

Ю. І. Губський, Т. А. Бухтіарова, Г. Г. Горюшко, Н. В. Літвінова,
Г. І. Парамонова, Л. П. Бабенко, Т. М. Курапова, О. М. Величко
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ І ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ, КИЇВ
ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМЕНІ Д. Ф. ЧЕБОТАРЬОВА НАМН УКРАЇНИ, КИЇВ

ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ТА СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ ТА ДІЇ КЕТОРОЛАКУ І α -ТОКОФЕРОЛУ АЦЕТАТУ

Досліджено динаміку інтенсивності больової реакції за моделювання гострого больового синдрому (формаліновий тест) у щурів та вплив кеторолаку та α -токоферолу ацетату при індивідуальному і комбінованому застосуванні на інтенсивність больового синдрому, стан пероксидації в мембранах, осмотичну резистентність еритроцитів. Методами флуоресценції і флуоресцентного зондування суспензій еритроцитів за умов гострого больового синдрому виявлено ущільнення структури протеїнів-триптофанілів, зниження протеїн-ліпідного контакту в глибинних гідрофобних ланках мембран та порушення властивостей поверхні мембран еритроцитів. Завдяки індивідуальному та комбінованому застосуванню кеторолаку та α -токоферолу ацетату визначено умови стабілізації властивостей поверхні, щільності структури протеїнів та нормалізації показників у гідрофобних ланках мембран. Показано ефективність антиокиснювальної дії кеторолаку та α -токоферолу ацетату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: динаміка інтенсивності, больова реакція, гострий больовий синдром, кеторолак, α -токоферолу ацетат.

ВСТУП. Актуальною проблемою фармакології є лікування хронічного болю, що спостерігається в пацієнтів з різною патологією, у тому числі при онкологічних захворюваннях. Особливо важливою складовою при паліативній або хоспісній допомозі є застосування анальгетиків різної природи [9, 10]. Але лікування больового синдрому такими засобами не дає бажаного знеболювального ефекту. Останнім часом [5] з метою модифікації дії анальгетиків використовують антиоксиданти, однак наукові обґрунтування таких робіт відсутні.

Метою даної роботи було дослідити вплив гострого больового синдрому (ГБС) на стан біохімічних показників і структурно-функціональну організацію мембран еритроцитів щурів, а також можливі методи корекції порушень у них за умов терапевтичного застосування лікарського засобу з анальгезивною активністю – кеторолаку та антиоксиданту α -токоферолу ацетату.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Формаліновий тест – це адекватна модель гострого болю, яку широко використовують при вивченні ефективності анальгезивної дії лікарських засобів © Ю. І. Губський, Т. А. Бухтіарова, Г. Г. Горюшко, Н. В. Літвінова, Г. І. Парамонова, Л. П. Бабенко, Т. М. Курапова, О. М. Величко, 2012.

[11]. Проводили його шляхом введення 5 % розчину формаліну в дорсальну поверхню стопи задньої кінцівки щурів. За допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Lady Pain v.3" реєстрували тривалість поведінкових проявів за повний період спостереження (60 хв після ін'єкції формаліну). Відомо, що перша фаза больової реакції зумовлена виникненням компонента гострого болю та пов'язана, головним чином, із безпосередньою активацією тонких немієлінових С-волокон, більшість з яких передає імпульсацію від больових рецепторів. Друга фаза є результатом розвитку запального процесу в периферичних тканинах та змін функції ділянок сірої речовини спинного мозку, в якому розташовані нейрони больових шляхів. За даними літератури, зокрема у щурів больовий поріг протягом доби змінюється, тому всі досліді проводили в один і той самий час доби.

Експерименти проводили на нелінійних білих щурах-самцях тримісячного віку (150–200 г). Досліджували такі експериментальні групи тварин: 1-ша – інтактні щури (контроль); 2-га (ГБС) – тварини, яким вводили в дорсальну поверхню стопи задньої кінцівки 0,1 мл 5 % розчину формаліну; 3-тя (ГБС+кеторолак) – тварини, які за 15 хв до ін'єкції формаліну отримували кеторолак внутрішньом'язово

в дозі 5 мг/кг; 4-та (ГБС+ α -токоферолу ацетат) – тварини, які протягом 3-х діб до введення формаліну профілактично одержували α -токоферолу ацетат (50 мг/кг per os); 5-та (ГБС+кеторолак+ α -токоферолу ацетат) – тварини, які протягом 3-х діб до проведення формалінового тесту профілактично отримували α -токоферолу ацетат (50 мг/кг per os) та за 15 хв до ін'єкції формаліну кеторолак внутрішньом'язово в дозі 5 мг/кг. Кров для дослідження забирали через 30 хв після введення формаліну за максимального прояву больової реакції.

Стан процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в еритроцитах щурів визначали за швидкістю накопичення вторинних молекулярних продуктів перекисного окиснення фосфоліпідів – малонового діальдегіду (МДА) за умов спонтанного (НК), а також індукованого НАДФН (НЗП) та аскорбатом (АЗП) ПОЛ за 2 год інкубації [6]. Фізико-хімічні й структурно-динамічні показники в мембранах еритроцитів вивчали методами гасіння протейнової флуоресценції акриламідом [2], флуоресцентного зондування [1, 3] поверхневим зондом 1,8-АНС, глибинним гідрофобним зондом піреном (у гідрофобних ланках фосфоліпідного бішару на рівні протейн-ліпідного контакту). Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи методи варіаційної статистики [8]. Зміни осмотичної резистентності мембран еритроцитів вивчали за [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У таблиці 1 наведено загальну тривалість поведінкових реакцій у щурів за умов гострого больового синдрому і застосування кеторолаку, α -токоферолу ацетату при індивідуальному та сумісному введенні. Як видно з таблиці 1, введення формаліну викликає у тварин так званий руховий дефіцит, захисну реакцію затаювання, яка є результатом емоційної реакції страху, при цьому спостерігаються симптоми загального пригнічення центральної нервової системи.

Введення формаліну призводить до вірогідного зменшення часу активної поведінкової реакції (біг, грумінг, приймання їжі) та суттєвого збільшення часу, який щури витрачають на сон. Застосування лікарських засобів не нормалізує пасивної поведінки тварин – час, витрачений на сон, достовірно не зменшується та залишається на рівні групи ГБС. Кеторолак, як і α -токоферолу ацетат, достовірно знижує кількість часу, який тварини витрачають на приймання їжі. Комбіноване застосування цих засобів суттєво не впливає на даний показник, він менший, ніж у групі ГБС. Кеторолак практично не впливає на рухову активність (біг), знижує час грумінгу. α -Токоферолу ацетат знижує рухову активність, практично не впливає на тривалість грумінгу, його комбінація з кеторолаком також знижує рухову активність (на рівні α -токоферолу ацетату) та суттєво зменшує час грумінгу.

На рисунку 1 наведено динаміку інтенсивності больової реакції за умов індивідуального та комбінованого застосування кеторолаку й α -токоферолу ацетату протягом 60 хв. Як видно, інтенсивність больової реакції достовірно знижується в гострий період (10 хв) при комбінованому використанні кеторолаку та α -токоферолу ацетату, незначно зменшується для α -токоферолу ацетату, але для кеторолаку зниження інтенсивності больової реакції за термін 10 хв відсутнє. У другій фазі больової реакції (на 30–55 хв) кеторолак при індивідуальному, як і при комбінованому, застосуванні з α -токоферолу ацетатом суттєво зменшує больовий синдром.

Вплив досліджуваних лікарських засобів за умов ГБС на оксидантно-прооксидантну систему в мембранах еритроцитів визначали за швидкістю накопичення МДА за термін інкубації 2 год [6]. Отримані дані, наведені в таблиці 2, свідчать про те, що через 30 хв після моделювання ГБС в еритроцитах щурів відбувається зростання швидкості накопичення МДА (стану ПОЛ) порівняно з інтактними щура-

Таблиця 1 – **Загальна тривалість невольових поведінкових реакцій (спостереження 60 хв) у щурів за умов ГБС при індивідуальному та сумісному застосуванні кеторолаку й α -токоферолу ацетату**

Група тварин	Тривалість поведінкових реакцій, с			
	біг	грумінг	приймання їжі	сон
Інтактні, n=12	1121±208	360±18,30	884±41	1126±58
Інтактні+розчинник, n=10	1168±176	348±12,73	978±137	994±41
ГБС, n=20	513,25±81*	126,6±32*	172±28,6*	2053±159*
ГБС+кеторолак (внутрішньом'язово), n=10	509,0±19,3*	94,8±7,4*	54,6±5,5*#	2349±159*
ГБС+ α -токоферолу ацетат, n=10	394,4±19,2*	150,4±10,3*	86,7±8,0*#	2280±177*
ГБС+кеторолак (внутрішньом'язово)+ α -токоферолу ацетат, n=10	398,5±17,9*	43,6±3,5*#	98,9±9,8*#	2581±187*#

Примітка. * – $p < 0,02$ відносно інтактних тварин; # – $p < 0,02$ відносно ГБС.

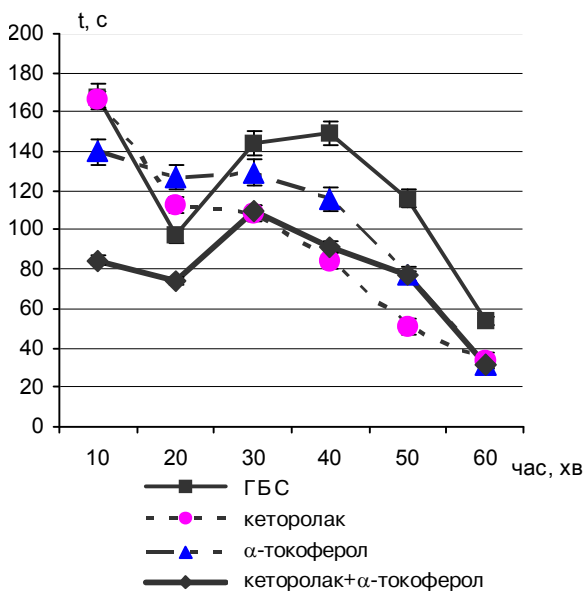


Рис. 1. Динаміка інтенсивності больової реакції за умов індивідуального та комбінованого застосування кеторолаку й α -токоферолу ацетату.

ми, але дані маловірогідні. В еритроцитах тварин при індивідуальному та комбінованому застосуванні кеторолаку й α -токоферолу ацетату вірогідно знижується швидкість накопичення МДА відносно ГБС, особливо за умов індукованого ПОЛ – НАДФН (на 34, 41 і 22 %) та аскорбатом (на 32, 76 і 41 %) для 3-ї, 4-ї і 5-ї груп відповідно. Одержані дані вказують на значну антиокиснювальну дію при індивідуальному і комбінованому застосуванні досліджуваних лікарських засобів. Було досліджено також осмотичну резистентність еритроцитарної мембрани за умов відношення ізотонічних розчинів сечовина:NaCl=50:50 мл для всіх досліджуваних груп тварин. Отримані дані свідчать (табл. 2), що при ГБС, індукованому введенням формаліну, спостерігається зниження резистентності мембран еритроцитів на 16 %, тоді як застосування α -токоферолу ацетату та його сумісно з кеторолаком значно збільшує цей показник (на 17,2 і 9,7 % відповідно), що може відображати підвищення анти-

окиснювального захисту мембрани та узгоджується з даними щодо зменшення швидкості накопичення МДА порівняно з ГБС. При використанні лише кеторолаку корекція показника за ГБС відсутня.

Для зразків еритроцитів інтактних щурів і тварин за умов ГБС при індивідуальному та комбінованому застосуванні кеторолаку й α -токоферолу ацетату методами спектрофлуориметрії та флуоресцентного зондування було проведено структурно-динамічні дослідження характеристик мембран еритроцитів – константи гасіння акриламідом протеїнової флуоресценції Штерна-Фольмера (K_{sv}), вірогідності індуктивно-резонансного перенесення енергії (W) з еритроцитів (донора електронів) на акцептор – флуоресцентний зонд пірен, мікро-в'язкості (співвідношення інтенсивностей смуг пірену F_{392}/F_{450}) та полярності середовища зонда пірену, вбудованого в мембранах еритроцитів (співвідношення смуг F_{371}/F_{392}). Параметри взаємодії поверхні мембран еритроцитів досліджуваних груп тварин із флуоресцентним зондом 1,8-АНС (показник гасіння флуоресценції V , число центрів зв'язування N , констант взаємодії $K_{вз}$) досліджували за даними гасіння флуоресценції еритроцитів зондом при флуориметричному титруванні у фізіологічному розчині [1, 3].

Для визначення показника K_{sv} було проведено флуориметричне титрування суспензій еритроцитів розчином гасника акриламідом [2]. Отримані значення флуоресценції F_n для концентрацій гасника $n=0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05$ М застосовували для розрахунку константи гасіння за формулою: $K_{sv}=(F_0-F_n)/[Q]$, де F_0 і F_n – флуоресценція суспензії до та після взаємодії з акриламідом, $[Q]$ – концентрація гасника. З наведених у таблиці 3 даних видно, що гасіння протеїнової флуоресценції еритроцитів ($C=1,57$ мкг/мл, $\lambda_{фл}$ 326 нм, $\lambda_{зб}$ 286 нм) акриламідом супроводжується зниженням значень константи K_{sv} – для тварин після дії ГБС на 22 % порівняно з даними для інтактних

Таблиця 2 – Швидкість накопичення МДА у мембранах та осмотична резистентність еритроцитів щурів за умов ГБС при індивідуальному й комбінованому введенні кеторолаку й α -токоферолу ацетату ($M \pm m$)

Показник	Група тварин				
	інтактні	ГБС	ГБС+ кеторолак	ГБС+ α -токоферол	ГБС+ α -токоферол+ кеторолак
МДА (НЗП), мкмоль/мг протеїну	313,0 \pm 2,9	330,6 \pm 3,76	224,2 \pm 30,9*#	201,3 \pm 40*#	264,2 \pm 15,8*#
МДА (АЗП), мкмоль/мг протеїну	29,7 \pm 13,3	36,28 \pm 8,8	25,1 \pm 1,2	12,5 \pm 10,2*#	21,9 \pm 8,5
МДА (НК), мкмоль/мг протеїну	30,8 \pm 0,6	29,0 \pm 2,3	26,6 \pm 13,3	26,5 \pm 5,7*	27,8 \pm 6,5*
Осмотична резистентність, %	49,9	33,9*	35,8*#	51,1#	43,6#

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно інтактних тварин; # – $p < 0,05$ відносно ГБС.

тварин (за термін 30 хв з моменту ін'єкції формаліну), що вказує на зменшення під впливом ГБС розпушеності структури протеїнів, збільшення її щільності, гальмування доступу гасника акриламиду до флуорофорів. Ефект гальмування дії гасника за умов ГБС може бути також зумовлений зміною властивостей поверхні мембран при переокисній модифікації фосфоліпідного бішару в мембрані. Наведені в таблиці 3 дані свідчать про те, що введення тваринам кеторолаку і суміші його з α -токоферолу ацетатом підвищує даний показник, порівняно з ГБС, на 24,8 і 8,9 % відповідно, тоді як введення α -токоферолу ацетату не корегує порушень, спричинених ГБС, що може бути зумовлено його взаємодією лише з ліпідним бішаром. Тобто визначено тенденцію до нормалізації значень K_{SV} у разі використання кеторолаку та при сумісному застосуванні кеторолаку з α -токоферолу ацетатом. Таким чином, за умов ГБС використання кеторолаку, як і комбіноване застосування його з α -токоферолу ацетатом, спричиняє модифікацію структури протеїнів, збільшення її розпушеності та поліпшення доступу гасника акриламиду до флуорофорів.

При флуоресцентному зондуванні суспензій еритроцитів піреном ($C=10^{-5}$ М) методом індуктивно-резонансного перенесення енергії (ІРПЕ) було визначено вірогідність (W) перенесення електрона з молекул протеїнів (триптофанів, донора електронів) на флуоресцентний зонд пірен (акцептор) [3]. Параметр W (ум. од.) визначали як $W=(F_o-F_p)/F_o$, де F_o і F_p – флуоресценція суспензій еритроцитів за довжиною хвилі 326 нм (λ_{36} 286 нм) відповідно до та після введення в суспензію еритроцитів пірену. Вірогідність ІРПЕ характеризує як частку гасіння флуоресценції протеїнів, так і ступінь вбудовування їх молекул у ліпідний каркас – відстань протеїн–ліпід, що відображає протеїн–ліпідний контакт. Як видно з наведених у таблиці 3 даних, за умов ГБС знижується, порівняно з контролем, вірогідність ІРПЕ (на 12,7 %),

зменшується протеїн–ліпідний контакт. Введення кеторолаку ще більше знижує показник W відносно ГБС (на 22 %), тоді як профілактичне введення тваринам α -токоферолу ацетату майже нормалізує цей показник (96,9 % відносно контролю), а сумісне його застосування з кеторолаком не є ефективним. Тобто під впливом лише α -токоферолу ацетату має місце тенденція до часткової нормалізації стану гідрофобних ланок у ліпідах еритроцитів, посилення протеїн–ліпідного контакту – підвищення показника W відносно значень за ГБС, що може бути зумовлено взаємодією α -токоферолу ацетату з фосфоліпідним бішаром.

Як визначив аналіз тонкої структури в спектрі пірену, зареєстрованого для суспензій еритроцитів при малій щільності приладу (1,75 нм при $\lambda_{36}=334$ нм), за умов ГБС, порівняно з контролем, збільшується мікрров'язкість середовища пірену в гідрофобних ланках бішару, про що свідчить зростання на 15 % співвідношення смуг флуоресценції F_{392}/F_{450} (ум. од.), що можливо при підвищенні вмісту продуктів ПОЛ під впливом ГБС. Індивідуальне та комбіноване застосування кеторолаку й α -токоферолу ацетату спричиняє також збільшення мікрров'язкості, зменшується ступінь ексимеризації пірену. Як видно з даних, наведених у таблиці 3, за умов ГБС у глибинних ланках фосфоліпідного бішару знижується показник полярності середовища молекул пірену – співвідношення інтенсивності флуоресценції смуг (F_{371}/F_{392}) на 14 % порівняно з контролем. Застосування кеторолаку й α -токоферолу ацетату не впливало на цей показник. Тобто флуоресцентне зондування еритроцитів піреном виявило посилення рівня гідрофобності в глибинних ланках фосфоліпідного бішару мембран еритроцитів за умов ГБС.

Вплив больового синдрому на властивості поверхні мембран еритроцитів вивчали методом флуоресцентного зондування поверхневим зондом 1,8-АНС. Флуоресцентний зонд 1,8-АНС утворює комплекси як з ліпідами, так

Таблиця 3 – Структурно-динамічні показники мембран еритроцитів інтактних та досліджуваних за умов ГБС тварин при індивідуальному і комбінованому введенні кеторолаку й α -токоферолу ацетату ($M \pm m$)

Група тварин	Інтактні (контроль)	ГБС, 30 хв	ГБС+кеторолак	ГБС+ α -токоферолу ацетат	ГБС+кеторолак+ α -токоферолу ацетат
K_{SV}, M^{-1}	4,96 \pm 0,38	3,87 \pm 0,08*	5,15 \pm 0,13#	3,19 \pm 0,32	4,25 \pm 0,29
% до контролю	100	78,0	103,8	64,3	85,7
W , ум. од.	0,354	0,309*	0,244#	0,343	0,293
% до контролю	100	87,3	68,9	96,9	82,8
F_{392}/F_{450} , ум. од.	8,043	9,218	9,360	10,400	10,89
F_{371}/F_{392} , в. од.	1,676	1,447	1,452	1,419	1,451

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно ГБС.

і з протеїнами, адсорбується та флуоресціює на поверхні мембран [1, 3]. Відома також здатність зонда АНС бути акцептором електронів протеїнів (донорів) при певних співвідношеннях концентрацій та відстані донор–акцептор менше ніж $1,2 R_0$ (R_0 – радіус Ферстера).

Флуориметричне титрування суспензій еритроцитів інтактних щурів та досліджуваних за умов ГБС тварин розчином зонда АНС виявило різницю у величинах відносної інтенсивності погашеної зондом флуоресценції. На рисунку 2а наведено залежності показника гасіння флуоресценції еритроцитів $(F_0 - F_n)/F_0 - 1/C_{АНС}$, де F_0 , F_n – інтенсивність флуоресценції еритроцитів для всіх п'яти груп до і після додавання розчину зонда 1,8-АНС, $1/C_{АНС}$ – оборотна величина концентрації доданого зонда (концентрація зонда – $5 \cdot 10^{-6}$ – $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, протеїнів – 1,57 мкг/мл). Відомо [3], що частка погашених донорів електронів (протеїнів еритроцитів) акцептором (1,8-АНС) може бути визначена апроксимацією рівняння $\beta = a[F_0/(F_0 - F_{n, \min})]^{-1}$ із

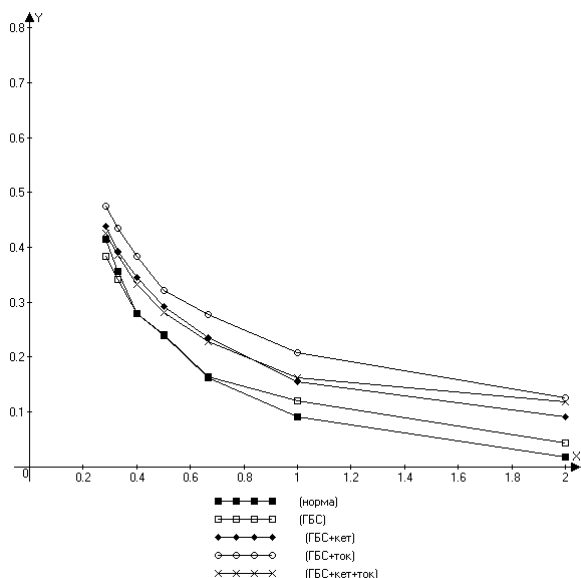


Рис. 2а. Залежності показника $(F_0 - F_n)/F_0$ від оборотної концентрації флуоресцентного зонда 1,8-АНС для групи інтактних щурів і тварин за ГБС, в яких було застосовано кеторолак, α -токоферолу ацетат та їх комбіновану дію. Вісь абсцис – $1/C_{АНС} \cdot 10^5$ М; вісь ординат – $(F_0 - F_n)/F_0$, в. од.

Таблиця 4 – Показники взаємодії флуоресцентного зонда 1,8-АНС з еритроцитами інтактних та досліджуваних за умов ГБС тварин при індивідуальному і комбінованому застосуванні кеторолаку й α -токоферолу ацетату

Показник	Група тварин				
	інтактні (контроль)	ГБС	ГБС+кеторолак	ГБС+ α -токоферолу ацетат	ГБС+кеторолак+ α -токоферолу ацетат
$(F_0 - F_n)_{\min}/F_0$	0,749	0,640*	0,661	0,699#	0,656
$K_{зв}, M^{-1}$	$2,0 \cdot 10^4$	$0,82 \cdot 10^4$	$1,73 \cdot 10^4$	$3,79 \cdot 10^4$	$1,10 \cdot 10^4$
Число центрів зв'язування, N	1,335	1,563	1,513	1,431	1,524

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно ГБС.

використанням методу подвійних оборотних координат графіка $(F_0 - F_n)/F_0 = f(1/C_{АНС})$ з лінійною екстраполяцією до перехрещення з віссю ординат. Як видно з наведених на рисунку 2а результатів АНС-флуориметричного титрування еритроцитів інтактних та досліджуваних за ГБС тварин, у разі індивідуального та комбінованого застосування кеторолаку й α -токоферолу ацетату в інтервалі концентрацій АНС $5,0 \cdot 10^{-6}$ – $3,5 \cdot 10^{-5}$ М найменше погашення флуоресценції має місце для еритроцитів інтактних щурів, а найбільше – для тварин за умов ГБС при індивідуальному введенні α -токоферолу ацетату. Для концентрацій зонда АНС більш ніж $2,5 \cdot 10^{-5}$ М для лінійної ділянки кривих було наведено екстраполяцію до перехрещення з віссю ординат. Отримано дані щодо величин максимально погашеної флуоресценції, показника β для інтактних та досліджуваних за ГБС тварин за концентрацій АНС $2,0 \cdot 10^{-5}$ – $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, які наведено на рисунку 2б і в таблиці 4.

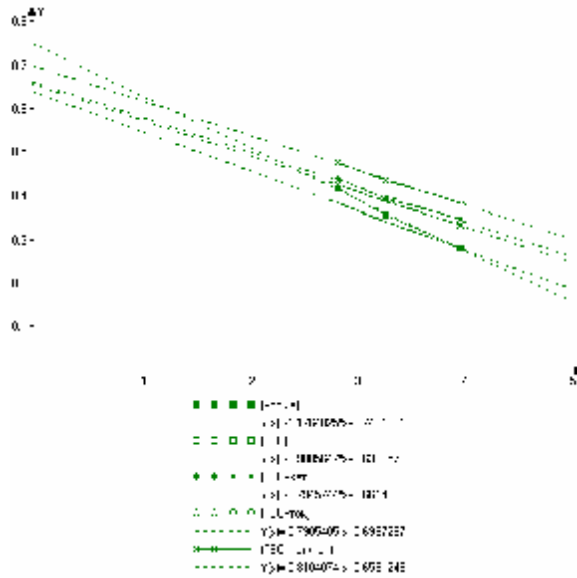


Рис. 2б. Екстраполяція лінійних ділянок залежностей $(F_0 - F)/F_0 - 1/C_{АНС}$ еритроцитів інтактних та досліджуваних за умов ГБС тварин при індивідуальному та комбінованому введенні кеторолаку й α -токоферолу ацетату. Вісь абсцис – $1/C_{АНС} \cdot 10^5$ М; вісь ординат – $(F_0 - F)/F_0$, в. од.

За даними, наведеними в таблиці 4, для отриманих значень $(F_o - F_n)/F_o$ для всіх п'яти досліджуваних груп тварин при концентраціях АНС $(2,0-3,5) \cdot 10^5$ М було визначено величини показника $(F_o - F_n)_{\min}/F_o$ (β). Як видно, частка погашеної флуоресценції еритроцитів для інтактних тварин найвища, а за умов ГБС для концентрацій зонда більш ніж $2,0 \cdot 10^5$ знижується на 14,6 % порівняно з контролем. При індивідуальному та комбінованому застосуванні α -токоферолу ацетату і кеторолаку показник β вірогідно зростає порівняно з ГБС та наближається до контролю, що відповідає результатам визначення швидкості накопичення МДА та отриманим даним щодо осмотичної резистентності.

За припущенням утворення монокомплексів протеїнів мембран еритроцитів з аніоном 1,8-АНС у співвідношенні 1:1 [7], графічно було оцінено число центрів зв'язування N та значення констант зв'язування ($K_{\text{зв}}$, M^{-1}) 1,8-АНС із мембранами еритроцитів для досліджуваних груп тварин. Показано, що значення числа центрів зв'язування N для еритроцитів щурів за умов ГБС зростає, порівняно з контролем, на 17,1 %, що може бути результатом перекисної модифікації ліпідів мембрани. У разі введення досліджуваних речовин значення N нормалізується лише в разі застосування α -токоферолу ацетату.

Отримані значення констант зв'язування ($K_{\text{зв}}$) АНС із мембранами еритроцитів для всіх п'яти груп тварин мають однаковий порядок з

тенденцією до зниження за умов ГБС, що може бути зумовлено збільшенням від'ємного заряду поверхні мембран еритроцитів у разі перекисної модифікації ліпідів.

ВИСНОВКИ. Зіставляючи отримані експериментальні дані щодо динаміки інтенсивності больової реакції (формаліновий тест) при застосуванні кеторолаку, позитивної динаміки α -токоферолу ацетату та його комбінації з кеторолаком за перші хвилини та другий період ГБС із даними досліджень стану ПОЛ у мембранах, можна визначити позитивну дію даних сполук як антиоксидантів, які знижували вміст продуктів ліпопереокиснення порівняно з ГБС. Ущільнення структури протеїнів-триптофанілів, як і зниження протеїн-ліпідного контакту за ГБС, очевидно, є результатом перекисної модифікації глибинних ланок фосfolіпідного бішару: зменшення полярності, збільшення мікров'язкості в бішарі та змін властивостей поверхні мембран, її структури. Завдяки індивідуальному та комбінованому застосуванню кеторолаку й α -токоферолу ацетату визначено умови як стабілізації властивостей поверхні (частки погашених донорів електронів поверхневим зондом 1,8-АНС – показника β), так і нормалізації вірогідності перенесення енергії (W) з протеїну на пірен та щільності структури триптофанілів (K_{sv}), що підтверджується також результатами, отриманими при вивченні динаміки інтенсивності больової реакції та дії цих препаратів на швидкість накопичення продуктів пероксидації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Владимиров Ю. В. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. В. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – М. : Наука, 1980. – 277с.
2. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко. – К. : Наукова думка, 1988. – 280 с.
3. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. – М. : Наука, 1989. – 274 с.
4. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – С. 119–120.
5. Опришко В. І. Антиоксидантна модуляція фармакологічної активності анальгетичних та протисудомних засобів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук / В. І. Опришко. – Київ, 2010. – 32 с.
6. Продукти вільнорадикального перекисного окислення та методи їх ідентифікації / І. Ф. Белені-

чев, Є. Л. Левицький, С. І. Коваленко [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.

7. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии / О. В. Свердлова. – Л. : Химия, 1985. – 248 с.

8. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127–131.

9. Тринус Ф. Медицинские аспекты менеджмента боли и паллиативной помощи / Ф. Тринус // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 5. – С. 4.

10. Тринус Ф. Ненаркотичні анальгетики у знеболюванні / Ф. Тринус, Т. Бухтіарова, О. Ядловський // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 5. – С. 13–19.

11. Чуюн Е. Н. Антиноцицептивное действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты при тонической боли у крыс / Е. Н. Чуюн, Э. Р. Джелдубаева // Ученые

записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2005. – 18 (57), № 2. – С. 211–222.

**Ю. И. Губский, Т. А. Бухтиарова, Г. Г. Горюшко, Н. В. Литвинова,
Г. И. Парамонова, Л. П. Бабенко, Т. М. Курапова, О. М. Величко**
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ НАМН УКРАИНЫ, КИЕВ
ИНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГИИ ИМЕНИ Д. Ф. ЧЕБОТАРЕВА НАМН УКРАИНЫ, КИЕВ

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА И ДЕЙСТВИЯ КЕТОРОЛАКА И α -ТОКОФЕРОЛА АЦЕТАТА

Резюме

Исследовано динамику интенсивности болевой реакции при моделировании острого болевого синдрома (формалиновый тест) у крыс и влияние кеторолака и α -токоферола ацетата при индивидуальном и комбинированном применении на интенсивность болевого синдрома, состояние перекисидации в мембранах, осмотическую резистентность эритроцитов. Методами флуоресценции и флуоресцентного зондирования суспензий эритроцитов в условиях острого болевого синдрома обнаружено уплотнение структуры протеинов-триптофанолов, снижение протеин-липидного контакта в глубоких гидрофобных звеньях мембран и нарушение свойств поверхности мембран эритроцитов. Благодаря индивидуальному и комбинированному применению кеторолака и α -токоферола ацетата определены условия стабилизации свойств поверхности, плотности структуры протеинов и нормализации показателей у гидрофобных звеньев мембран. Показано эффективность антиокислительного действия кеторолака и α -токоферола ацетата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: динамика интенсивности, болевая реакция, острый болевой синдром, кеторолак, α -токоферола ацетат.

**Yu. I. Hubsnyi, T. A. Buhtiarova, H. H. Horiushko, N. V. Litvinova,
H. I. Paramonova, L. P. Babenko, T. M. Kurapova, O. M. Velychko**
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF NAMS OF UKRAINE, KYIV
D. F. CHEBOTARIOV INSTITUTE OF HERONTOLOGY OF NAMS OF UKRAINE, KYIV

STUDYING OF BIOCHEMICAL AND STRUCTURALLY-DYNAMIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES MEMBRANES IN THE CONDITIONS OF ACUTE ALGETIC SYNDROME AND ACTION OF KETOROLAC AND α -TOXOFEROL ACETATE

Summary

There was studied the intensity dynamics of the algetic reaction in case of modelling of acute algetic syndrome (formalin test) in rats and influence of α -toxoferol acetate at combined and individual application on the intensity of algetic syndrome, state of peroxidation in membranes, osmotic resistance of erythrocytes. By the methods of fluorescence and fluorescent tubage of suspensions of erythrocytes in the conditions of an acute algetic syndrome there was revealed the induration of the structure of protein s-tryptophaniles, decrease of protein-lipid contact in deep hydrophobic links of membranes and disorder of surface properties of erythrocytes membranes. Thanks to the individual and combined application of Ketorolac and α -toxoferol acetate there were determined the conditions of stabilizaton of surface properties, density of proteins structure, and normalization of indices in hydrophobic membranes links. It was shown the efficacy of antioxidant action of Ketorolac and α -toxoferol acetate.

KEY WORDS: intensity dynamics, algetic reaction, acute algetic syndrome, ketorolac, α -toxoferol acetate.

Отримано 29.10.12

Адреса для листування: Ю. І. Губський, Інститут фармакології і токсикології НАМН України, вул. Е. Потьє, 14, Київ, 03680, Україна.