

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2002. – 567 с.

5. Пат. 13678, Україна, МПК (2006) G09B 23/28. Спосіб моделювання черепно-мозкової травми / Лук'яничук В. Д., Шевчук О. В., Бадінов О. В. ; заявник та патентовласник Луг. держ. мед. ун-т. – № u200509483 ; заявл. 10.10.05 ; опубл. 17.04.06, Бюл. № 4. – 8 с.

6. Федорова В. С. Експериментально-математичний аналіз і оптимізація режиму дозування ацетилцистеїну

при закритій черепно-мозковій травмі / В. С. Федорова, Д. С. Кравець, В. Д. Лук'яничук // Український біофармацевтичний журнал. – 2011. – № 2 (13). – С. 37–45.

7. Іванюшко В. Л. Оптимізація надання допомоги потерпілим з черепно-мозковою травмою / В. Л. Іванюшко, І. А. Павленко // Практична медицина. – 2006. – Т. 12, № 4. – С. 27–33.

8. Біохемілюмінесцентний аналіз фармакодинаміки лікарських засобів : метод. рекомендації / уклад. : В. Д. Лук'яничук, Д. С. Кравець [та ін.]. – К., 2010. – 44 с.

УДК 612.1:616.831-005.1-08:661.718.6:616-092.9

І. О. Житіна

БІОХЕМІЛЮМІНОМЕТРИЯ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНІЙ НЕДОСТАТНОСТІ ТА ЛІКУВАННІ ОК-7

*Державний заклад «Луганський державний медичний університет»,
Луганськ, Україна*

УДК 612.1:616.831-005.1-08:661.718.6:616-092.9

И. А. Житина

БИОХЕМИЛУМИНОМЕТРИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ И ЛЕЧЕНИИ ОК-7

*Государственное учреждение «Луганский государственный медицинский университет»,
Луганск, Украина*

Полученные в эксперименте данные свидетельствуют об уменьшении интенсивности свободнорадикальных реакций при использовании с лечебной целью в условиях острой цереброваскулярной недостаточности координационного соединения германия, калия и лимонной кислоты (ОК-7). Это позволяет утверждать, что для ОК-7 характерны ярко выраженные антирадикальные свойства.

Ключевые слова: острая цереброваскулярная недостаточность, свободнорадикальные реакции, биохемилуминесценция, координационное соединение германия.

UDC 612.1:616.831-005.1-08:661.718.6:616-092.9

I. O. Zhytina

BIOCHEMILUMINOMETRY OF BLOOD SERUM AND BRAIN WITH CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY AND TREATMENT WITH OK-7

A state institution "The Lugansk State Medical University", Lugansk, Ukraine

The data obtained in the experimental show a decrease in intensity of free-radical reactions during application of coordination compounds of germanium, potassium and citric acid (OK-7) for therapeutic purposes under conditions of acute cerebrovascular insufficiency. This is the grounds to confirm that OK-7 has a very pronounced antiradical properties.

Key words: acute cerebrovascular insufficiency, free-radical reactions, biochemiluminescence, coordination compounds of germanium.

Судинна патологія головного мозку залишається найважливішою проблемою клінічної та експериментальної медицини. Це пов'язано з широкою розповсюдженістю судинних захворювань мозку, високою смертністю внаслідок гострих порушень мозкового кровообігу та тяжкою стійкою інвалідизацією хворих [1]. На частку ішемічного інсульту припадає 65 % у загальній популяції населення з цереброваскулярними захворюваннями [2]. В Україні кожні 4,5 хв реєструється новий випадок інсульту, і лише 20 % пацієнтів після інсульту повертаються до попередньої роботи [3]. Засоби фармако-терапії цереброваскулярної патології, які зараз існують, далеко не завжди відповідають вимогам як у плані ефективності, так і лікарської безпеки.

Отже, пошук і розробка високоефективних та безпечних церебропротекторів є одним із пріоритетних напрямів сучасної медичної науки і, у першу чергу, фармакології.

Раніше на моделі гострого ішемічного інсульту нами було встановлено, що високу фармако-терапевтичну ефективність серед уперше синтезованих координаційних сполук германію з гідроксокислотами проявляє сполука германію, калію та лимонної кислоти (лабораторний шифр — ОК-7) [4].

Гостра ішемія головного мозку запускає складну послідовність вільнорадикальних реакцій, що ініціюють швидке формування оксидативного стресу. Це, значною мірою, пов'язано з неефективністю функціонування антиоксидантних систем організму, їх виснаженням і не-

здатністю нейтралізувати значну кількість радикалів, що утворюються. Тож в умовах гострої цереброваскулярної недостатності є доцільним цілеспрямоване використання засобів фармакологічної корекції з антиоксидантними й антирадикальними властивостями [5].

Один із сучасних високоінформативних методів дослідження вільнорадикальної активності — реєстрація біохемілюмінесценції (БХЛ). Переваги цього методу: висока чутливість, можливість виявлення навіть найбільш реакційно-здатних радикалів, які іншими способами не реєструються [6].

З огляду на вищенаведене, метою роботи є дослідження кінетики вільнорадикальних реакцій у сироватці крові щурів за умов гострої ішемії головного мозку на фоні застосування координаційної сполуки германію з калієм та ОК-7.

Матеріали та методи дослідження

Досліди виконані на 72 статевозрілих білих нелінійних щурах обох статей масою 160–200 г відповідно до методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України [7] в лабораторії кафедри фармакології Державного закладу «Луганський державний медичний університет». Як експериментальну модель гострої ішемії головного мозку використовували патологічний процес, що розвивається у тварин при двосторонній одномоментній оклюзії загальних сонних артерій до місця їх біфуркації на зовнішню та внутрішню гілки під натрій-тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Щурів розподіляли на чотири групи: інтактну, контрольну (ішемія), референтну (ішемія + пірацетам) і дослідну (ішемія + ОК-7). Тваринам дослідної групи вводили внутрішньочеревинно 1%-й водний розчин ОК-7 дозою 65 мг/кг через 35 хв після перев'язування судин. Тваринам контрольної групи в такому ж режимі вводили еквівалентний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду. Референтний препарат вводили внутрішньочеревинно дозою 250 мг/кг [8; 9].

Інтенсивність процесів БХЛ у сироватці крові та гомогенаті кори головного мозку вивчали в динаміці: через 1, 6 і 24 год з моменту оклюзії сонних артерій. Гомогенат тканин мозку (концентрація 20 %) готували на льоду протягом 5 хв після взяття біосубстрату на охолоджену (4 °С) ізотонічному розчині натрію хлориду. У роботі використовували удосконалений співробітниками кафедри метод визначення в тканинах активності процесів БХЛ, що індукували 3%-м розчином перекису водню [10]. Біохемілюмінограми сироватки крові реєстрували протягом 5 хв, а в гомогенаті головного мозку — протягом 3 хв з моменту індукції за допомогою хемілюмінометра «Emilite-1105». Спектральний діапазон приладу становить 350–390 нм, а діапазон вимірювань — 10^3 – 10^{10} фотон/с. Дослі-

джуваній біосубстрат попередньо інкубували (15 хв при 37 °С). Перед вимірюванням записували фонові значення та спонтанний рівень БХЛ.

Кінетику вільнорадикальних реакцій оцінювали за такими показниками: амплітуда швидкого спалаху (I_1), амплітуда повільного спалаху (I_2), час індукції повільного спалаху (τ), а також загальна світлосума реакції (S). Розрахунок досліджуваних параметрів проводили за допомогою спеціально розробленої на кафедрі фармакології Державного закладу «Луганський державний медичний університет» комп'ютерної програми в системі програмування Delphi. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента за програмою «Statgraphics».

Результати дослідження та їх обговорення

При вивченні змін I_1 БХЛ сироватки крові, яка відображає інтенсивність генерації вільних радикалів, у контрольній групі привертає увагу те, що величина цього показника вже на 1-й годині дослідження перевищує дані інтактної групи в 1,9 разу ($P < 0,001$), а на 6-й годині — у 2,4 разу ($P < 0,001$) (табл. 1).

При застосуванні ж ОК-7 за умов гострого ішемічного інсульту (дослідна група тварин) динаміка I_1 свідчить про вірогідне ($P < 0,01$ – $0,001$) зниження на 35–60 % рівня цього показника в усі терміни дослідження порівняно з контролем. Особливо це помітно на 6-й годині визначення, коли величина даного показника в дослідній групі (ішемія + ОК-7) менша від контрольної в 2,5 рази. Особливої уваги заслуговує той факт, що вже на 1-й і 6-й годинах дослідження I_1 дослідної серії вірогідно не відрізняється від такої в інтактних тварин.

На 24-й годині спостереження величина I_1 дослідної групи в 1,7 разу менша від референтної серії, що, безперечно, свідчить про більш виражені антирадикальні властивості ОК-7 порівняно з референтним препаратом.

Аналізуючи динаміку змін I_2 світіння, котрий, як відомо, пов'язаний з переокисненням ліпідів за участі Fe^{2+} , у контрольній групі за умов експерименту, що вивчається, визначається майже двократне збільшення цього показника щодо інтактної групи в усі терміни дослідження. Водночас на фоні застосування ОК-7 з лікувальною метою при гострій ішемії головного мозку спостерігається нормалізація цього показника, про що свідчить відсутність вірогідної різниці порівняно навіть з інтактними тваринами ($P > 0,05$). Важливо наголосити, що за цим показником уведення ОК-7 більш ефективне, ніж використання пірацетама. Картина, що спостерігається, є, на нашу думку, результатом зменшення інтенсивності генерації вільних

Таблиця 1

Вплив ОК-7 на показники біохемілюмінесценції сироватки крові у тварин з гострою ішемією головного мозку, $M \pm m$, $n=6-8$

Група тварин	Термін дослідження, год		
	1	6	24
Амплітуда швидкого спалаху БХЛ (I_1), імп/с			
Інтактна	412,87±26,11		
Контрольна	816,17± ±49,97 $P_1 < 0,001$	979,75± ±68,41 $P_1 < 0,001$	—
Дослідна	531,75± ±53,42 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$ $P_3 > 0,05$	393,37± ±29,62 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$	555,50± ±36,09 $P_1 < 0,05$ — $P_3 < 0,001$
Референтна	762,67± ±131,40 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	710,50± ±69,87 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,05$	968,50± ±54,63 $P_1 < 0,001$ —
Амплітуда повільного спалаху БХЛ (I_2), імп/с			
Інтактна	324,75±30,25		
Контрольна	722,00± ±45,39 $P_1 < 0,001$	588,87± ±57,44 $P_1 < 0,01$	—
Дослідна	447,12± ±50,92 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$	259,62± ±19,69 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$	349,00± ±43,50 $P_1 > 0,05$ — $P_3 < 0,001$
Референтна	680,17± ±11,86 $P_1 < 0,001$ $P_2 > 0,05$	579,37± ±62,93 $P_1 < 0,01$ $P_2 > 0,05$	804,87± ±60,93 $P_1 < 0,001$ —
Час індукції повільного спалаху (τ), с			
Інтактна	28,00±3,57		
Контрольна	34,50±6,49 $P_1 > 0,05$	30,00±1,84 $P_1 > 0,05$	—
Дослідна	21,12±2,01 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$ $P_3 > 0,05$	32,37±5,57 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$ $P_3 > 0,05$	26,12±2,30 $P_1 > 0,05$ — $P_3 < 0,05$
Референтна	17,50±2,75 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	29,37±3,26 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	16,62±1,85 $P_1 < 0,05$ —
Загальна світлосума реакції (S), імп.			
Інтактна	35 816,87±4788,37		
Контрольна	94 455,83± ±7276,00 $P_1 < 0,001$	84 532,37± ±13 146,25 $P_1 < 0,01$	—
Дослідна	48 643,5± ±5661,0 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,05$	39 412,37± ±4560,91 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$ $P_3 < 0,05$	42 897,68± ±4969,87 $P_1 > 0,05$ — $P_3 < 0,05$
Референтна	78 870,92± ±8704,36 $P_1 < 0,01$ $P_2 > 0,05$	71 689,31± ±9755,20 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	71 977,81± ±8361,95 $P_1 < 0,01$ —

Примітка. P_1 — вірогідність порівняно з інтактними тваринами; P_2 — вірогідність порівняно з контролем; P_3 — вірогідність порівняно з пірацетамом.

радикалів, яка відбувається саме за каталітичної участі металів змінної валентності. Загалом це сприяє запобіганню агресивній дії такого роду металів, а саме Fe^{2+} , на мітохондрії і, як наслідок, деструкції мембран нейронів [5].

Антиоксидантний профіль у тварин за умов гострої ішемії головного мозку оцінювали за τ надслабкого світіння. Величина цього показника залежить від співвідношення активностей про- й антиоксидантної систем [6]. Як показали результати біохемілюмінометрії, при застосуванні ОК-7 з лікувальною метою впродовж усіх етапів дослідження цей показник не має вірогідних відмінностей від інтактної ($P > 0,05$) і референтної серій, що свідчить про нормалізацію рівня ендогенних та екзогенних антиоксидантів під впливом досліджуваної германієорганічної сполуки. Не виключено, що саме остання і вносить суттєвий вклад у цей процес.

Не менш інформативним є аналіз S БХЛ-реакції, яка, як відомо, являє собою площу під біохемілюмінесцентною кривою та відображає інтенсивність вільнорадикального окиснення біомолекул. У середньому, в усі терміни дослідження, цей показник у контрольній групі тварин у 2,5 рази більший, ніж у інтактній групі. Це досить яскраво свідчить про посилення утворення вільних радикалів у киснедефіцитних умовах тотальної ішемії головного мозку.

Водночас у групі тварин, яким вводили ОК-7 з лікувальною метою, рівень відповідного показника вірогідно ($P < 0,01-0,05$) менший (на 49–53 %) від контролю з мінімумом на 6-й годині. Цікаво, що в усі терміни дослідження результати дослідної групи не відрізняються від інтактної серії ($P > 0,05$). Зменшення величини S може свідчити про те, що у відповідь на збільшення інтенсивності вільнорадикального окиснення починають діяти компенсаторні механізми антирадикальної спрямованості, які направлені на зменшення інтенсивності перебігу прооксидантних процесів за умов церебральної ішемії.

Наступним етапом доцільно було дослідити вплив ОК-7 на кінетику вільних радикалів безпосередньо в корі головного мозку тварин із цереброваскулярною патологією, що вивчається.

Як видно з рис. 1, у контрольній групі значення I_1 перевищують результати інтактної серії в 2,8 рази в 1-шу годину дослідження, а через 6 год з моменту оклюзії сонних артерій величина швидкого спалаху знаходиться на рівні «здорових» тварин. Тим же часом, результати дослідної групи на 1-й і 6-й годинах експерименту не відрізняються від інтактних ($P > 0,05$). Це можна розцінювати як виражену здатність досліджуваної сполуки ОК-7 зменшувати продукцію вільних радикалів безпосередньо в корі головного мозку.

Оцінюючи динаміку змін значень S БХЛ-реакції, слід зазначити, що введення досліджуваної координаційної сполуки германію щурам з неврологічною патологією, що моделюється, істотно змінює значення цього показника. Так, якщо в контролі, порівняно з інтактною групою, відзначається збільшення значень S у середньому на 25 %, то в дослідній групі інтенсивність вільнорадикального окиснення зменшується в середньому на 33 % порівняно з контролем в усі терміни дослідження (рис. 2).

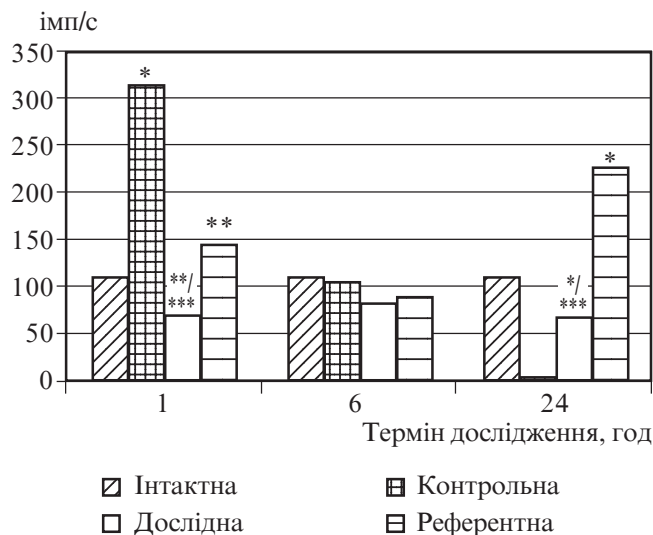


Рис. 1. Вплив ОК-7 на динаміку амплітуди швидко-го спалаху в корі головного мозку щурів за умов гострої цереброваскулярної недостатності ішемічного генезу, n=6-8. На рис. 1, 2: * — P>0,05 вірогідно порівняно з інтактною серією; ** — P>0,05 вірогідно порівняно з контрольною групою; *** — P>0,05 вірогідно порівняно з референтною групою

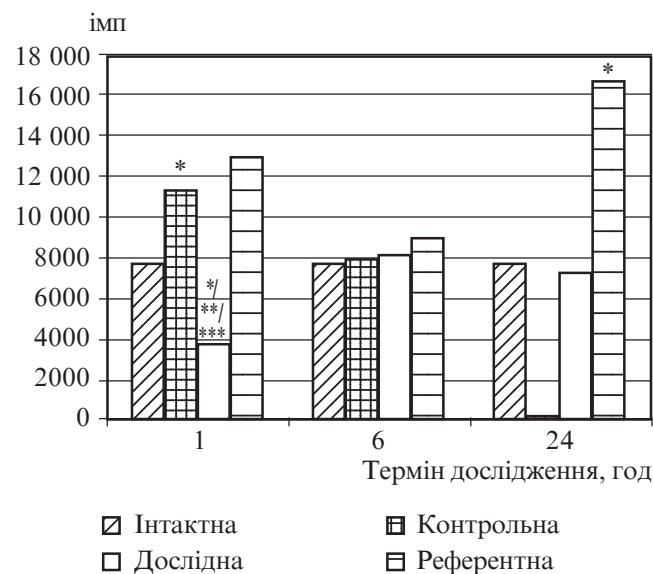


Рис. 2. Вплив ОК-7 на динаміку загальної світлосуми реакції в корі головного мозку щурів за умов гострої цереброваскулярної недостатності ішемічного генезу, n=6-8

Таким чином, отримані результати біохемілюмінометрії дають підстави дійти висновку, що в умовах гострої ішемії головного мозку відбувається гіперініціація вільнорадикальних процесів. Разом із тим, раціональне застосування з лікувальною метою координаційної сполуки германію, калію та лимонної кислоти (ОК-7) забезпечує зменшення надмірної неконтрольованої продукції вільних радикалів, що є експериментальним обґрунтуванням твердження того, що потенційному церебропротектору ОК-7 притаманні вельми виражені антирадикальні властивості, що забезпечує ефективну регуляцію прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі за умов розповсюдженої гострої форми ішемії головного мозку.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Новые возможности в патогенетической терапии хронической ишемии головного мозга* / Т. С. Мищенко, Л. А. Дзяк, В. И. Черный [и др.] // *Новости медицины и фармации*. – 2011. – № 4 (354). – С. 3–5.
2. *Коценко Ю. И.* Взаимосвязь развития парадоксальной эмболии головного мозга и мигрени у молодых женщин с функционирующим открытым овальным окном в сердце / Ю. И. Коценко // *Новости медицины и фармации*. – 2011. – № 9 (364). – С. 3–5.
3. *Ярош О. К.* Сучасні аспекти етіопатогенетичних основ терапії та профілактики атеросклерозу / О. К. Ярош, В. А. Козир, М. В. Солеймані Алігударзі // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2011. – № 1 (20). – С. 13–29.
4. *Скринінг і порівняльна оцінка протиішемічної ефективності серед координаційних сполук германію при гострій цереброваскулярній недостатності* / В. Д. Лук'ячук, І. О. Житіна, І. Й. Сейфулліна [та ін.] // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2010. – № 1/2 (14/15). – С. 61–64.
5. *Нечипуренко Н. И.* Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н. И. Нечипуренко, И. Д. Пашковская, Ю. И. Мусяенко // *Медицинские новости*. – 2008. – № 1. – С. 7–13.
6. *Биохемилюминесцентный анализ фармакодинамики лекарственных средств : метод. рекомендации / сост. : В. Д. Лукьянчук, Д. С. Кравец [и др.] ; под ред. д. мед. н., проф. В. Д. Лукьянчука*. – К., 2010. – 44 с.
7. *Доклинические исследования лекарственных средств : метод. рекомендации / под ред. чл.-корр. АМН Украины А. В. Стефанова*. – К., 2002. – 567 с.
8. *Бибик О. Ю.* Експериментальне обґрунтування комбінованого застосування ацелізіну та тіотриазоліну в умовах гострої ішемії головного мозку : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.05 «Фармакологія» / О. Ю. Бибик. – К., 2002. – 20 с.
9. *Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the piracetam in Acute Stroke Study (PASS) group* / P. P. De Deyn, J. D. Reuck, W. Deberdt [et al.] // *Stroke*. – 1997. – Vol. 28 (12). – P. 2347–2352.
10. *Методические рекомендации по использованию метода биохемилюминесценции в фармакологии* / сост. : В. Д. Лукьянчук, А. В. Стефанов [и др.] ; под ред. проф. В. Д. Лукьянчука. – Луганск, 1997. – 18 с.