

І. В. Кіреєв, Б. А. Самура

ВПЛИВ КСАФУБЕНУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ КІНІНОВОЇ СИСТЕМИ І ВМІСТ ПРОСТАГЛАНДИНІВ ГРУПИ ПГЕ₁ У ПЛАЗМІ КРОВІ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Біль і запалення є найбільш розповсюдженими симптомами, що супроводжують перебіг більшості захворювань. Для лікування цих симптомів використовують нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ). В основі механізму дії більшості НПЗЗ лежить властивість інгібувати синтез і вивільнення в організмі простагландинів. Під впливом циклооксигенази блокуються реакції арахідонового каскаду і порушується синтез простагландинів, тромбоксану А₂, простацикліну, лейкотрієнів, пригнічується агрегація тромбоцитів. Провідну роль у розвитку запального процесу відіграють ПГЕ₁, простациклін і тромбоксан [10; 12; 14; 15].

У регуляції процесів мікроциркуляції та запальних реакцій беруть участь кініни (брадикінін і калідин), які є низькомолекулярними пептидами. Особливо важлива роль у процесі утворення кінінів належить протеолітичному ферменту калікреїну, який діє у плазмі крові у вигляді попередника — прекалікреїну (калік реїногену), який перетворюється у калікреїн у процесі реакції протеолізу під дією фактора Хагемана згортальної системи крові [9; 11].

Однак більшість НПЗЗ — високотоксичні, можуть бути недостатньо ефективними та викликати деякі побічні реакції: уражати антральний відділ шлунка, спричинюючи еритему слизової оболонки, крововиливи, ерозії та виразки, підвищення рівня трансаміназ у сироватці крові, а також похитування при ходь-

бі, запаморочення, безсоння, дратівливість, стомлюваність, порушення кровотворення (гемолітичну анемію, лейкопенію аж до агранулоцитозу), підвищення артеріального тиску та ін. [5; 6; 10].

У зв'язку з цим пошук більш безпечних лікарських засобів з анальгетичними та протизапальними властивостями залишається актуальною проблемою сучасної експериментальної фармакології.

На підставі проведеного фармакологічного скринінгу заміщених і анельованих похідних ксантину для доклінічного вивчення була відібрана сполука 105: 7-β-феноксіетил-8-(5-метилфурил)-2-аміноксантин (умовна назва — ксафубен), яка має виражену анальгетичну та протизапальну активність.

Метою роботи було дослідження впливу ксафубену на активність калікреїн-кінінової системи, вміст простагландинів у плазмі крові.

Робота виконана за програмою науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету з проблеми «Створення нових лікарських препаратів» (№ державної реєстрації 0198U007008).

Матеріали та методи дослідження

Ксафубен — білий кристалічний порошок, без запаху, гірко-го смаку, добре розчинний у воді, диметилформаміді, погано розчинний в етанолі, практично не розчинний у ефірі, хлоро-

формі. Температура плавлення 140–142 °С з розкладанням.

Визначення вмісту калікреїногену та калікреїну проводили ферментним методом за Т. С. Пасхіною і А. В. Кринською [1; 7; 8], який включає два етапи. Перший етап — відокремлення калікреїну від інших компонентів кінінової системи й інших трипсиноподібних ферментів сироватки крові за допомогою ДЕАЕ — сефадексу А-50 при рН 7,0. Другий етап — вимірювання активності калікреїну та калікреїногену — проводили спектрофотометрично за швидкістю гідролізу етилового ефіру N-бензоїл-L-аргініну (БАЕЕ). Вміст калікреїногену та калікреїну виражали у міліодинацях калікреїну в 1 мл сироватки крові й обчислювали за формулою

$$\frac{D_{253}^{15} \cdot 3 \cdot 5 \cdot 100}{1,1 \cdot 15 \cdot 0,25},$$

де D_{253}^{15} — приріст оптичної густини у пробі за 15 хв (при лінійному ході реакції); 1,1 — D_{253}^{15} відповідна утворенню 1 мкмоль БА з БАЕЕ в 1 мл пробі; 3 — об'єм пробі в кюветі, мл; 5 — об'єм неадсорбованої фракції, мл; 0,25 — об'єм сироватки крові, взятої для аналізу, мл; 15 — тривалість інкубації, хв.

Радіоімунологічне визначення простагландинів ПГЕ₁ та їх кількісний підрахунок проводили за методикою і на реагентах фірми "Clinical Assay" (США). В експерименті використовували інтактних білих щурів лінії Вістар масою 160–180 г. Визначення вмісту ПГЕ₁ у плазмі прово-



дили на фоні запальної та больової реакції. Експериментальне запалення спричинювали субплантарним уведенням 0,1 мл 1%-го розчину карагеніну, больову реакцію — внутрішньочеревинним введенням 0,75%-го розчину оцтової кислоти. Ксафубен вводили внутрішньошлунково за допомогою спеціального металевго зонда за 30 хв до введення флогогенного й альгогенного агентів. Взяття крові проводили через 4 год після внутрішньошлункового введення досліджуваних препаратів. Кров у щурів брали відповідно до рекомендацій В. Д. Помойнецького [4]. Після ефірного наркозу щурів декапітували, кров відбирали у поліетиленові пробірки. Для запобігання процесам біосинтезу та метаболізму простагландинів при взятті й обробці крові пробірки ставили на лід. Як антикоагулянт використовували етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) у концентрації 1 мг/мл крові. З метою блокування у пробірках каскаду перетворень ейкозаноїдів тромбоцитами у зразки плазми додавали інгібітор простагландинсинтетази — розчин ацетилсаліцилової кислоти об'ємом 0,01 мл 0,4%-го розчину на 1 мл крові. Плазму відокремлювали центрифугуванням при 4 °С і 2000 об./хв упродовж 30 хв до повного осадження тромбоцитів і зберігали при температурі — 20 °С 2–3 дні. Екстракцію простагландинів ПГЕ₁ проводили відповідно до інструкції, яка додається до набору. До 1 мл плазми додавали 3 мл петролейного ефіру, а після видалення ліпідної фракції додавали 5 мл розчину, який містить етилацетат, ізопропанол і 0,2 *n*-хлористоводневу кислоту у співвідношенні 3:3:1. Струшували 15 с і додавали 2 мл ацетилацетату і 3 мл дистильованої води. Після центрифугування відбирали органічну фазу об'ємом 3 мл.

Колончату хроматографію проводили методом послідовної елюації за В. М. Jaffe і спів-

авторами [13] на колонках з кремнієвою кислотою сумішшю розчинників — бензолу, метанолу й етилацетату — в різних співвідношеннях. Отримані елюати випарювали у ротаційному випарнику і зберігали для проведення радіоімунологічного аналізу не більше 10–15 днів при температурі –20 °С. Для контролю виходу простагландинів з органічної фази після екскреції та хроматографічного поділу простагландинів за серіями використовували Н₃-ПГ.

Концентрацію простагландинів ПГЕ₁ у плазмі визначали радіоімунологічним методом за допомогою наборів реактивів, які дозволяють з високою чутливістю досліджувати вміст простагландинів. При побудові стандартної кривої за величиною радіоактивності в осаді розраховували відсоток зв'язування тритієм мічених і немічених простагландинів у пробі. Для визначення вмісту простагландинів у діапазоні від 9,2 до 2400 мг/мл виводили стандартну криву з 6 точок, для чого в 6 пробірок, замість проб, додавали певну кількість стандартного простагландину. На осі ординат відкладали відсоток зв'язування Н₃-ПГ, на осі абсцис — логарифм концентрацій простагландинів ПГЕ₁, які відповідають певній кількості зв'язування. Етапи радіоімунологічного аналізу проводилися відповідно до інструкції “Clinical Assay” (США). Підрахунок імпульсів проводили на сцинтиляційному лічильнику впродовж 2–5 хв. Результати розраховували за каліброваною кривою, за величиною відсотка зв'язування для кожної проби, визначеною за формулою:

$$Bn = \frac{CPMn - NSB}{B_0 - NSB} \cdot 100 \%,$$

де *Bn* — величина відсотка зв'язування для кожної проби; *CPMn* — кількість імпульсів, хв; *NSB* — неспецифічне і *B₀* — максимальне зв'язування.

Кількість ПГЕ₁ визначали за каліброваною кривою та роби-

ли перерахунок з огляду на розмір проби, яка підлягала екстрагуванню. Для точнішого розрахунку вмісту ПГЕ₁ у пробах користувалися тільки лінійною частиною каліброваної кривої, що відповідає звичайно 30–70 % зв'язування. Після визначення кількості простагландинів ПГЕ₁ порції екстракту, взятої для визначення, робили перерахунок у концентрації вихідної проби з огляду на розмір проби, що підлягала екстрагуванню; коефіцієнт ефективності екстрагування, коефіцієнт розведення для порції екстракту, що брала участь у визначенні. Кінцеві результати виражали у наномолях на літр.

При проведенні експериментальних досліджень тварини знаходилися в стандартних умовах згідно з нормами та принципами Директиви Ради ЄС з питань захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей [3].

Отримані дані статистично обробляли з використанням *t*-критерію Стьюдента, різницю вважали вірогідною при *P*<0,05 [2; 8].

Результати дослідження та їх обговорення

Отримані експериментальні дані наведені у табл. 1. Встановлено, що у щурів з експериментальним карагеніновим набряком лапки спостерігали у плазмі підвищення рівня калікреїну на 51,2 % і його плазмового попередника калікреїногену на 38,5 %.

Інгібування калікреїну спостерігалось після введення ацетилсаліцилової кислоти, при цьому рівень його зменшувався на 19,1 % порівняно з інтактними щурами і на 70,3 % у порівнянні з дослідною групою. Під дією ксафубену вміст калікреїну був на 7 % меншим за контрольний (інтактна група) і на 58,2 % нижчим, ніж у щурів дослідної групи.

Під впливом ацетилсаліцилової кислоти вміст калікреїногену в плазмі крові інтактних



Вплив ксафубену й ацетилсаліцилової кислоти на вміст калікреїну та калікреїногену у плазмі крові щурів у нормі та в умовах експериментального запалення

Умови досліджу	Доза, мг/кг	Вміст калікреїну		Вміст калікреїногену	
		МОД/мл	Щодо контролю, %	МОД/мл	Щодо контролю, %
Контроль (інтактні тварини)	—	85,60±3,46**	100	244,70±9,18**	100
Дослід (карагеніновий набряк)	—	129,50±6,35*	151,2	338,80±14,74*	138,5
Ацетилсаліцилова кислота	100	69,30±5,73**	80,9	431,3±11,8* **	176,2
Карагеніновий набряк + ацетилсаліцилова кислота	100	77,90±6,38**	91,0	452,50±16,34* **	184,9
Ксафубен	32,0	79,60±6,71**	93,0	269,70±5,59**	110,2
Карагеніновий набряк + ксафубен	32,0	88,50±5,29**	103,3	345,70±8,18*	141,3

Примітка. * — вірогідність щодо контролю (P<0,05); ** — вірогідність щодо досліджу (P<0,05).

щурів збільшився на 76,2 %, тимчасом як під дією ксафубену у щурів обох експериментальних груп практично не відрізнявся від такого у контрольної та дослідної груп в аналогічних умовах.

Таким чином, нова фармакологічна речовина ксафубен інгібує процес кініногенезу і, на відміну від ацетилсаліцилової кислоти, запобігає витраті компонентів калікреїн-кінінової системи. Зменшення швидкості реакції перетворення калікреїногену в калікреїн є фактором, що зменшує утворення медіатору запалення брадикініну.

З огляду на патогенетичну роль ПГЕ у розвитку запального процесу був вивчений вплив ксафубену на рівень ПГЕ₁. Виявлено, що рівень ПГЕ₁ у плазмі крові щурів другої групи з карагеніновим набряком лапки (табл. 2) збільшувався на 79,9 % (P<0,05). Під дією ксафубену рівень простагландинів зменшився на 63,3 % (P<0,05) порівняно з другою групою щурів з карагеніновим набряком лапки. Під дією ацетилсаліцилової кислоти і диклофенаку також спостерігали зниження вмісту простагландинів у плазмі на 65,4 і 60,7 %, відповідно, порівняно з дослідними тваринами другої групи. Підвищення активності ацетилсаліцилової кислоти у порівнянні з диклофенаком пов'язано, ймовірно, з особливостями дії на цикло-

Вплив ксафубену, аспірину, мелоксикаму та диклофенаку на вміст ПГЕ₁ у плазмі крові щурів з експериментальним карагеніновим набряком

Умови досліджу	Доза, мг/кг	Вміст ПГЕ ₁ у плазмі крові	
		нмоль/л	Щодо контролю, %
Контроль (інтактні)	—	7,72±1,08	100
Карагеніновий набряк	—	13,89±1,27*	179,9
Ксафубен	32,0	1,28±0,34*	16,6
Ацетилсаліцилова кислота	100,0	1,12±0,11*	14,5
Диклофенак	8,0	1,48±0,43*	19,2

Примітка. * — вірогідність щодо контролю (P<0,05).

оксигеназу: ацетилсаліцилова кислота спричинює повільне необоротне інактивування ферменту, тимчасом як диклофенак є конкурентним інгібітором ензиму.

Таким чином, проведені дослідження дозволили встановити кореляційну залежність між вираженими антиексудативними властивостями ксафубену і його здатністю активно впливати на кількість ПГЕ у плазмі крові щурів із карагеніновим набряком.

1. Ксафубен інгібує процес кініногенезу і, на відміну від ацетилсаліцилової кислоти, запобігає витраті компонентів калікреїн-кінінової системи.

2. Ксафубен зменшує вміст простагландинів на 63,3 % порівняно з групою щурів з експериментальним карагеніновим набряком лапки.

3. Отримані результати дозволяють рекомендувати ксафубен для подальшого вивчення фармакологічної активності та безпечності з перспективою розробки препарату для лікування больових і запальних симптомів різної етіології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. О. В. Стефанова. — К. : Видавничий дім «Авіценна», 2001. — 528 с.
2. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — К. : Морион, 2000. — 320 с.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. — Изд. 15-е, перераб., испр. и доп. — М. : ООО «Издательство Новая волна», 2008. — 1204 с.
4. Методические рекомендации к количественному анализу простагландинов, тромбоксана, простацик-



лина и циклических нуклеотидов в биологических жидкостях / под ред. А. М. Эфендиева, В. Д. Помойнецкого. — МЗ Азерб. ССР, Баку, 1984. — 42 с.

5. НПВП-ассоциированное заболевание желудочно-кишечного тракта при ревматизме в России / А. Е. Каратеев, Н. Н. Коновалова, А. А. Литовченко [и др.] // Клиническая медицина. — 2005. — № 5. — С. 33-38.

6. Сороцкая В. Н. Желудочно-кишечные осложнения как одна из причин смерти больных ревматическими заболеваниями / В. Н. Сороцкая, А. Е. Каратеев // Научно-практическая ревматология. — 2005. — № 4. — С. 34-37.

7. Пасхина Т. С. Калликреин плазмы крови — новые функции / Т. С. Пасхина // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 8. — С. 347.

8. Пасхина Т. С. Упрощенный метод определения калликреиногена и калликреина в сыворотке (плазме) крови человека в норме и при некоторых патологических состояниях / Т. С. Пасхина, А. В. Кринская // Вопросы медицинской химии. — 1974. — Т. 20, № 6. — С. 660-663.

9. Простагландины / под ред. И. С. Ажгихина. — М.: Медицина, 1998. — 416 с.

10. Энциклопедия лекарств. 12-й выпуск / гл. ред. Г. Л. Вышковский. — М.: РЛС-2005, 2004. — 1440 с.

11. Byczkowski J. I. Inhibition of state respiration and prostaglandin β -oxidation in rat liver mitochondria treated with some antipyretic drugs / J. I. Byczkowski, I. K. Korolkiewicz // Clin. Pharmacol. — 2003. — Vol. 34, N 6. — P. 33-35.

12. Ferraira S. H. Prostaglandins peripheral and central analgesia / S. H. Ferraira // Advances in Pain. Research and Therapy. — 2000. — N 5. — P. 626-634.

13. Jaffe B. M. Radioimmunoassay measurement of prostaglandin E, A and F in human plasma / B. M. Jaffe, H. R. Bernham, C. W. Parker // J. Clin. Invest. — 1973. — Vol. 52. — P. 398-405.

14. Ku E. C. Prostaglandin E₁ a potencial mediator of inflammatory response / E. C. Ku, T. M. Waswary // Biochem. Res. Pharmacol. — 2001. — N 11. — P. 241-245.

15. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor / J. L. Goldstein, F. E. Silverstein, N. M. Agrawal [et. al.] // Am. J. Gastroenterol. — 2000. — Vol. 95, № 2. — P. 1681-1690.

УДК 616.08-031.81+577.15.001.57+516:311.2

А. П. Левицький¹, О. А. Макаренко¹, К. В. Скидан²,
С. О. Дем'яненко¹, С. В. Гончарук¹, І. В. Ходаков¹

СТАН ПАРОДОНТА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ДИСБАКТЕРІОЗОМ І ТОКСИЧНИМ ГЕПАТИТОМ

¹ДУ «Інститут стоматології АМН України», Одеса

²Харківський національний медичний університет

Функціональний стан тканин пародонта в значній мірі залежить від стану інших органів, і перш за все печінки [1–3]. Остання виконує багато життєво важливих функцій, серед яких суттєве місце посідає антимікробна функція. При патології печінки її антимікробна функція стає недостатньою, внаслідок чого мікроби та їх токсини з кишок потрапляють у системний кровообіг і негативно впливають на всі системи й органи, у тому числі і на тканини ротової порожнини [3–5]. Особливо це стає небезпечним для організму за наявності дисбактеріозу (дисбіозу) кишечника, тому що значно збільшується концентрація мікробних екзо- і ендотоксинів, погіршується співвідношення пробіотичних і умовно-патогенних видів бактерій, в декілька разів зростає абсолют-

на кількість токсигенних штамів [6–7].

Мета даного дослідження полягає у вивченні стану пародонта щурів, у яких моделювали гепатит на фоні дисбіозу.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти було проведено на 32 білих щурах-самцях лінії Вістар віком 1 міс. Щурів було поділено на 4 групи по 8 особин: 1-ша — норма (інтактна); 2-га — щури, у яких відтворювали дисбактеріоз за допомогою лінкоміцину [8]; 3-тя — у щурів моделювали токсичний гепатит за допомогою гідразину [9]; до 4-ї групи увійшли щури, в яких на фоні дисбактеріозу моделювали гідразинний гепатит.

Евтаназію щурів здійснювали під тіопенталовим наркозом.

Виділяли для біохімічного дослідження тканини ясен, а також тканину альвеолярного відростка нижньої щелепи.

У щурів визначали ступінь атрофії альвеолярного відростка за Ніколаєвою [10], у гомогенатах ясен і кісткової тканини визначали такі біохімічні показники: концентрацію малнового діальдегіду (МДА) [11], концентрацію розчинного білка [12], загальну протеолітичну активність (ЗПА) [13], активність каталази [14], уреазу [15], лізоциму [16], лужної (ЛФ) та кислотної (КФ) фосфатази [17], еластази [18].

За співвідношенням активності каталази і концентрації МДА розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс (АПІ) [19], а за співвідношенням відносних активностей уреазу та лізоциму — ступінь дисбак-

