

УДК 613.632+615.916]:[615.281:546.215

ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РОЗРОБЛЕНИХ ПРИРОДНИХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРІВ НА ІЗОЛЬОВАНИХ МІТОХОНДРІЯХ ІЗ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ В СИСТЕМІ IN VITRO

Гордієнко А.Д., д.фарм.н., професор

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Кудокоцева О.В., * к.біол.н., стар. наук. співр.

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків **

Анотація. З використанням мітохондріальної тест-системи досліджені токсикологічні властивості рослинних поліфенолів і есенціальних фосфоліпідів із сої та препаратів на їх основі. Показано, що відсутність роз'єднувальної дії окиснювання і фосфорилювання в ізольованих мітохондріях із печінки щурів при дії досліджених препаратів та їх субстанцій свідчить про нетоксичність діючих субстанцій і допоміжних речовин, що входять до складу препаратів.

Ключові слова: токсичність, мітохондрії, окиснювальне фосфорилювання, поліфеноли, фосфоліпіди, гепатопротектори.

Актуальність проблеми. В Державному підприємстві "Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції" розроблені і отримані природні лікарські препарати-гепатопротектори: комплексний гепатопротектор ліпофен в капсулах (синергічна композиція, яка містить поліненасичений фосфатиділхолін (ФХ) із сої, флавоноїди флакуміну, α -токоферол, тіамінобромід і піридоксину гідрохлорид; фосфоліпідна субстанція – поліненасичений ФХ із сої; препарати поліфенольної природи: гранули силібору (сума поліоксифенілхроманонів), гранули флакуміну (сума флавоноїдів зі скумпії когірїї), гранули калефлону (сума поліфенольних сполук, які містять головним чином похідні флавоноїдних і фенолкарбонових кислот) і таблетки канафлазину (діючою субстанцією якого є сума поліфенолів із золотарника канадського).

Поліфенольні препарати-гепатопротектори: таблетки альтану (дубильні речовини групи елаготанінів із шишок вільхи клейкої) і таблетки піфламіну (комплекс поліфенолів із трави гороху посівного) розроблені вченими Національного фармацевтичного університету.

Таблетки силібору за новою технологією розроблені в ТОВ Фармацевтична компанія "Здоров'я". Всі розроблені препарати дозволені Фармакологічним комітетом України до медичного застосування. Обов'язковою характеристикою лікарського препарату є вивчення його нешкідливості, що обумовило вивчення токсикологічних властивостей діючих субстанцій – поліфенолів і есенціальних фосфоліпідів із сої та розроблених препаратів на їх основі.

Вивчення токсикологічної характеристики нових БАР і препаратів на їх основі проводять з використанням ізольованих мітохондрій у системі in vitro і судять по ефекту роз'єднання окиснювання і фосфорилювання при дії останніх на мітохондрії [1].

Завдання дослідження. Дослідити можливу токсичну дію рослинних поліфенолів і есенціальних фосфоліпідів із сої та розроблених препаратів на їх основі на окиснення та фосфорилювання в ізольованих мітохондріях із печінки щурів (за ефектом роз'єднання процесів окиснення і фосфорилювання), при дії останніх на мітохондрії, полярографічним методом в умовах in vitro.

Матеріал і методи дослідження. Мітохондрії одержували з печінки білих щурів-самців масою 200-220 г в середовищі 0,3 М сахарози, 1мМ ЕДТА і 10 мМ тріс-НСІ буферу з рН 7,4. Гомогенат центрифугували при 600 г 10 хв. Одержану надосадну рідину центрифугували при 10000 г 10 хв. Осад мітохондрій суспензували в середовищі вилучення без ЕДТА (середовище промивання) і центрифугували при 10000 г 10 хв. Одержаний осад мітохондрій суспензували в середовищі промивання і зберігали при +2+4°C до використання в досліді. Реакційне середовище об'ємом 1,0 мл містило: 100 мМ сахарози, 75 мМ КСІ, 10 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ тріс-НСІ буферу з рН 7,4. В комірку полярографа вміщували 0,02 мл суспензії мітохондрій. Як субстрат дихання ізольованих мітохондрій використовували сукцинат натрію в концентрації 10 ммоль/мл. Додавання АДФ в концентрації 200 мкмоль/мл до мітохондрій, які споживають кисень

на субстраті сукцинату натрію, посилює дихання в 2,5 рази. Це свідчить про те, що у виділених мітохондріях активно протікають процеси окиснювального фосфорилування. За кривими споживання кисню мітохондріями розраховували швидкість дихання на субстраті сукцинату натрію ($V_{\text{сук.}}$). Субстанції і препарати на їх основі розчиняли в 10 мМ тріс-НСІ буфері із рН 7,4. Аліквотні об'єми розчинів субстанцій і препаратів переносили до полярографічної комірки з мітохондріями на фоні споживання ними кисню після додавання сукцинату натрію. Токсичність оцінювали за ефектом роз'єднання процесів окиснювання і фосфорилування мітохондрій за показником ($V_{\text{преп.}}/V_{\text{сук.}}$). Із суспензією мітохондрій працювали не більше 5 годин після їх виділення.

Споживання кисню суспензією мітохондрій реєстрували на полярографі ОН-102 (Угорщина) з використанням закритого платинового електрода типу Кларка при 30°C. Вміст білка мітохондрій визначали за методом Lowry [2].

Отримані результати опрацьовані методами варіаційної статистики, з використанням критерію Стьюдента [3].

Результати дослідження. З наведених в таблиці даних видно, що ліпофен й поліненасичений ФХ із сої в концентрації 1 мг/мл не стимулювали дихання ізольованих інтактних мітохондрій на сукцинату натрію, що свідчить про збереженість процесів окиснювання і фосфорилування мітохондрій при дії вказаних препаратів на інтактні ізольовані мітохондрії в системі *in vitro*.

В той же час есенціале (препарат порівняння) в концентрації 1 мг/мл призводив до вираженого прискорення дихання мітохондрій на сукцинату натрію, що свідчить про збільшення препаратом протонної провідності внутрішньої мембрани мітохондрій, що, у свою чергу, викликає порушення

Таблиця

Вплив поліфенольних і фосфоліпідних субстанцій і препаратів на їх основі на дихання ізольованих мітохондрій із печінки щурів у системі *in vitro* (нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка), ($M \pm m$; $n=6$)

| Препарати та субстанції | Показники дихання | |
|--|-------------------|--------------------|
| | $V_{\text{сук.}}$ | $V_{\text{преп.}}$ |
| силібору гранули | 8,53±0,39 | 8,51±0,49 |
| субстанція силібору | 8,30±0,36 | 8,48±0,46 |
| флакуміну гранули | 8,80±0,40 | 8,70±0,45 |
| субстанція флакуміну | 8,63±0,78 | 8,85±0,94 |
| калефлону гранули | 8,60±0,40 | 8,50±0,45 |
| субстанція калефлону | 8,50±0,43 | 8,3±0,4 |
| силібору таблетки за новою технологією | 8,70±0,55 | 8,60±0,45 |
| субстанція силібору | 8,30±0,36 | 8,40±0,45 |
| альтану таблетки | 8,40±0,40 | 8,45±0,46 |
| субстанція альтану | 8,20±0,35 | 8,35±0,40 |
| піфламіну таблетки | 8,70±0,40 | 8,60±0,45 |
| субстанція піфламіну | 8,60±0,70 | 8,70±0,85 |
| канафлазину таблетки | 8,50±0,40 | 8,40±0,55 |
| субстанція канафлазину | 8,40±0,45 | 8,30±0,50 |
| ліпофен | 8,45±0,72 | 8,47±0,68 |
| ФХ із сої | 9,45±0,53 | 9,46±0,50 |
| есенціале | 8,95±0,62 | 18,78±1,63* |

Примітки: 1. $V_{\text{преп.}}$ у порівнянні з $V_{\text{сук.}}$. 2. * – $p < 0,05$. 3. n – кількість спостережень. здатності синтезувати АТФ.

Як видно з таблиці додавання таблеток альтану в концентрації 32,0 мг/мл, таблеток піфламіну в концентрації 2,56 мг/мл, таблеток силібору за новою технологією в концентрації 6,15 мг/мл, таблеток канафлазину в концентрації 3,2 мг/мл, що відповідає концентраціям 0,8 мг/мл субстанцій, які входять до складу готових лікарських форм препаратів і субстанцій альтану, піфламіну, силібору, канафлазину в концентраціях 0,8 мг/мл до ізольованих мітохондрій не впливало на швидкість їхнього дихання на субстраті сукцинату натрію, що свідчить про те, що ні препарати, ні субстанції не є роз'єднувачами процесів окиснення і фосфорилування мітохондрій з печінки щурів і не є токсичними.

Вивчення впливу гранульованих лікарських форм препаратів у порівнянні з їх діючими субстанціями показало, що додавання гранул флакуміну в концентрації 14 мг/мл, гранул силібору в концентрації 3 мг/мл і гранул калефлону в концентрації 6,5 мг/мл, що відповідає концентраціям 0,2 мг/мл субстанцій, які входять до складу готових лікарських форм препаратів і субстанцій флакуміну, силібору і калефлону в концентраціях 0,2 мг/мл до ізольованих мітохондрій не впливало на швидкість їхнього дихання на субстраті сукцинату натрію (таблиця). Це свідчить також про те, що вказані субстанції, і лікарські препарати не роз'єднували процеси окиснювання і фосфорилування мітохондрій, виділених із печінки щурів.

Вивчення нами токсикологічних властивостей поліфенольних сполук і есенціальних фосфоліпідів із сої, а також препаратів на їх основі на мітохондріальній тест-системі *in vitro* показало, що тільки есенціалне роз'єднував окиснювання і фосфорилування в ізольованих інтактних мітохондріях з печінки щурів. Стимулюючи поглинання протонів і знижуючи таким чином електрохімічний потенціал на мембрані мітохондрій, необхідний для синтезу АТФ, есенціалне зменшував енергопостачання клітини за рахунок дихання [4]. Експериментально це виражалось у збільшенні швидкості дихання мітохондрій на субстраті сукцинаті після добавлення есенціалне.

Таким чином, вивчені нами поліфенольні субстанції і есенціальні фосфоліпіди та готові лікарські форми препаратів на їхній основі в досліджених дозах не є роз'єднувачами процесів окиснювання і фосфорилування ізольованих мітохондрій, тобто вони не проявляють токсичного ефекту.

Висновок

Комплексний гепатопротектор ліпофен у капсулах і поліфенольні препарати (таблетки альтану, піфламіну, канафлазину, силібору, отримані за новою технологією, гранули флакуміну, силібору і калефлону, а також їх діючі субстанції, на відміну від есенціалне, не роз'єднували окиснювання і фосфорилування мітохондрій при додаванні їх до вказаних органел в системі *in vitro*, що свідчить про нетоксичність діючих субстанцій і допоміжних речовин, які входять до складу лікарських препаратів.

Література

1. Ротенберг Ю.С. Эксперименты на изолированных митохондриях и возможность количественного переноса получаемых результатов на целостный организм / Ю.С. Ротенберг // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М.: Наука, 1973. – С.213–219.
2. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
3. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И.П. Ашмарин, Н.Н. Васильев, В.А. Амбросов. – Л.: изд-во Ленингр. ун-та, 1975. – 77 с.
4. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки / А. Ленинджер; пер. с англ. – М.: Мир, 1974. – 956 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗРАБОТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ НА ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В СИСТЕМЕ IN VITRO

Гордиенко А.Д. д. фарм.наук., профессор

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Кудокоцева Е.В. * канд. биол. наук., стар. науч. сотр.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков *

Аннотация. С использованием митохондриальной тест-системы исследованы токсикологические свойства растительных полифенолов и эссенциальных фосфолипидов из сои и препаратов на их основе. Показано, что отсутствие разобщающего действия окисления и фосфорилирования в изолированных митохондриях из печени крыс при действии исследуемых препаратов и их субстанций свидетельствует о нетоксичности действующих субстанций и вспомогательных веществ, которые входят в состав препаратов.

Ключевые слова: токсичность, митохондрии, окислительное фосфорилирование, полифенолы, фосфолипиды, гепатопротекторы.

INVESTIGATION OF TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THE DEVELOPED NATURAL HEPATOPROTECTORS ON MITOCHONDRIA ISOLATED FROM LIVER OF RATS IN VITRO

Gordienko A.D., Kudokotseva O.V.*

Kharkiv state zooveterinary academy, Kharkiv

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine, Kharkiv*

Summary. Toxicological properties of plant polyphenols and essential phospholipids from soy and the drugs on their basis have been studied with the use of mitochondrial test-system. It has been shown that the absence of disconnecting effect of oxidation and phosphorylation in the mitochondria isolated from the liver of rats under the influence of the tested drugs and their substances prove the non toxicity of the active substances and additional ones that are in the composition of the drugs.

Key words: toxicity, mitochondria, oxidative phosphorylation, polyphenols, phospholipids, hepatoprotectors.

УДК 636.5:615.9:615.015.01

ПРОФІЛАКТИКА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І КОРЕКЦІЯ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПТИЦІ ЗА ОТРУЄННЯ НЕОВЕРМОМ

Жукова І.О., д.вет.н., доцент,
Антіпін С.Л., к.с.-г.н., доцент,
Костюк І.О., к.с.-г.н., доцент,
Водоп'янова Л.А., к.біол.н., доцент,
Лонгус Н.І., ст. викладач

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. У статті наведені дані щодо впливу на організм курей нового антигельмінтного препарату неоверму за умов одноразового введення його у токсичній дозі. Встановлено, що в результаті утворення підвищеного рівня продуктів ПОЛ у крові птиці недостатньо потенціалу власних ресурсів АОС для запобігання впливу АМК і відповідного включення протективних антирадикальних механізмів, але цей процес можна корегувати за допомогою препарату «Е-селен» у 5-кратній дозі, що підтверджує активація каталази і відновлення пулу ендогенної загальної АОА на фоні зберігання фізіологічних рівнів інтенсивності процесів ліпопероксидації.

Ключові слова: неоверм, кури, перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), дієнові кон'югати (ДК), малоновий діальдегід (МДА), антиоксидантна система (АОС), антиокислювальна активність (АОА), Селен, вітамін Е, (активні форми кисню АФК).

Актуальність проблеми. Погляди науковців на проблему дослідження потенційних ризиків отруєнь біотичної або ксенобіотичної етіології, нажаль, мають традиційний характер та обмежуються визначенням у біологічних об'єктах низки класичних токсико-біохімічних тестів (оцінювання функціонального стану печінки, системи гемопоезу тощо). Але ці пропуски доповнює цитотоксикологія, яка стверджує, що в основі цитотоксичних ефектів будь-якого потенційного токсиканту або отрути лежить окиснювальний стрес і запальні реакції [1]. Відомо, що цитоплазматична мембрана ушкоджується у першу чергу, оскільки вона слугує бар'єром між позата внутрішньоклітинним оточенням, що забезпечує селективний транспорт речовин [2]. Активні метаболіти кисню (АМК), які належать до класу найбільш реакційно активних, вважають високо токсичними, здатними ушкоджувати клітинні системи та їх біомембрани через окиснювальну деградацію ліпідів, білків, ДНК і РНК за вільнорадикальним механізмом, тому, навіть відносно невеликі кількості продуктів, зокрема ліпопероксидації, будуть впливати на експресію генів, репараційні, метаболічні та біосинтетичні процеси [3, 4].

Метою досліджень є встановлення токсичної дії на антиоксидантну систему курей нового антигельмінтика неоверму за одноразового його застосування.

Матеріали і методи дослідження. У досліді використали 12 курей, масою 1100-1200 г яких розділили на 2 дослідні (n=8) і 1 контрольну групу (n=4). Кури I групи отримували неоверм одноразово, шляхом введення у шлунок 10-кратної токсичної дози (0,4 мг/кг на 1 кг маси тіла), II групи – 0,4 см³ неоверм + «Е-селен» (10 см³ на 1 л води для випоювання). Контрольній групі птиці вводили воду.

Інтенсивність процесів перекисного окиснювання ліпідів (ПОЛ) оцінювали через 7 діб за визначення у плазмі крові концентрації його продуктів – дієнових кон'югатів (ДК) і малонового