамічних методів. Вимірювання проводили з метанолом та розчинами досліджува-

них сполук різних концентрацій у послідовності від менш до більш концентрованого. Поверхневий натяг розраховували за рівнянням (1):

$$\sigma_x = K \cdot P_x \quad (1)$$

де: σ_x – поверхневий натяг розчинів, Н/м;

K – стала капіляра;

P_x – максимальний тиск повітря на межі поділу рідина – газ.

Для розрахунку поверхневої активності будували графік залежності поверхневого натягу від кон-

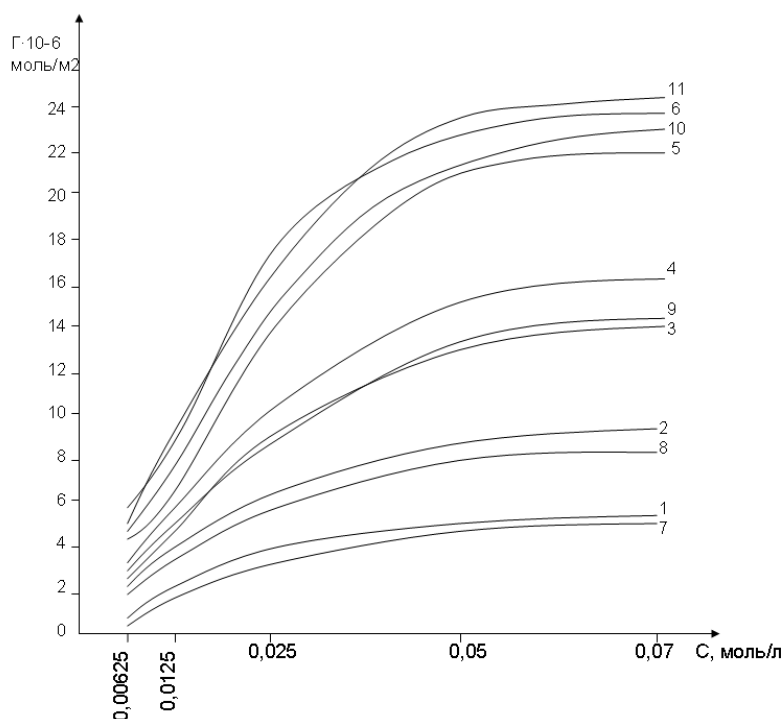


Рис. 2. Залежність величини адсорбції від концентрації для сполук 1-11.

центрації при даній температурі (ізотерму поверхневого натягу), $\sigma=f(c)$. Адсорбцію розраховували за рівнянням Гіббса:

$$\Gamma = -\frac{C}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dc}, \quad (2)$$

де: Γ – величина адсорбції розчиненої речовини, моль/м²;

C – загальна концентрація розчину, моль/м³;

R – газова стала;

T – абсолютна температура, К;

$\pm d\sigma/dc$ – поверхнева активність.

Результати досліджень поверхневого натягу (табл.), величини адсорбції представлені на рис. 1 та 2. З наведених графіків залежності поверхневого натягу та величини адсорбції від концентрації досліджуваних сполук видно, що найменший поверхневий натяг та найбільша величина адсорбції спостерігається для сполук 5-6 і 10-11 та значно менші ці показники для сполук 1 і 7. Таким чином, результати показують, що зі збільшенням довжини ланцюга адсорбційна здатність речовин збільшується, хоча і в меншій мірі, ніж за правилом Траубе, однак пропорційна залежність все ж наявна.

На основі проведених досліджень чітко видно, що наше припущення щодо підвищення поверхневої активності, біодоступності та фармакологічної активності і токсичності зі збільшенням довжини вуглецевого ланцюга на одну метиленову групу вірне. Винятком є лише сполуки 9 та 11, що проявляють меншу актопротекторну активність, незважаючи на високі показники адсорбції. Однак даний факт пояснюється поганою розчинністю сполук 9 та 11 у воді.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено токсичність і актопротекторну активність 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів. Визначено закономірність будова – дія.
2. Для 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів визначені величини поверхневої

активності та відносної адсорбції на поверхні поділу рідина – газ.

3. Проведено кореляцію величини поверхневої активності та відносної адсорбції на поверхні поділу рідина – газ з показниками токсичності і актопротекторної активності 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Евстратова К. И., Кунина Н. А., Малахова Е. Е. // Физическая и коллоидная химия. – М., 1990. – 487 с.
2. Заявка на отримання пат. України № u 2013 11767. 4-(4-(Диметиламіно)бензиліденаміно)-5-(4-нітрофеніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-тіон, що виявляє актопротекторну активність / М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко, Є. С. Пругло.
3. Калибачук В. А. Медицинская химия. – К., 2008. – С. 220.
4. Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості S-похідних 5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-триазол-3-тіонів: Дис. ... канд. фармац. наук. – 3., 2005. – 98 с.
5. Панасенко О. І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-триазолу: Дис. ... д-ра фармац. наук. – К., 2005. – 396 с.
6. Прозоровский В. Б. О выборе метода построения кривой летальности и определения средней летальной дозы / В. Б. Прозоровский // Журн. общ. биол. – 1960. – Т. 21, № 3. – С. 221-228.
7. Сидоров К. К. // Токсикология новых промышленных веществ. – М., 1973. – Вып. 13. – С. 45-71.
8. Щербак М. О., Каплаушенко А. Г., Малецький М. М. Синтез ряду 3-алкілтіо-5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-триазолів та їх подальше окиснення // Фармаком. – 2013. – № 4. – С. 53-58.
9. Sharma Jyoti, Ahmadb Shamim, Shamsheer Alam M. Bioactive Triazoles: A potential review // J. of Chem. and Pharmac. Res. – 2012. – Vol. 4 (12). – P. 5157-5164.

УДК 544.723.212:547.792-026.86**М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко****ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ 3-АЛКИЛТИО-5-(2-, 3-, 4-НИТРОФЕНИЛ)-4-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛОВ НА ИХ ТОКСИЧНОСТЬ И АКТОПРОТЕКТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ**

Одной из важнейших социальных и экономических задач фармацевтической отрасли на сегодняшний день является создание новых отечественных лекарственных средств, конкурентоспособных по сравнению с дорогими импортными препаратами. Ключевым этапом создания оригинальных лекарственных препаратов является целенаправленный синтез биологически активных веществ с выраженным фармакологическим эффектом и низкой токсичностью. Известно, что увеличение длины углеродной цепи ПАВ приводит к повышению величины адсорбции, усилению фармакологической активности и росту токсичности. Именно поэтому нами проведено определение влияния величин поверхностной активности и относительной адсорбции 3- алкилтио-5-(2-, 3-, 4-нитрофенил)-4-амино-1,2,4-триазолов, которые являются представителями одного гомологического ряда, и проведено корреляцию полученных данных с показателями токсичности и актопротекторной активностью синтезированных веществ.

Ключевые слова: 1,2,4-триазол; поверхностное натяжение; поверхностная активность; адсорбция; токсичность; актопротекторная активность

UDC 544.723.212:547.792-026.86**M. O. Shcherbak, A. G. Kaplaushenko****THE EFFECT OF ADSORPTION PROPERTIES OF 3-ALKYLTHIO-5-(2-, 3-, 4-NITROPHENYL)-4-AMINO-1,2,4-TRIAZOLES ON THEIR TOXICITY AND ACTOPROTECTIVE ACTIVITY**

One of the major social and economic goals of the pharmaceutical industry nowadays is the creation of new domestic medicines, which are competitive with expensive imported drugs. A key step in the creation of original drugs is the targeted synthesis of biologically active compounds with high pharmacological effect and low toxicity. It is known that increasing of the carbon chain length of the surfactants leads to increase of adsorption, to enhancement of pharmacological activity and higher data of toxicity. That's why we made the definition of the surface activity effect and the relative adsorption of 3-alkylthio-5-(2-, 3-, 4-nitrophenyl)-4-amino-1,2,4-triazoles, which are representatives of one type of homologous series and made the correlation of the results with indicators of toxicity and actoprotective activity of the compounds synthesized.

Key words: 1,2,4-triazole; surface tension; surface activity; adsorption; toxicity; actoprotective activity

Адреса для листування:

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

Тел. (095) 091-12-33. E-mail: marina_sherbak@mail.ru.

Запорізький державний медичний університет

Надійшла до редакції:

29.01.2014 р.

ЗМІСТ / СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**БІОХІМІЯ****СТАН ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ, АЛІМЕНТАРНО ЕКСПОЗОВАНИХ ЕСТРОГЕНАМИ**

Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат4

Состояние протеолитической системы организма крыс, алиментарно экспозированных эстрогенами / Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат

State of proteolytic system in the rat organism by alimentary estrogens exposed / T. Yu. Lykholat, O. A. Lykholat

ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ІНАКТИВОВАНИХ КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS ТА CANDIDA TROPICALIS ОКРЕМО ФОРМУВАТИ ІМУНІТЕТ ПРОТИ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

М. В. Рыбалкин, Н. И. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников8

Определение способности инаktivированных клеток грибов

Candida albicans и Candida tropicalis отдельно формировать иммунитет против кандидозной инфекции / Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников

Determining the ability of the inactivated cells of fungal Candida albicans and Candida tropicalis away form immunity against candida infection / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov

ФАРМАКОЛОГІЯ**ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ СУПОЗИТОРІЇВ З ОЛІЙНИМ ЕКСТРАКТОМ МАКЛЮРИ НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СКИПИДАРНОГО ПРОСТАТИТУ У ЩУРІВ**

Г. В. Зайченко, Ю. О. Тацький, В. А. Коротков, О. В. Андріяненко, О. О. Іванова14

Изучение фармакологического действия суппозиторий с масляным экстрактом маклюры на модели экспериментального скипидарного простатита у крыс / А. В. Зайченко, Ю. А. Тацкий, В. А. Коротков, А. В. Андрияненко, А. А. Иванова

Pharmacological study of suppositories with oil extract of maclura pomifera on the experimental model turpentine prostatitis in rats / A. V. Zaychenko, Yu. A. Tatskiy, V. A. Korotkov, A. V. Andriyanenkov, A. A. Ivanova

СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМОНІЄВИХ СОЛЕЙ ТА D-(+)-ГЛЮКОЗИЛАМІДІВ 3-ОКСАМОЇЛЗАМІЩЕНИХ N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ

М. В. Зупанець, С. М. Дроговоз, С. Г. Ісаєв, А. О. Девяткіна20

Синтез и фармакологическая активность D-(+)-глюкозиламмониевых солей и D-(+)-глюкозиламидов 3-оксамоилзамещенных

N-фенилантраниловых кислот / М. В. Зупанец, С. М. Дроговоз, С. Г. Исаев, А. А. Девяткина

Synthesis and pharmacological activity of D-(+)-glucosyl ammonium salts and D-(+)-glucosylamids 3-oxamoi substituted of N-phenylanthranilic acids / M. V. Zupanets, S. M. Drogozov, S. G. Isaev, A. A. Devyatkina

КВАНТОВО-ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛІМАРИНУ

І. С. Чекман, Г. А. Поготова, Т. Ю. Небесна, Н. О. Горчакова24

Квантово-фармакологическое исследование антиоксидантных свойств силимарина / И. С. Чекман, Г. А. Поготова, Т. Ю. Небесная, Н. А. Горчакова

Quantum-pharmacological study of antioxidant properties of silymarin /

I. S. Chekman, G. A. Pogotova, T. Yu. Nebesna, N. A. Gorchakova

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ АМІНОКИСЛОТОВІСНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ В УМОВАХ, УСКЛАДНЕНИХ ГІПО- ТА ГІПЕРТЕРМІЄЮ

Н. В. Руда, Г. І. Степанюк, О. П. Драчук29

Характеристика актопротекторного действия аминокислотосодержащих производных 1,4-нафтохинона в условиях, осложненных гипо- и гипертермией / Н. В. Руда, Г. И. Степанюк, О. П. Драчук

Characteristics of actoprotective action of aminoacids derivatives of 1,4-naphthoquinone under conditions of hypo- and hyperthermy /

N. V. Ruda, G. I. Stepanyuk, O. P. Drachuk

ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ МАЗІ З ОЛІЄЮ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ

Д. В. Семенів33

Изучение фармакологического действия мази с маслом аронии черноплодной / Д. В. Семенов

Study of pharmacological action of ointment with aronia melanocarpa oil /

D. V. Semeniv

ПОИСК НОВЫХ СУБСТАНЦИЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

А. Л. Загайко, Л. В. Галузинская37

Пошук нових субстанцій рослинного походження для лікування псоріазу / А. Л. Загайко, Л. В. Галузінська

The search of new substances of plant origin for treatment of psoriasis /

A. L. Zagayko, L. V. Galuzinskaya

ФАРМАЦЕВТИЧНА, ТОКСИКОЛОГІЧНА ХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ КОМПЛЕКСНОЇ ПЕРЕРОБКИ ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ ПІСЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ

Ю. Н. Авідзба, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, А. М. Комісаренко42

Исследование продуктов комплексной переработки листьев эвкалипта после получения эфирного масла / Ю. Н. Авидзба, О. Н. Кошевой,

А. С. Кухтенко, А. Н. Комиссаренко

Study of integrated processing products from eucalyptus leaves

after production essential oil / Yu. N. Avidzba, O. M. Koshovyi, O. S. Kukhtenko,

A. M. Komissarenko

МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ В ЕКСТРАКТАХ КУРАЮ ПАГОРБКОВОГО (SALSOLA COLLINA L.)

А. В. Глущенко46

Методика определения количественного содержания флавоноидов в экстрактах солянки холмовой (*Salsola collina* L.) / А. В. ГлущенкоQuantitative determination of flavonoids in the extracts of *Salsola collina* L. / A. V. Glushchenko**АЦИЛЮВАННЯ 4-МОНО- ТА 4,5-ДИЗАМІЩЕНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ ТА ПОКАЗНИКИ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ**

А. Г. Каплаушенко50

Ацилирование 4-моно- и 4,5-дизамещенных 1,2,4-триазол-3-тиона и показатели острой токсичности продуктов реакции / А. Г. Каплаушенко

Acylation of 4-mono- and 4,5-disubstituted of 1,2,4-triazol-3-thione and data of acute toxicity of reaction products / A. G. Kaplaushenko

DETERMINING ACCURACY IN VALIDATION OF UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHODS OF QUANTITATIVE MEASUREMENT IN FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS

L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, T. A. Kostina55

Визначення правильності в ході валідації УФ-спектрофотометричних методик кількісного визначення в судово-токсикологічному аналізі / Л. Ю. Клименко, С. М. Трут, Г. П. Петюнін, Т. А. Костіна

Определение правильности в ходе валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю.Клименко, С. Н. Трут, Г. П. Петюнин, Т. А. Костина

ВПЛИВ АДСОРБЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 3-АЛКІЛТІО-5-(2-,3-,4-НІТРОФЕНІЛ)-4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛІВ НА ЇХ ТОКСИЧНІСТЬ ТА АКТОПРОТЕКТОРНУ АКТИВНІСТЬ

М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко68

Влияние адсорбционных свойств 3-алкилтио-5-(2-, 3-, 4-нитрофенил)-4-амино-1,2,4-триазолов на их токсичность и актопротекторную активность / М. О. Щербак, А. Г. Каплаушенко

The effect of adsorption properties of 3-alkylthio-5-(2-, 3-, 4-nitrophenyl)-4-amino-1,2,4-triazoles on their toxicity and actoprotective activity /

М. О. Shcherbak, A. G. Kaplaushenko

Свідоцтво про державну реєстрацію
КВ № 19397-9197 ПР від 21.09.2012 р.

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел./факс (057) 706-30-99.

Літературний редактор А. Л. Краснікова
Коректор А. Л. Краснікова

Підписано до друку 16.04.2014 р. Формат 60х84 1/8
Умов. др. арк. 9,3. Облік.-вид. арк. 10,76
Тираж 100 пр. Зам. № 14/04.

Віддруковано у друкарні ФОП Петров В. В.
Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.
Запис № 24800000000106167 від 08.01.2009 р.
61144, м. Харків, вул. Гв. Широнінців, 79в, к. 137, тел. (057) 778-60-34.
E-mail: bookfabrik@rambler.ru