

Висновки

1. Розроблені методи іммобілізації літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на перев'язувальних засобах із використанням гідрофільних полімерів у плівки полівінілового спирту дозволяють отримувати препарати з високим виходом літичної активності, стабільні при зберіганні й γ -опромінненні.

2. Підвищення термостабільності, стійкості літичної активності іммобілізованої на марлі стерилази при кислих значеннях рН свідчить не тільки про факт стабілізувального впливу процесу іммобілізації, але й про активацію іммобілізованого ЛФК при ранових процесах.

3. Сумісна іммобілізація ЛФК із лужною протеазою на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, дозволяє в 1,7 разу збільшити бактеріолітичну активність при високому збереженні протеолітичної.

4. Первинна апробація іммобілізованих препаратів стерилази на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, в структурі полімерних плівок дове-

ла перспективність їх використання при лікуванні захворювань ЛОР-органів: хронічних отитах (мезотимпанітах, епітимпанітах), отитах грибової етіології, а також в офтальмології в опіковій терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 1974. — 210 с.

2. Повышение эффективности ампициллина при его сочетании с лизоцимом / Э. Г. Щербакова, И. С. Круглова, Т. П. Журавлева, Б. А. Ларин // Антибиотики и химиотерапия. — 1990. — Т. 35, № 6. — С. 34-36.

3. Морозова С. В. Воспалительные заболевания наружного уха // РМЖ. — 2001. — Т. 9, № 16-17. — С. 1-7.

4. Кулаев И. С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журн. — 1997. — № 3. — С. 23-31.

5. Гниломедова Л. Е. Биологические свойства препарата литических ферментов из *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 // МГУ им. М. В. Ломоносова. — М., 1986. — 22 с.

6. Hartree E. F. Determination of protein modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — Vol. 48, N 1. — P. 422-427.

7. Килочек Т. П., Бабенко Ю. С. Зависимость биосинтеза литических ферментов культурой *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 от качества посевного материала // Микробиол. журнал. — 1990. — Т. 52, № 5. — С. 12-17.

8. Полюгалина Г. В., Чередниченко В. С., Римарева Л. В. Определение активности ферментов. — М: ДеЛи принт, 2003. — С. 230-231.

9. Романовская И. И., Давиденко Т. И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизоцифа // Прикл. биохим. и микробиол. — 1999. — Т. 35, № 1. — С. 68-71.

10. Иванов Ю. И., Погорелюк А. Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.

11. Давиденко Т. И. Литическая активность иммобилизованной стерилазы (литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*) / Т. И. Давиденко, И. И. Романовская, М. А. Чуманова и др. // Хим.-фарм. журнал. — 2001. — Т. 35, № 10. — С. 14-17.

12. Давиденко Т. И. Иммобилизация ферментных препаратов // Вестник ОНУ. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.

13. Даниличев В. Ф. Исследование терапевтического эффекта ряда протеолитических ферментов при повреждениях и заболеваниях глаз. — Л.: ВМА им. С. М. Кирова, 1980. — 50 с.

УДК 616.12-008.64:615.22

Л. В. Савченкова, Т. В. Афоніна

БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІПОФЛАВОНУ З АЦЕЛІЗИНОМ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

Луганський державний медичний університет

Велике медико-соціальне значення серцевої недостатності зумовлене перш за все поширеністю даного патологічного стану (2 % населення землі страждає на серцеву недостатність) і високою летальністю хворих із даним не-

відкладним станом. За даними Української асоціації кардіологів, кожен другий із таких пацієнтів помирає протягом чотирьох років, а хворі з тяжкою формою хронічної серцевої недостатності (ХСН) — протягом року [1].

Відомо, що високоефективна фармакотерапія будь-якого патологічного стану можлива за умов досконалого вивчення патогенетичних ланок його формування. Під ХСН сьогодні розуміють патофізіологічний стан, при якому серце,



внаслідок порушення насосної функції, не може забезпечити адекватний метаболізм тканин. Водночас особливу увагу при вивченні патогенезу ХСН дослідники приділяють стану окиснювального гомеостазу організму. Саме хімічні реакції, здатні до прискорення після їх ініціації, відіграють першорядну роль у пошкодженні клітинних і субклітинних мембран. До таких реакцій належить, передусім, вільнорадикальне автоокиснення фосфоліпідів [2–7; 11; 12].

Біохемілюмінесценція (БХЛ) — один із багатьох існуючих сьогодні методів дослідження, що дозволяє швидко й адекватно оцінити інтенсивність процесів ліпідперекиснення і окиснювального гомеостазу організму в цілому. Використання методу БХЛ має ряд переваг порівняно з іншими, що існують у практичній медицині. Як відомо, надслабке світіння біосубстратів виникає при взаємодії вільних радикалів, тому їх низька стаціонарна концентрація менше позначається на чутливості методу. Крім того, для реєстрації світіння не потрібні спеціальні й тривалі процедури підготовки біологічного матеріалу до дослідження, а низьку інтенсивність надслабкого світіння біологічного матеріалу можна підвищити додаванням перекису водню [8; 9].

У зв'язку з цим представляло інтерес провести в динаміці порівняльну хемілюмінометрію сироватки крові й тканини серця тварин при ХСН на фоні курсового застосування ліпофлавоу з ацелізином, що і стало **метою** нинішнього дослідження.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені на 50 білих нелінійних щурах масою 200–250 г відповідно до методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України. Експеримен-

тальною моделлю ХСН слугував патологічний процес, що розвивається у тварин після внутрішньоочеревинного введення доксорубіцину дозою 5 мг/кг 1 раз на тиждень протягом 5 тиж [13].

Тварини були поділені на п'ять груп по 10 щурів у кожній. Перша група — інтактні тварини. Друга і третя групи (контроль) — тварини з моделюваною формою ХСН, що не отримували лікування. Четверта і п'ята групи — тварини, яким протягом 7 днів внутрішньоочеревинно вводили ліпофлавоу в комбінації з ацелізином дозами 100 і 50 мг/кг відповідно.

Інтенсивність перебігу вільнорадикальних процесів на моделі екстремального стану, що вивчається, оцінювали методом БХЛ на приладі Emilite-1105 фірми «Біо Хім Мак» австро-німецько-російського виробництва. Спектральний діапазон приладу — 350–950 нм, діапазон вимірювань — 103–1010 фотон/с. Для індукції вільнорадикальних процесів використовували 3%-й розчин перекису водню за методом, описаним Е. П. Сидоріком і співавт. [9] із застосуванням запропонованих співробітниками кафедри фармакології ЛДМУ удосконалень [8]. Оцінювали такі параметри БХЛ: амплітуду швидкого спалаху (I_1); константу K_1 інтенсивності хемілюмінесценції через 5 хв після введення перекису водню в кювету (I_k) та світлосуму реакції (S). Розрахунок показників проводили за допомогою спеціально розроблених програм для комп'ютера на базі процесора Intel Pentium-II-450 MHz.

Для проведення комплексних досліджень у рамках виконання поставлених у роботі завдань використовували сироватку, кров і гомогенат серця, зразки яких готували на льоду з додаванням охолодженого (4 °С) ізотонічного розчину натрію хлориду. Всі

дослідження виконували в динаміці: на 7-му і 14-ту добу від моменту розвитку серцевої недостатності.

Отримані результати обробляли статистично на персональному комп'ютері з використанням стандартного пакету програм "Mathematica V.5.0", "SigmaStat", оцінюючи вірогідність при рівні значущості не менше 95 % ($P < 0,05$) з використанням критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз отриманих хемілюмінограм (таблиця) довів, що при розвитку у лабораторних тварин серцевої недостатності до 7-ї доби спостереження відмічається досить виражене підвищення інтенсивності генерації вільних радикалів, що чітко відображає показник амплітуди швидкого спалаху БХЛ (I_1). Так, у сироватці крові тварин контрольної групи амплітуда I_1 на 54 % вище порівняно з показниками у інтактних тварин. У групі ж щурів, які отримували протягом 7 днів внутрішньоочеревинно ліпофлавоу з ацелізином, вказаний показник у досліджуваній строк спостереження на 49 % нижчий порівняно з контрольною групою щурів і не має вірогідних відмінностей від показників у інтактних тварин.

Подальший аналіз I_1 довів, що до 14-ї доби від моменту розвитку ХСН амплітуда швидкого спалаху БХЛ (I_1) у сироватці крові щурів контрольної та дослідної груп практично не відрізнялася від такої у інтактних тварин, хоча на фоні застосування ліпофлавоу в комбінації з ацелізином цей показник залишався на стабільно низькому рівні й був на 24 % нижчим, ніж у контролі.

У тканині серця відмічалася дещо інша динаміка зміни показників амплітуди швидкого спалаху світіння. Так, до 7-ї доби розвитку ХСН даний



**Вплив комбінованого застосування ліпофлавоу з ацелізином
на динаміку біохемілюмінесценції сироватки крові
і гомогенату серця щурів із хронічною серцевою недостатністю, n=6, M±m**

Група тварин	Терміни дослідження, доба			
	Сироватка крові		Гомогенат серця	
	7	14	7	14
Амплітуда швидкого спалаху I ₁ , імп/с				
Інтактні	466,00±26,01		391,50±27,95	
Контроль	715,25±76,68 P ₁ <0,05	496,66±101,37 P ₁ >0,05	510,20±19,56 P ₁ <0,05	640,00±50,42 P ₁ <0,05
Дослід	366,25±47,53 P ₁ >0,05 P ₂ <0,05	379,20±61,82 P ₁ >0,05 P ₂ >0,05	354,20±40,50 P ₁ >0,05 P ₂ >0,05	454,40±50,61 P ₁ >0,05 P ₂ <0,05
Константа K ₁				
Інтактні	8,50±2,18		3,57±0,64	
Контроль	11,15±3,50 P ₁ >0,05	14,00±0,26 P ₁ <0,05	1,79±0,31 P ₁ >0,05	6,66±3,52 P ₁ >0,05
Дослід	2,95±0,72 P ₁ <0,05 P ₂ >0,05	7,52±1,91 P ₁ >0,05 P ₂ <0,05	1,91±0,43 P ₁ >0,05 P ₂ >0,05	4,00±0,58 P ₁ >0,05 P ₂ >0,05
Світлосума, імп/с				
Інтактні	28 260,80±2833,70		37 211,60±3496,10	
Контроль	53 222,00±742,20 P ₁ <0,05	28 314,50±9397,08 P ₁ >0,05	4722,30±160,00 P ₁ <0,05	5782,25±348,00 P ₁ <0,05
Дослід	19 258,33±191,42 P ₁ <0,05 P ₂ <0,05	25 835,20±4118,00 P ₁ >0,05 P ₂ >0,05	4527,60±104,72 P ₁ <0,05 P ₂ >0,05	4404,20±452,72 P ₁ <0,05 P ₂ <0,05

Примітка. P₁ — вірогідність відмінностей порівняно з інтактними тваринами; P₂ — вірогідність відмінностей порівняно з контролем.

показник у контрольній групі щурів на 30 % перевищував показники у інтактних тварин. Проте вже до 14-ї доби розвитку даного невідкладного стану спостерігається прогресування виявлених змін, коли I₁ на 63 % вища за показники щурів інтактної групи. Така динаміка показників хемілюмінесценції в сироватці крові й тканини серця може свідчити про перехід токсикогенної фази модельованого стану в соматогенну, отже, про прогресування серцевої недостатності.

Курсове використання ліпофлавоу з ацелізином дозволило стабілізувати показники амплітуди швидкого спалаху в тканині серця у всі терміни (7-ма і 14-та доба) дослідження на рівні, що практично не має вірогідних відмінностей від таких у інтактних щурів (див.

таблицю). При цьому показник I₁ на фоні запропонованої фармакотерапії до 14-ї доби розвитку ХСН був на 29 % нижчим (P<0,05), ніж у контролі.

Отримані дані дозволили говорити про активацію процесів ліпідпереокиснення при ХСН, з одного боку, і про виражені, насамперед, антирадикальні властивості ліпофлавоу в комбінації з ацелізином — з другого.

Підтвердженням вищесказаного став подальший аналіз отриманих хемілюмінограм. Доведено, що константа K₁ у сироватці крові контрольних тварин із модельованою формою ХСН до 7-ї та 14-ї діб дослідження на 32 і 65 % відповідно більше, ніж у інтактних щурів. На фоні ж застосування ліпофлавоу з ацелізином указаний параметр суттєво (на

46–74 %) знижується, наближаючись до показників у інтактних тварин. Більше того, в ранні терміни спостереження (7-ма доба) K₁ вірогідно нижча за показники у здорових тварин. При вивченні константи K₁ у тканині серця виявлена схожа динаміка зміни в усі терміни дослідження, що свідчить про однаправленість виявлених змін.

Найбільш виражені зміни окиснювального статусу організму демонструються при вивченні світлосуми як інтегрального показника БХЛ сироватки крові й тканини серця в умовах експерименту. З таблиці видно, що вже до 7-ї доби дослідження цей показник у тварин контрольної групи на 88 % перевищує такий у 1-й групі (інтактні щури). Проте вже до 14-ї доби спостережен-



ня показник світлосуми БХЛ у сироватці крові контрольних тварин не має вірогідних відмінностей від показника у інтактних щурів, що ще раз підтверджує припущення про прогресування патологічного процесу і розвиток соматогенної фази невідкладного стану.

Фармакокорекція серцевої недостатності ліпофлавоном у комбінації з ацелізином до 7-ї доби дослідження дозволяє знизити показник світлосуми в сироватці крові тварин відносно такого у інтактних і контрольних щурів на 32 і 64 % відповідно ($P < 0,05$). До 14-ї ж доби спостереження показники світлосуми БХЛ не мають вірогідних відмінностей від інтактних щурів.

Дослідження показника S у тканині серця експериментальних тварин засвідчило, що найбільш виражені зміни відмічаються до 14-ї доби спостереження, коли світлосума БХЛ у контролі на 55 % перевищує таку в групі інтактних тварин. Водночас через 7 діб спостереження цей показник перевищує такий в інтактній серії лише на 26 %.

У тканині серця внутрішньочеревинне введення ліпофлавону з ацелізином дозволяє стабілізувати виявлені зміни показника світлосуми на рівні, що не має відмінностей від показника у інтактних тварин в усі терміни спостереження (див. таблицю). При цьому відносно контролю показник S до 14-ї доби дослідження знижується на 24 % і відмінності мають вірогідний характер.

Висновки

Узагальнюючи отримані результати, можна впевнено стверджувати, що при модельованій формі ХСН відмічається зрушення окиснювально-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації утворення і нагромадження продуктів перекисної деградації фосфоліпідів біомембран.

Важливо підкреслити, що в ранні терміни спостереження (через 7 діб) найбільш виражені зміни відмічаються в сироватці крові. Надалі (через 14 діб) переважають органоспецифічні зміни (у тканині серця), що потребує відповідної фармакологічної корекції.

На особливу увагу заслуговують результати вивчення фармакотерапевтичної ефективності ліпофлавону з ацелізином при серцевій недостатності, які досить переконливо свідчать про здатність даної комбінації ЛЗ пригнічувати процеси генерації вільних радикалів, запобігаючи, таким чином, окиснювальному стресу в цілому, що зрештою реалізується здатністю препаратів попереджати прогресуванню модельованого патологічного стану.

ЛІТЕРАТУРА

1. Налетов С. В., Валитова И. А. Хроническая сердечная недостаточность и метаболический синдром: Руководство для врачей. — Донецк: Норд-Пресс, 2006. — 117 с.
2. Савченкова Л. В., Бадінов О. В. Біохемілюмінесцентний аналіз фармакотерапевтичної ефективності комбінованого застосування ацелізину і тіотриазоліну у хворих з ендотоксикозом посттравматичного генезу // Ліки. — 2004. — № 3-4. — С. 81-84.
3. Бадінов А. В. Біохемілюмінесценція сыворотки крови больных с эндотоксикозом посттравматического генеза // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. — 2003. — № 2(Д) — С. 75-77.
4. Бадінов О. В. Біохемілюмінесценція як критерій важкості ендотоксикозу // Укр. мед. вісті. Часопис ВУЛТ. — 2003. — Т. 5, № 1 (63). — С. 225.
5. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути повреждения и лечения). — М.: Медицина, 1989. — 368 с.
6. Hirayama O., Yida M. Evaluation of hydroxyl radical — scavenging ability by chemiluminescence // Anal. Biochem. — 1997. — Vol. 251, N 2. — P. 297-299.

7. Hess M. L., Manson N. H. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury // J. Moll. Cell. Cardiol. — 1984. — N 16. — P. 969-985.

8. Сергеев П. В., Белых А. Г., Чукаев С. А. Влияние антиоксидантов на быструю вспышку Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции // Эксперим. и клин. фармакология. — 1992. — № 2. — С. 60-62.

9. Jwaoka T., Tabata F. Chemiluminescent detection of superoxide *in vitro* and reaction of antilipid peroxidative drug with superoxide generated electrochemically // Oxygen Chem. And Biochem. — Amsterdam, 1988. — P. 461-464.

10. Методические рекомендации по использованию метода биохемилюминесценции в фармакологии / В. Д. Лукьянчук, А. В. Стефанов, Л. В. Савченкова и др.; Под ред. проф. В. Д. Лукьянчука. — Луганск, 1997. — 18 с.

11. Сидорик Е. П., Баглей Е. А., Данко М. И. Биохемилюминесценция клеток при опухолевом процессе. — К.: Наук. думка, 1989. — 220 с.

12. Методи визначення кардіопротекторної дії лікарських засобів у фармакологічному експерименті // Метод. рекомендації ДФЦ МОЗ України. — К., 2005. — 42 с.

