

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ТИМЧИШИН Олег Львович

УДК 615:547.419.5

**ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ
НОВОЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ
РЕЧОВИНИ – КУПРУМ-
ОКСІЕТИЛІДЕНДИФОСФОНАТОГЕРМАНАТУ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Одеса — 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеському національному медичному університеті
МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **ГОДОВАН Владлена
Володимирівна**, Одеський національний медичний
університет МОЗ України, м. Одеса, професор кафедри
загальної та клінічної фармакології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **СОТНІКОВА
Олена Петрівна**, Державна установа «Інститут очних
хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН
України», м. Одеса, завідувач лабораторії фармакології
і тканинної терапії

доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки
і техніки України **БОБИРЬОВ Віктор Миколайович**,
Вищий державний навчальний заклад України «Українська
медична стоматологічна академія» МОЗ України, м. Пол-
тава, завідувач кафедри експериментальної та клінічної
фармакології з клінічною імунологією та алергологією

Захист відбудеться «___» _____ 2015 р. о ___ годині на за-
сіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.600.01 Одеського національного ме-
дичного університету МОЗ України (65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 2).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського національного
медичного університету МОЗ України (65082, м. Одеса, пров. Валіховський, 3).

Автореферат розісланий «___» _____ 2015 р.

В.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради Д 41.600.01,
д. мед. н., професор



К. Л. Сервецький

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Пошук нових високоефективних і безпечних біологічно активних речовин (БАР) та їх фармакологічне вивчення – важлива задача сучасної фармакології. Одним з перспективних підходів цього напрямку є створення БАР на основі комплексних сполук з біологічно активними лігандами. Це, по-перше, обумовлено тим, що організм людини є складно діючою поліметалевою і полілігандною системою [Burger K. et al., 2001; Thiele D. J., 2003; Орлова С. И., 2012]. По-друге, такий підхід дозволяє поєднувати в одній сполуці різні види активності і тим самим цілеспрямовано змінювати спектр фармакологічної дії, зменшувати токсичність БАР [Кукес В. Г. и соавт., 2001; Сарымзакова Р. К. и соавт., 2006; Шубчинська А. С. та співавт., 2008]. Особливий інтерес викликають сполуки біометалів з мікроелементами, оскільки ці складові беруть активну участь у багатьох регуляторних та адаптаційних процесах організму [Скальный А. В., 2004; Сейфуллина И. Й. и соавт., 2014].

Доцільність і перспективність такого підходу до створення нових лікарських засобів, зокрема, підтверджується дослідженнями в галузі фармакології комплексних сполук германію. Вони мають достатньо низьку токсичність і широкий спектр фармакологічних властивостей (нейротропні, антигіпоксичні, антиоксидантні, кардіо-, гепатопротекторні, протизапальні, антимікробні, протівірусні та ін.) [Кресюн В. Й. та співавт., 2011; Лучишин Т. Р., 2013; Годован В. В. та співавт., 2014; Висоцький А. А., 2014; Варбанець О. І., 2014; Лук'янчук В. Д. та співавт., 2014; Ніженковський О. І., 2014]. Тому цілеспрямованим синтезом була створена нова БАР в ряду координаційних сполук германію з оксіетилідендифосфонової кислоти і есенціальним мікроелементом купрумом – купрум-оксіетилідендифосфонатогерманат (за робочою назвою медгерм). Вибір складових даної сполуки обумовлений наступним. ДифосфONOва кислота є унікальною кислотою, яка, з одного боку, пригнічує активність фосфоліпаз, ферментів, що гідролізують мембранні фосфоліпіди й ліпопротеїди, а з іншого, замінює ушкоджені структурні компоненти біологічних мембран, чим сприяє відновленню їх функцій і забезпеченню стійкості до шкідливих впливів [Юрьева Э. А. и соавт., 2001; Константинова М. М., 2002; Lipton A., 2007; Годован В. В., 2008; Варбанець Л. Д. и соавт., 2014]. Препарати на її основі використовують як регулятори мінерального обміну, протипухлинні та протівірусні засоби, антидоти при отруєнні токсичними і радіоактивними елементами тощо [Uetake T. et al., 2007; Weissglas M. et al., 2007; Pritchard K. I., 2007; Issat T. et al., 2007]. Купрум відіграє важливу роль у метаболічних процесах, впливаючи на активність понад 30 ензимів, і міститься зазвичай в організмі у вигляді комплексних сполук з білками (церулоплазмін, гемокупреїн, плацентокупреїн, гепатокупреїн та ін.) [Скальный А. В., 2004; Zhang C. M. et al., 2008; Керимкулова и соавт., 2013]. Основний купрумвмісний білок плазми крові церулоплазмін виконує в організмі ряд важливих біологічних функцій: активує окиснення аскорбінової кислоти, біогенних амінів (норадреналіну, серотоніну) і сульфгід-

рильних сполук, інактивує активні форми кисню, запобігаючи перекисному окисненню ліпідів (ПОЛ), підвищує стабільність клітинних мембран, бере участь в імунологічних реакціях, іонному обміні [Ващенко В. И. и соавт., 2006; Щербинина М. Б. и соавт., 2009; Мартынова С. Н. и соавт., 2010]. Він стимулює гемопоез, здійснює взаємозв'язок між купрумом і ферумом, транспорт купруму до інших купрумвмісних білків, ферментів (цитохромоксидази, тирозинази, аскорбінази та ін.) тощо. Будучи кофактором супероксиддисмутази, купрум сприяє антиоксидантному захисту організму [Эделева Н. В. и соавт., 2005; Кожин А.А. и соавт., 2013]. Він прискорює процеси окиснення глюкози, гальмування розпаду глікогену в печінці, підвищує активність інсуліну, бере участь в процесах тканинного дихання тощо. Купрум має велике значення для підтримки морфологічного стану кістково-хрящової системи (колаген), кровоносних судин, легневих альвеол, шкіри (еластин); входить до складу мієлінових оболонки нервів [Мазепа А. І. та співавт., 2002; Дзюба А. Н. та співавт., 2008; Harris M. J., 2009]. Цей мікроелемент має протизапальну активність, підвищує стійкість організму до деяких інфекцій [Овсяннікова Н. М., 2007; Башкірова Л. М., 2008]. Враховуючи вищевикладене, доцільним було б встановити фармакологічну активність медгерму, чому і присвячена ця робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету (ОНМедУ) МОЗ України за темою «Пошук і комплексне вивчення фармакологічного профілю нових біологічно активних речовин метаболітного походження і ксенобіотиків» (№ держреєстрації 0110U006658). Дисертант є співавтором зазначеної теми.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження є оцінка токсикофармакологічного профілю нової біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендифосфонатогерманату (медгерму), виявлення її специфічної активності та основних механізмів дії.

Для досягнення зазначеної мети розв'язувалися такі задачі:

1. Оцінити токсикологічні властивості прицільно синтезованої сполуки купрум-оксіетилідендифосфонатогерманату.
2. Встановити загальнофармакологічний профіль медгерму.
3. За допомогою біохімічних і морфологічних методів визначити вплив нової БАР на морфологічний стан інтактних тварин.
4. Оцінити ефективність медгерму в динаміці розвитку гострого токсичного ураження печінки порівняно з референс-препаратом.
5. За допомогою лазерної кореляційної спектроскопії встановити біофізичні зміни складу сироватки крові і гомогенату тканини печінки під впливом медгерму у інтактних тварин і на фоні галактозамінового гепатиту.
6. Виявити основні механізми гепатозахисної дії медгерму.

Об'єкт дослідження: створення і доклінічне вивчення нових вітчизняних високоефективних і безпечних лікарських препаратів.

Предмет дослідження: встановлення безпеки і фармакологічної активності нової оригінальної біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендифосфонатогерманату з метою створення високоефективного лікарського засобу.

Методи дослідження: фармакологічні, токсикологічні, біохімічні, біофізичні, морфологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше у гострому експерименті на двох видах тварин встановлено, що нова комплексна сполука – купрум-оксіетилідендифосфонатогерманат (медгерм) належить до малотоксичних сполук при пероральному застосуванні і помірно токсичних при внутрішньоочеревинному і підшкірному введенні. За результатами вивчення підгострої, субхронічної і хронічної токсичності, кумулятивних, місцевоподразнювальних та антигенних властивостей також виявлена нешкідливість медгерму. Вперше встановлено його депримуєчий вплив на ЦНС, анксиолітична активність, відсутність гіпнотичної і міорелаксантаї дії, а також анагетичний, протизапальний ефекти, підсилення детоксикаючої функції печінки. Вперше показано вплив медгерму на моноаміноергічну центральну передачу, що виявлялось антагоністичною взаємодією з амфетаміном, синергізмом з 5-окситриптофаном.

Вперше виявлено, що курсове внутрішньоочеревинне введення медгерму інтактним тваринам не викликало суттєвих змін інтегральних біохімічних показників, активності маркерних ферментів печінки, вмісту купруму і церулоплазміну у сироватці крові та печінці, не призводило до грубих незворотних морфологічних порушень паренхіматозних органів. Усі вищевказані ефекти та зміни в організмі тварин під впливом БАР мали дозозалежний характер і, в основному, виявлялись в достатньо високих дозах ($1/40 > 1/80$ ЛД₅₀).

Вперше встановлено гепатозахисний ефект профілактично-лікувального введення медгерму (0,4 мг/кг) при гострому галактозаміновому гепатиті. Це підтверджено 100 % виживаністю тварин, суттєвим зменшенням виразності змін вже на 1-у добу і у 2-5 разів швидшим відновленням у крові та тканині печінки активності ферментів цитолізу і холестази, інтегральних показників функціонального стану печінки, вмісту купруму і церулоплазміну, а також патоморфологічних проявів у печінці порівняно з нелікованим гепатитом. Гепатопротекторна дія медгерму реалізувалась переважно за рахунок активації ферментативної і неферментативної частин антиоксидантної системи, а також внаслідок пригнічення ПОЛ, зменшення вмісту загального холестерину в крові та печінці. Вперше запропоновано спосіб оцінки тяжкості перебігу гострого токсичного гепатиту за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії гомогенату тканини печінки. Даним методом також підтверджено протекторну ефективність медгерму при галактозаміновому гепатиті, який перевищував дію референс-препарату в 1,5-2 рази.

Новизна досліджень підтверджена 2 патентами України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів. Проведене дослідження дозволило отримати нові дані про фармакологічний профіль цілеспрямовано синтезованої комплексної сполуки в ряду оксіетилідендифосфонатогерманатів.

Експериментально обґрунтовано доцільність застосування медгерму як потенційного високоефективного і безпечного гепатопротекторного лікарського засобу. Отримані цікаві дані про його загальнофармакологічний профіль представляють інтерес для подальшого поглибленого дослідження сполуки, а також сприятимуть синтезу в цьому ряду нових БАР із заданою дією.

За отриманими даними оформлено 2 нововведення, які внесені у Реєстр галузевих нововведень 2013 року (випуск № 38-39). Результати роботи впроваджено у навчальний процес кафедри фармакології ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, кафедри фармакології, клінічної фармакології та фармакоеконіміки Дніпропетровської державної медичної академії, кафедри експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія», кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, кафедри фармакології з клінічною фармакологією ВДНЗ "Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського".

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук за темою роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, виконано експериментальне дослідження; проведена статистична обробка отриманих даних, які оформлено у вигляді таблиць та рисунків; проаналізовано та узагальнено результати досліджень; опубліковано та апробовано основні дані, а також написано та оформлено дисертацію і автореферат.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були оприлюднені на міжнародній науково-практичній конференції «Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині» (Одеса, 2010), VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010), XIII Конгресі світової федерації Українських лікарських товариств «100 років Українському лікарському товариству» (Львів-Київ-Чикаго, 2010), XV ювілейній міжнародній науково-практичній конференції «Спортивна медицина, лікувальна фізкультура та валеологія – 2010» (Одеса, 2010), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 90-річчю від дня народження професора О. О. Столярчука «Клінічна та експериментальна фармакологія метаболічних коректорів, органопротекція, доказова медицина» (Вінниця, 2010), науково-практичній конференції «Актуальні питання професійної патології» (Одеса, 2011), XI з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства «100 років українському лікарському товариству» (Харків, 2011), XXX Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2013), XII з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (Київ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології екології, медицини та фармакології» (Харків, 2013), науково-практичній конференції «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань в світлі доказової медицини» (Вінниця, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових робіт, з них – 6 статей у профільних періодичних виданнях (5 – у журналах, рекомендованих МОН України, в тому числі 1 – у індексованому, який внесений до міжнародних наукометричних баз, 1 – у зарубіжному наукометричному журналі), 2 патенти України на корисну модель і 11 тез доповідей на міжнародних конференціях, з'їздах та конгресах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 212 сторінках комп'ютерного тексту, яка складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури. Робота ілюстрована 31 таблицею і 50 рисунками. Бібліографічний покажчик включає 344 джерела, з них 179 – кирилицею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проводили на 526 щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, 317 нелінійних мишах-самцях масою 18-20 г, 12 кролях породи Шиншила та 12 мурчаках гладенькошерстної породи, які утримувалися в звичайних умовах експериментально-біологічної клініки ОНМедУ на стандартному харчовому раціоні при природному світловому циклі. Досліди проводились відповідно до вимог GLP, методичних рекомендацій Державного експертного центру МОЗ України [Стефанов А. В., 2002] та комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 68 від 24 жовтня 2014 р.).

В експериментах використовували нову комплексну сполуку германію – оксидетилідендифосфатогерманату купруму (II) під робочою назвою «медгерм» - $\text{Cu}_4[\text{Ge}_6(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-Oedph})_6]\cdot 40\text{H}_2\text{O}$, яка цілеспрямовано синтезована під керівництвом зав. кафедри загальної хімії і полімерів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, з. д. н. т., проф. І. Й. Сейфулліної, за що автор висловлює подяку.

Дослідження гострої токсичності медгерму вивчали при його введенні мишам і щурам трьома шляхами: внутрішньоочеревинний (в/о), підшкірний (п/ш) та пероральний (п/о). Підгостра токсичність досліджувалась протягом 28 діб при його в/о введенні; субхронічна та хронічна — відповідно 3 і 6 міс при п/о застосуванні за загальноприйнятими методами [Стефанов О. В., 2002]. ЛД₅₀ БАР визначали за В. В. Прозоровським (1962). Кумуляційні властивості медгерму оцінювались за методом С.Ю. Кагана і В. В. Станкевича (1964); місцево-подразнювальна дія (на кролях) та антигенні (на мурчаках) – відповідно за А. W. Naues (1989) та О. Г. Алексеевой (1988).

Дослідження загального фармакологічного профілю БАР на інтактних тваринах проводилось в тестах «відкритого поля» [Буреш Я. та співавт., 1991], «стрижня, який обертається» [Андронати С. А. и соавт., 1982]. Аналізувались ефекти сумісного введення БАР зі стандартними депримиючим (тіопентал, 20,0 мг/кг; «Київ-медпрепарати», Україна) і збуджуючим (амфетаміну сульфат, 1,0

мг/кг; «Фармсинтез», Росія) засобами, а також 5-окситриптофаном (300 мг/кг, Merck KGaA, Німеччина) [Гацура В. В., 1974; Машковский М. Д. и соавт., 1983]. Дослідження периферійного компоненту анальгетичного ефекту БАР проведено на моделі «ощових корчів» за методом Wood R. L. et al. (1941). Протизапальну активність медгерму вивчали на моделі карагенінового і зимозанового набряків (відповідно субплантарне введення 1 % розчину карагеніну і 2 % суспензії зимозану) [Стефанов А. В., 2002]. Протинабрякову дію медгерму оцінювали методом плетизмографії [Мандрієвська Н. М., 1997].

Вивчення впливу БАР на морфофункціональний стан інтактних тварин проводили при її в/о введенні протягом 14-ти діб дозами 1/40, 1/80 і 1/160 ЛД₅₀. Тварини було розподілено на 4 групи (n=6): I група (контроль) в/о отримувала 0,9 % розчин хлориду натрію; II-IV групам протягом 14-ти днів вводився водний розчин медгерму дозами 1/40, 1/80 і 1/160 ЛД₅₀ відповідно.

Вивчення можливої гепатопротекторної дії нової БАР проводили на моделі гострого токсичного гепатиту, який відтворювали у щурів одноразовим в/о введенням D-галактозаміну (400 мг/кг у вигляді 20 % водного розчину) [Годован В. В., Кресюн В. Й., 2005]. За показниками виживаності тварин було проведено вибір дозового режиму введення медгерму. Це дослідження проведено при кількох режимах в/о введення медгерму трьома дозами (0,79, 0,40 та 0,20 мг/кг, тобто 1/80, 1/160 та 1/320 ЛД₅₀): профілактичному (за 7 діб до введення галактозаміну), лікувальному (протягом 7 діб після введення токсиканту) і профілактично-лікувальному (за 7 днів до і протягом 7 днів після введення гепатотоксиканту). У подальшому дослідження гепатопротекторної активності БАР проведено на тлі галактозамінового гепатиту при профілактично-лікувальному в/о введенні медгерму дозою 0,4 мг/кг (1/160 ЛД₅₀). Як референс-препарат використовувався есенціале® Н (Авентіс Фарма Дойчланд ГмбХ, Ей. Натгерман енд Сайі ГмбХ, Німеччина) дозою 5 мг/кг. Контрольна група в/о отримувала 0,9 % розчин хлориду натрію у еквівалентному об'ємі.

Оцінку впливу медгерму на інтактних тварин та перебіг галактозамінового гепатиту проводили за змінами у сироватці крові (СК) та супернатанті гомогенату тканини печінки (ТП) тварин активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), вмісту загального білка, сечовини, загального білірубину, загального холестерину, глюкози з використанням наборів «BioSystems» (Іспанія). Вміст купруму в СК і ТП оцінювали за допомогою наборів фірми «Pliva-Lachema Diagnostika» (Чехія), церулоплазміну – АТ «Реагент» (Україна). Стан ПОЛ і антиоксидатної системи (АОС) визначали у СК і ТП за рівнем ТБК-реактантів [Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г., 1977], глутатіону відновленого [Ellman G. L., 1959], активністю каталази [Королюк М.А. и соавт., 1988] і супероксиддисмутази (СОД) [Костюк В. А. и соавт., 1990].

Інтегральна оцінка змін біофізичного складу СК і гомогенату ТП тварин виконана методом лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) за допомогою лазерного кореляційного спектрометра «ЛКС-03» (Інститут ядерної фізики РАН, РФ).

Оцінка впливу медгерму на макроморфологічні зміни паренхіматозних органів проводилась шляхом їх огляду, вимірювання та зваженні при розтині. Мікроморфологічні зміни визначали на світловому мікроскопі Olimpus C41 (Японія) при забарвленні препаратів за гематоксиліном і еозином, а також виявлення PAS-позитивних речовин [Луппа Х., 1980]*.

Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи програму Microsoft Excel за методом обчислення середнього арифметичного та його рівня значимості за критерієм достовірності Стюдента [Лапач С. Н. и соавт., 2001].

Результати дослідження. *Встановлення нешкідливості БАР.* Вивчення гострої токсичності медгерму показало, що ця сполука за класифікацією [Стефанов А. В., 2002], належить до класу малотоксичних сполук (IV клас токсичності) при п/о застосуванні (у мишей ЛД₅₀ достовірно склала 2517,73 (2429,06÷2606,40), шурів — 2366,29 (2278,32÷2454,26) мг/кг) і помірно токсичних сполук (III клас токсичності) при в/о і п/ш (у мишей ЛД₅₀ достовірно склала відповідно 113,55 (95,81÷131,28) і 163,26 (145,66÷180,85), шурів — 63,55 (45,81÷81,28) і 73,26 (55,66÷90,85) мг/кг). Аналіз параметрів гострої токсичності у тварин та їх екстраполяція на людей встановили, що нова БАР не має потенційної небезпеки розвитку отруєння і практично нешкідлива для людини. У ході дослідження підгострої (28 діб), субхронічної (3 міс) та хронічної (6 міс) токсичності медгерм субтоксичними дозами 1/10, 1/20 ЛД₅₀ не спричиняв якої-небудь негативної дії на дослідних тварин. Нешкідливість БАР підтверджена відсутністю кумулятивних, місцевоподрознювальних та антигенних властивостей.

Оцінка загальної фармакологічної активності БАР в діапазоні доз. У тесті «відкрите поле» виявлено депримуєчу нейротропну дозозалежну (1/40>1/80ЛД₅₀) дію сполуки. Так, дозою 1/40 ЛД₅₀ медгерм виявив суттєвий і достовірний пригнічуючий вплив на горизонтальну локомоцію (на 61,8 %), емоційну реактивність (43,7 %), емоційну тривожність (на 67,7 %) та орієнтовано-дослідницьку активність (на 63,1 %). При дворазовому зменшенні його дози встановлено зменшення депримуєчого ефекту сполуки, крім впливу на емоційну реактивність, яка при введенні і 1/40, і 1/80 ЛД₅₀ знижувалась приблизно однаково (відповідно на 43,7 і 48,8 %, p<0,05). Введення медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ практично не впливало на поведінкові реакції у гризунів.

Сумісне введення БАР з «класичним» психостимулятором встановило їх антагоністичну взаємодію, яка виявлялася в дозозалежному зниженні амфетамін-індукованого збудження. Найбільш виразну активність мала доза 1/40 ЛД₅₀, а дозою 1/160 ЛД₅₀ медгерм практично не змінював ефекти психостимулятора на поведінкові елементи тварин. Цікаво, що при сумісному застосуванні БАР дозою 1/80 ЛД₅₀ з амфетаміном спостерігались певні особливості у поведінці шурів: достовірно підвищення кількості таких поведінкових елементів як «грумінг» (на 80,7 %), «обнюхування» (на 32,4 %). Крім того, медгерм даною

дозою не тільки більш стабільно зберігав протитривожну активність шурів, ніж дозою 1/40 ЛД₅₀, але й суттєво (в 2,4 рази) збільшував її виразність. При цьому краще зберігалась орієнтовано-дослідницька активність тварин.

При дослідженні взаємодії БАР з класичним депресантом ЦНС тіопенталом натрію встановлено, що медгерм, введений за 30 хв до аналізатора трьома дослідними дозами, достовірно не впливав на швидкість настання сну у тварин, тобто не впливав на біодоступність тіопенталу натрію. Проте дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ БАР достовірно скорочувала тривалість сну (відповідно на 52,1 та 47,0 %), що могло б свідчити про антагоністичну дію з ГАМК-міметиком. Проте у 2-й серії дослідів, коли БАР вводилась за 24 год до тіопенталу натрію, медгерм дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ (p<0,05) також зменшував тривалість сну, що дозволило дійти висновку про посилення під його дією детоксуючої функції печінки та вплив на біотрансформацію аналізатора. Ймовірна наявність гепатотропної дії у медгерму, що є підставою для подальшого вивчення його впливу на печінку. Відсутність гіпнотичної дії у медгерму, купрумвмісної сполуки, можна пояснити даними літератури про асомногенні ефекти цього мікроелемента [Juhasz G. et al., 1990; Nevsimalova S. et al., 2011; Song C. H. et al., 2012].

При оцінці феномену «струшування голови» було встановлено синергізм медгерму дозою 1/80 ЛД₅₀ з 5-окситриптофаном, що свідчить про його міметичний вплив на серотонінергічну передачу.

При дослідженні ефектів медгерму на м'язову координацію мишей у тесті «обертвого стрижня» у жодній з досліджуваних доз медгерму не викликала міорелаксанта дії і не впливала на координацію рухів тварин.

При вивченні периферичного компоненту ймовірного анальгетичного ефекту медгерму за умов відтворення «оцтових корчів» було зареєстровано гальмуючий дозозалежний її вплив (1/40>1/80 ЛД₅₀) на локальну активацію медіаторів болю і запальну реакцію.

На моделі карагенінового гострого запалення було встановлено, що найбільш значний відсоток інгібування набряку спостерігався при застосуванні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ на 30-й та 180-й хв (відповідно на 95,0 і 41,3 %, p<0,05). Проте найбільш рівномірний як за часом, так і виразністю вплив на запалення відмічався при введенні БАР дозою 1/80 ЛД₅₀. Медгерм дозою 1/160 ЛД₅₀ практично не мав антиексудативної дії. Отже, медгерм реалізує гальмівний вплив на циклооксигеназний шлях розвитку запалення. На моделі зимозанового набряку медгерм трьома дослідними дозами не виявив протизапального ефекту, що свідчить про відсутність впливу БАР на ліпооксигеназний шлях перетворення арахідонової кислоти.

Виявлення впливу курсового застосування медгерму в діапазоні доз на біохімічні показники і морфологічний стан інтактних тварин. У результаті експериментів виявлено, що медгерм по-різному впливав на активність маркерних ферментів печінки. Якщо активність ферменту цитолізу АлАТ СК і ТП шурів майже не відрізнялася від контролю, то активність іншого ферменту цитолізу АсАТ і ферментів холестази на фоні курсового в/о введення медгерму дозозалежно змінювалась як СК, так і ТП (рис. 1). Причому, при збільшенні активно-

* Висловлюю щире подяку проф. кафедри патморфології ОНМедУ А. І. Даніленко за консультативну допомогу у виконанні морфологічних досліджень.

сті ферменту у СК спостерігалось зменшення його активності у ТП і, навпаки.

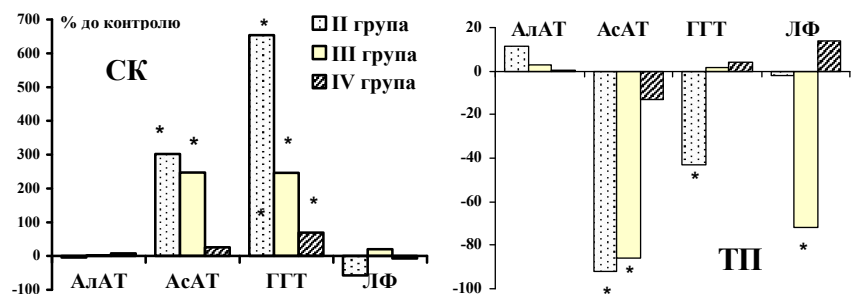


Рис. 1. Динаміка зміни активності АлАТ, АсАТ, ГГТ і ЛФ в сироватці крові і тканини печінки інтактних щурів на фоні курсового введення медгерму різними дозами
У рис. 1 і далі: * - достовірність порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Активність АсАТ СК відносно контролю підвищувалась при введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀ у 4,02 рази ($p < 0,05$), 1/80 ЛД₅₀ – 3,47 ($p < 0,05$), а 1/160 ЛД₅₀ – тільки у 1,25 рази. Водночас у ТП щурів відмічено значне зниження активності АсАТ відповідно у 12,41 ($p < 0,05$), 7,23 ($p < 0,05$) та 1,14 рази.

Подібний вплив медгерм здійснював і на активність ГГТ. При введенні БАР дозою 1/40 ЛД₅₀ збільшення її активності у СК відносно контролю було максимальним (у 7,54 рази, $p < 0,05$), а дозою 1/160 ЛД₅₀ – мінімальним (у 1,69 рази). Водночас у ТП щурів відмічено не такі виразні зміни активності ГГТ (див. рис. 1).

На фоні застосування БАР зміни активності ЛФ мали деякі відмінності. Хоча у СК вони і мали дозозалежний характер, проте їх виразність була меншою, а спрямованість неоднозначною. При введенні доз 1/40 і 1/160 ЛД₅₀ активність ЛФ СК зменшувалась відповідно у 2,35 ($p < 0,05$) і 1,08 рази, а при застосуванні 1/80 ЛД₅₀ підвищувалась у 1,20 рази. При цьому медгерм дозою 1/40 ЛД₅₀ практично не змінював активність ЛФ ТП, а 1/80 ЛД₅₀ зменшував у 3,51 рази ($p < 0,05$). При застосуванні БАР дозою 1/160 ЛД₅₀ активність ЛФ підвищувалась у 1,14 рази ($p > 0,05$).

При курсовому в/о введенні медгерм практично дозозалежно, але порізнному впливав на інтегральні біохімічні показники функціонального стану організму (загального білка, сечовини, загального білірубину, загального холестерину, глюкози сироватки крові та печінки). Найбільш виразні й односпрямовані зміни відносно контролю спостерігались у вмісті останніх двох показників. При введенні БАР 1/40 ЛД₅₀ вміст загального холестерину достовірно зменшувався у СК та підвищувався у ТП відповідно у 2,59 і 7,15, глюкози – у 1,49 і 2,70 разів, 1/80 ЛД₅₀ – загального холестерину у 1,47 і 5,15, глюкози – у 1,23 і 1,79 разів. При введенні інтактним щурам медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀

спостерігалось відносно контролю достовірно зменшення в СК вмісту загального холестерину у 1,64 рази та підвищення вмісту глюкози у ТП у 1,27 рази ($p < 0,05$). Вміст сечовини і у СК, і у ТП збільшувався у 1,19 та 1,41 рази відповідно при введенні медгерму дозою 1/40 ЛД₅₀. Зміни при введенні медгерму інтактним щурам вмісту загального білка, загального білірубину у СК мали не такий виразний характер як у ТП.

Враховуючи, що медгерм у своєму складі містить есенціальний мікроелемент купрум, було важливо оцінити зміни вмісту купруму та купрумвмісного білка церулоплазміну в СК та ТП інтактних щурів на фоні його курсового введення. БАР дозами 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ достовірно підвищувала вміст купруму в СК у 1,37 і 1,15 рази відповідно, практично не змінюючи його у ТП (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст купруму та церулоплазміну в сироватці крові та тканині печінки на фоні курсового в/о введення різних доз медгерму інтактним щурам

| Група тварин | Вміст купруму | | Вміст церулоплазміну | |
|------------------------------|---------------|------------------------------|----------------------|--------------------------|
| | СК (мкмоль/л) | ТП (мкмоль/г _{тк}) | СК (мг/л) | ТП (мг/г _{тк}) |
| I (контроль) | 105,65±7,61 | 63,78±4,68 | 1135,75±66,04 | 198,79±31,67 |
| II (1/40 ЛД ₅₀) | 144,67±6,82* | 62,55±6,97 | 1453,96±24,47* | 67,05±10,01* |
| III (1/80 ЛД ₅₀) | 121,67±6,95* | 57,55±5,63 | 1436,31±86,83* | 119,20±13,87* |
| IV (1/160 ЛД ₅₀) | 109,17±4,73 | 62,08±7,92 | 1241,04±90,25 | 184,00±19,16 |

БАР (1/40 і 1/80 ЛД₅₀) викликала також достовірно збільшення вмісту церулоплазміну у СК (у 1,28 і 1,27 рази відповідно) і зменшення його вмісту у ТП (у 2,96 і 1,67 разів відповідно). При введенні медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ не виявлено достовірних змін вмісту купруму і церулоплазміну як у СК, так і у ТП.

Також встановлено, що при курсовому введенні у широкому діапазоні доз медгерм не здійснював грубих незворотних патоморфологічних змін у тканинах паренхіматозних органів інтактних щурів. Під дією дози 1/40 ЛД₅₀ відмічались помірні гемодинамічні і незначні зворотні ознаки білкової дистрофії. При застосуванні 1/160 ЛД₅₀ гістологічна картина препаратів тканин серця, печінки і нирок не відрізнялася від контролю.

Одномоментна багатопараметрова детекція гомеостатичних зсувів у СК ЛКС-методом встановила, що при курсовому введенні інтактним щурам медгерму спостерігалось дозозалежне (1/40 > 1/80 ЛД₅₀) зниження відносно контролю внеску в світлорозсіювання СК часток середньомолекулярної (32,0 %) та збільшення надвисокомолекулярної (до 58,5 %) фракцій. Ці зміни ЛК-спектрів, мабуть, обумовлені макромолекулярними зсувами – утворенням циркулюючих імунокомплексів. При застосуванні медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ суттєвих змін у ЛК-спектрах порівняно з контролем не було.

Дослідження гомогенату ТП методом ЛКС-метрії раніше не проводилося. Тому в роботі вперше визначено і запропоновано референтні межі ЛК-спектру

гомогенату печінки інтактних щурів. Виявлено, що у інтактних щурів ЛК-спектри гомогенату ТП суттєво відрізняються від спектрів СК: основний внесок у світлорозсіювання склали частинки низько- та середньомолекулярної фракцій (відповідно 48,4 і 48,6 %). У тварин контрольної групи ЛК-спектри ТП не відрізнялись від інтактних. На фоні курсового в/о введення медгерму достатньо високими дозами спостерігалися значні зміни у ЛК-спектрах гомогенату ТП. При застосуванні доз 1/40 і 1/80 ЛД₅₀ виявлено достовірне зниження внеску в світлорозсіювання часток низькомолекулярної (відповідно до 21,8 і 16,3 %) і збільшення середньомолекулярної (відповідно до 62,8 і 73,2 %) фракцій. Динаміка змін ЛК-спектрів ТП щурів при введенні БАР дозою 1/160 ЛД₅₀ була позитивною: достовірно збільшився внесок в світлорозсіювання часток низькомолекулярної (до 35,3 %) і зменшення середньомолекулярної (до 50,2 %) фракцій, тобто ЛК-спектри наближались до таких, що характерні для ТП щурів контрольної групи. Таким чином, на фоні курсового в/о введення медгерму інтактним щурам відбувалися дозозалежні (1/40, 1/80 ЛД₅₀) зсуви ЛК-спектрів СК і гомогенату ТП, які корелювали з біохімічними дослідженнями. Доза 1/160 ЛД₅₀ була практично індиферентною.

Встановлення гепатопротекторної активності медгерму на фоні гострого галактозамінового гепатиту. Залежно від умов його введення і дозового режиму встановлено, що найбільш ефективним було профілактично-лікувальне (за 7 діб до і протягом 7 діб після застосування галактозаміну) застосування медгерму дозою 1/160 ЛД₅₀ (0,4 мг/кг), оскільки при цьому виживаність тварин складала 100 %.

Застосування нової БАР у цьому алгоритмі суттєво запобігало виявленням при нелікованому галактозаміновому гепатиті змінам активності ферментів цитолізу і холестази у СК і ТП. Так, уже через 1-у добу після введення тільки гепатотоксиканту у СК щурів II групи активність АлАТ і АсАТ достовірно підвищувалась відповідно на 220,0 і 160,0 %, а у ТП зменшувалась – на 78,8 і 72,5 %. Одночасно на 1-у добу розвитку гепатиту активність ГГТ у ТП збільшувалась на 396,3 %, а в СК – на 170,6 %, при тому, що активність ЛФ в ТП підвищувалась усього на 149,3 %, а в СК – на 90,2 % ($p < 0,05$). Активність ферментів цитолізу і холестази як у СК, так і ТП не відновлювалась до вихідних рівнів і на 10-14 добу розвитку гепатиту. На фоні застосування медгерму тваринами III групи ці зміни були значно меншими навіть у 1-у добу після введення токсиканту. Відновлення активності АлАТ у СК і ТП відбувалося відповідно на 5-у і 7-у добу, АлАТ і у СК, і у ТП – на 5-у добу (рис. 2). При введенні медгерму активність ГГТ СК і ТП відновлювалась також на 5-у добу розвитку гепатиту. При цьому не спостерігалось її виразного підвищення на 1-у добу, як при нелікованому гепатиті. На 1-у добу спостереження застосування нової БАР позитивно вплинуло і на виявленні при нелікованому гепатиті зміни активності ЛФ в СК і ТП. Активність даного ферменту холестази хоча і була підвищеною, проте меншою мірою, ніж у контрольних щурів I групи, і відновлювалась вже на 5-у добу експерименту. Дослідження активності ферментів цитолізу та холестази при введенні референс-препарату есенціале показало, що він мав гепатозахисну

дію, проте за строками відновлення цих показників виявляв менш виразну активність, ніж медгерм (див. рис. 2).

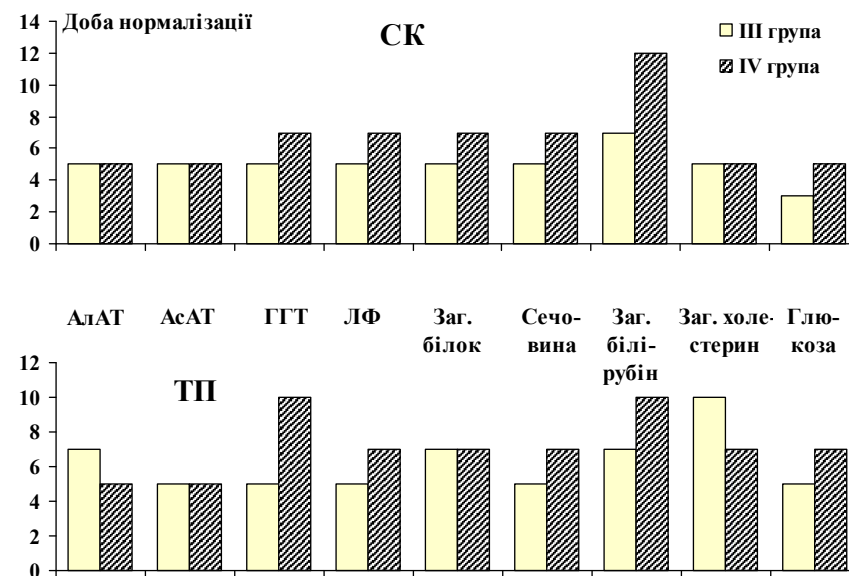


Рис. 2. Терміни відновлення досліджуваних показників у щурів при гострому галактозаміновому гепатиті залежно від сполуки, яку вводили

Гепатотоксикант спричиняв суттєві зміни інтегральних біохімічних показників (загального білка, сечовини, загального білірубину і холестерину, глюкози) у СК і ТП щурів протягом усього терміну спостереження. Профілактично-лікувальне введення медгерму достовірно підвищувало стійкість щурів III групи до галактозаміну, про що свідчили менш виразні патологічні зміни цих показників при застосуванні цієї БАР вже у 1-у добу розвитку гепатиту та більш швидкі строки їх відновлення до рівня контрольної групи, за більшістю з яких вона перевищувала IV групу, яка одержувала есенціале (див. рис. 2).

Вміст купруму і церулоплазміну на фоні токсичного гепатиту також зазнав значних змін. На 1-у добу його розвитку ці показники в СК збільшувалися відповідно в 3,5 і 2,7 разів, в ТП – 3,0 і 2,6 (рис. 3). Протягом наступних 12 днів відмічалась тільки тенденція до їх відновлення. При застосуванні медгерму відбувалось підвищення вмісту купруму в СК і ТП на 1-у добу, але меншою мірою (відповідно в 2,7 і 1,5 рази). Відновлення цього показника виявлялось вже на 7-у добу у СК і 3-ю добу у ТП. Одночасно під впливом БАР вміст церулоплазміну не змінювався ні у СК, ні ТП відносно контролю і тільки на 3-ю добу спостерігалось деяке його підвищення в обох субстратах (в 1,3 рази), що достатньо швидко минало.

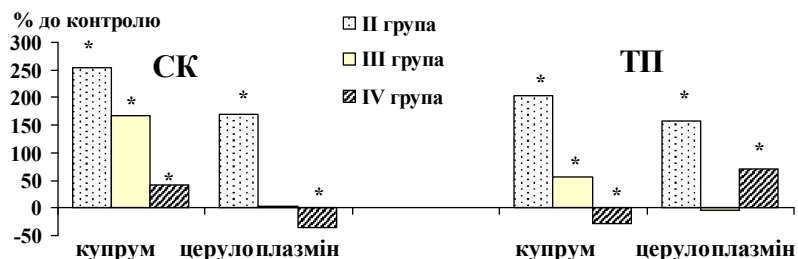


Рис. 3. Вміст купруму та церулоплазміну в СК і ТП у щурів на 1-у добу галактозамінового гепатиту залежно від сполуки, яка вводилась

На фоні есенціале на 1-у добу спостерігалась інша картина: в СК вміст купруму збільшувався на 40,1 %, а у ТП зменшувався 28,1 %. У подальшому цей показник в СК збільшувався і навіть на 12-у добу залишався підвищеним. У ТП відновлення вмісту купруму відбувалось тільки на 7-у добу. Вміст церулоплазміну, навпаки, в 1,6 рази зменшувався у СК і в 1,8 рази збільшувався у ТП з подальшою тенденцією до підсилення цих змін, а потім повільного відновлення (на 10-ту добу). Таким чином, при застосуванні медгерму виявлено менш значні зміни і кращі строки відновлення вмісту купруму і церулоплазміну в СК і ТП, ніж у тварин при нелікованому гепатиті і щурів, які одержували препарат порівняння.

Результати проведених біохімічних досліджень корелювали з даними щодо вивчення змін морфологічної картини печінки при застосуванні нової БАР на фоні галактозамінового гепатиту. Під дією профілактично-курсного введення медгерму спостерігалось достовірне і виразне зменшення характерних для гострого галактозамінового гепатиту дистрофічних і дисциркуляторних змін в ТП, що свідчило про гепатозахисну дію медгерму. За виразністю змін і строкам відновлення морфогістохімічної структури печінки медгерм перевищував есенціале.

Методом ЛКС-метрії проводилась також інтегральна оцінка гомеостатичних змін у СК і гомогенаті ТП. На 1-у добу токсичного гепатиту спостерігались суттєві і достовірні зміни ЛК-спектрів СК щурів відносно контрольної групи: значне зменшення внеску у світлорозсіювання часток низько-, середньо- та вишомолекулярних фракцій, збільшення – надвисокомолекулярної фракції (понад 4,5-4,9 рази). Зазначені зміни ЛК-спектрів пов'язано з процесами інтенсивного руйнування клітин печінки і циркуляцією в крові високомолекулярних комплексів [Бажора Ю.И., Носкин Л. А., 2002]. На 1-у добу токсичного гепатиту також відбувалися суттєві та достовірні зміни ЛК-спектрів гомогенату ТП щурів відносно контрольної групи. Виявлялось значне зменшення внеску у світлорозсіювання часток низько- та середньомолекулярних фракцій і збільшення часток високо- та надвисокомолекулярної фракцій. Такий зсув в ЛК-спектрах гомогенату ТП пов'язано з пошкодженням гепатоцитів токсикантом

[Бажора Ю.И., Носкин Л. А., 2002]. Також аналіз динаміки змін в ЛК-спектрах гомогенату ТП виявив значний внесок у світлорозсіювання часток наднизько-молекулярної фракції, що є ознакою дистрофічних змін. При нелікованому гепатиті протягом всього терміну спостереження відмічались значні патологічні зміни у ЛК-спектрах обох біосубстратів. На фоні введення медгерму виразність цих змін у ЛК-спектрах як СК, так і гомогенату ТП була найменшою, а відновлення відбувалось відповідно вже на 5-у і 7-му доби, що перевищувало референс-препарат.

Профілактично-курсне застосування медгерму вже на 1-у добу розвитку галактозамінового гепатиту достовірно запобігало збільшенню вмісту кінцевих продуктів ліпідпероксидації ТБК-реактивів як в СК, так і ТП (в 2,0 і 2,6 рази відповідно). Водночас есенціале знижувало підвищений вміст ТБК-реактивів в СК в 1,7 рази, а в ТП – в 2,2. За строками відновлення цього показника медгерм також виявився більш ефективним. Під впливом БАР на 5-ту добу вміст ТБК-реактивів і в СК, і ТП не відрізнявся від контролю, а при застосуванні есенціале – тільки на 7-у добу. У нелікованих тварин цей показник в обох субстратах був достовірно підвищеним протягом всього періоду спостереження.

Вивчення основних показників, які характеризують стан АОС показало, що при модельованому гепатиті нова БАР значно зменшувала негативний вплив гепатотоксиканту як на її ферментативну, так і ферментативну ланки. Вже на 1-у добу медгерм достовірно запобігав зменшенню вмісту одного з основних компонентів неферментативної ланки АОС – глутатіону відновленого в СК і ТП (в 1,2 і 2,3 рази відповідно). При цьому референс-препарат за ефективністю був практично на тому ж рівні. На його фоні знижений під дією галактозаміну вміст глутатіону відновленого збільшувався в СК також достовірно в 1,2 рази, в ТП – в 1,6. За строками відновлення даного показника до рівня контролю в СК медгерм виявився більш ефективним. Якщо на його фоні нормалізація вмісту глутатіону відновленого у СК відбулась на 7-у добу, то при застосуванні есенціале тільки на 10-у. У ТП цей показник в обох випадках не відрізнявся від контрольних значень на 5-у добу. При нелікованому гепатиті рівень глутатіону відновленого в ТП був достовірно відносно контролю зниженим протягом усього експерименту, а в СК його відновлення відбувалось тільки на 12-у добу експерименту.

Медгерм і препарат порівняння також запобігали пригніченню активності ключових ферментів ензимної складової АОС – каталази і СОД на фоні галактозамінового гепатиту. Взагалі медгерм і есенціале здійснювали односпрямовану дію на ці показники, проте декілька відрізнялись за виразністю дії і строкам відновлення. Вони найактивніше впливали на СОД, але за строками відновлення показників до контрольних значень були найефективнішими відносно каталази. Так, на 1-у добу гепатиту активність СОД в СК і ТП достовірно збільшувалась під впливом БАР відповідно в 2,1 і 1,6 рази, а есенціале – на 26,3 і 35,4 %. Водночас сполуки не здійснювали значного впливу на активність каталази, спостерігалась тільки тенденція до зменшення токсичних властивостей галактозаміну. Відновлення до контролю активності каталази на фоні введення медгерму й есенціале відбулося в СК

відповідно на 3-ю і 7-у доби, а в ТП – на 5-у. Активність СОД дійшла до референтних значень під впливом нової БАР і референс-препарату в СК відповідно на 5-у та 12-у доби, в ТП – на 5-у та 7-у доби. Таким чином, за ефективністю дії медгерм лише декілька перевищував препарат порівняння. Враховуючи односпрямованість і практично однакову виразність дії, можна дійти висновку про подібність механізму їх антиоксидантної дії.

Резюмуючи отримані результати, можна стверджувати, що медгерм підвищує толерантність щурів до гепатотоксинів. Нова БАР певною мірою зменшує активацію процесів ліпідпероксидації, значно зберігає і відновлює систему антиоксидантного захисту організму, гальмує процеси цитолізу і холестаза при гострому токсичному гепатиті. Все це, в кінцевому підсумку, забезпечує зменшення негативного впливу гепатотоксиканта на печінку.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено нове вирішення актуального завдання фармакології, яке полягає в експериментальному обґрунтуванні доцільності і перспективності застосування нової вітчизняної біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендифосфонатогерманату (медгерму) як потенційного гепатопротекторного засобу.

1. У гострому експерименті встановлено, що медгерм належить до малотоксичних сполук (IV клас токсичності) при пероральному введенні (LD₅₀ у мишей і щурів складала більше 2250,0 мг/кг) і помірно токсичних (III клас) при внутрішньоочеревинному і підшкірному застосуванні (відповідно у мишей LD₅₀ знаходилась у діапазонах 95,81÷131,28 і 145,66÷180,85, щурів — 45,81÷81,28 і 55,66÷90,85 мг/кг). Ця БАР при всіх шляхах введення не має високої потенційної небезпеки виникнення і розвитку отруєння та є не шкідливою для людини. За даними вивчення підгострої, субхронічної і хронічної токсичності, кумулятивних, місцевоподразнювальних і алергізуючих властивостей підтверджено низьку токсичність медгерму.

2. Аналіз загальнофармакологічних властивостей медгерму встановив, що у достатньо високих дозах дозозалежно (1/40 > 1/80 LD₅₀) мав депримууючий ефект на ЦНС, який характеризувався достовірним пригніченням загальної рухової (переважно горизонтальної) та орієнтовано-дослідницької активності, зменшенням емоційної реактивності та тривожності щурів у тесті «відкрите поле». Анксиолітичні ефекти БАР підтверджувались і тим, що на фоні антагоністичної взаємодії з амфетаміном медгерм дозою 1/80 LD₅₀ в 2,4 рази підвищував протитривожну активність тварин, а також достовірно зберігав їх орієнтовано-дослідницьку діяльність. Поряд з цим, виявлена його синергічна дія з попередником серотоніну 5-окситриптофаном. Медгерм не викликав сну, міорелаксацію і порушення координації рухів у інтактних тварин. БАР (1/40 і 1/80 LD₅₀) не впливала на швидкість настання тіопенталового сну, проте достовірно скорочувала його тривалість як за 30 хв, так і за 24 год до введення аналізатора, підсилюючи детоксикуючу функцію печінки. Медгерм також мав дозозалежну (1/40 > 1/80 LD₅₀) анальгетичну й антиексудативну (за циклооксигеназ-

ним шляхом) активність.

3. Курсове в/о введення медгерму інтактним тваринам здійснювало певний дозозалежний (1/40 > 1/80 LD₅₀) вплив на активність маркерних ферментів цитолізу і холестаза, інтегральні біохімічні показники (загальний білок, сечовина, загальний білірубін і холестерин, глюкоза), вміст купруму і церулоплазмину у сироватці крові та печінці. Найбільш виразні зміни спостерігалися у гомогенаті тканини печінки. При цьому медгерм не здійснював грубих незворотних патоморфологічних змін у тканинах паренхіматозних органів. Дозою 1/160 LD₅₀ нова сполука не викликала достовірних змін досліджуваних показників.

4. Профілактично-лікувальне в/о введення медгерму (0,4 мг/кг) суттєво підвищувало толерантність тварин до гепатотоксиканту, про що свідчили 100 % виживаність щурів, достовірне зменшення активності ферментів цитолізу та холестаза, виразності змін інтегральних біохімічних показників, вмісту купруму і церулоплазмину у сироватці крові та тканині печінки, морфогістохімічних порушень у тканині печінки вже на 1-у добу розвитку галактозамінового гепатиту. Відновлення цих показників до рівня контролю відбувалось у 2-5 разів швидше, ніж у групі нелікуваних тварин, і в 1,5-2 рази порівняно з референс-препаратом есенціале (p<0,05).

5. Одномоментна багатопараметрова інтегральна оцінка змін у сироватці крові та печінці інтактних тварин лазерною кореляційною спектроскопією корелювала з біохімічними і морфологічними дослідженнями і дозволила виявити дозозалежний вплив медгерму (1/40 > 1/80 LD₅₀). ЛКС-метрія гомогенату печінки (вперше запропонована як спосіб оцінки ступеня її ураження) і сироватки крові встановила, що медгерм суттєво запобігав (на 5-7-му добу), перевищуючи референс-препарат за виразністю дії і строкам відновлення, тим патологічним зсувам у ЛК-спектрах, що виявлялись при галактозаміновому гепатиті та характеризувались як деструктивні і дистрофічні процеси.

6. Гепатозахисний ефект медгерму на фоні гострого токсичного гепатиту реалізувався за рахунок того, що значно зберігав і відновлював ферментативну і неферментативну складові антиоксидантного захисту організму тварин, гальмував процеси цитолізу і холестаза, певною мірою пригнічував процеси ліпідпероксидації, а також запобігав збільшенню вмісту загального холестерину у сироватці крові та печінки. Результати досліджень з вивчення токсикологічних і фармакодинамічних властивостей медгерму дозволяють рекомендувати його в подальшому як потенційний ефективний і безпечний гепатопротекторний засіб.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Тимчишин О. Л. Гостра токсичність медгерму - нового похідного германієвої солі дифосфонові кислоти з міддю / О. Л. Тимчишин, В. В. Годован, І. Й. Сейфулліна // Одеський медичний журнал. — 2010. — № 2. — С. 23 – 26. *(Внесок дисертанта — проведення огляду літератури, розробка методології експерименту, проведення дослідження, статистичної обробки, аналізу та узагальнення результатів, написання статті).*

2. Тимчишин О. Л. Вплив медгерму на функціональний стан печінки інтактних щурів / О. Л. Тимчишин, В. В. Годован, Л. А. Полукарова // Інтегративна антропологія. — 2010. — № 2. — С. 23-27. *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, статистичної обробки і узагальнення результатів, написання та оформлення статті).*

3. Тимчишин О. Л. Патоморфологія паренхіматозних органів щурів на тлі курсового введення нової біологічно активної речовини медгерму / О. Л. Тимчишин, В. В. Годован, А. І. Даніленко // Вісник проблем біології і медицини. — 2010. — вип. 4. — С. 147-151. *(Внесок дисертанта — аналіз джерел літератури, проведення експерименту, статистичної обробки, аналізу та узагальнення результатів, написання та оформлення роботи).*

4. Тимчишин О. Л. Вплив медгерму на функціональний стан печінки при гострому токсичному гепатиті / О. Л. Тимчишин, В. Й. Кресюн, В. В. Годован // Інтегративна антропологія. — 2011. — № 2. — С. 66-73. *(Внесок дисертанта — аналіз джерел літератури, проведення експерименту, статистична обробка, аналіз і узагальнення результатів, написання та оформлення статті).*

5. Гепатопротекторні властивості нової комплексної сполуки германію з купрумом (медгерму) при експериментальному токсичному гепатиті / О. Л. Тимчишин, В. Й. Кресюн, В. В. Годован, А. І. Даніленко // Досягнення біології та медицини. — 2011. — № 2. — С. 64-69. *(Внесок дисертанта — проведення аналізу джерел літератури, експериментів, статистичну обробку, узагальнення результатів, написання та оформлення роботи).*

6. Тимчишин О. Л. Гепатопротективна активність нового германійорганічного біологічно активного речовини (медгерм) при експериментальному гепатиті / О. Л. Тимчишин // Казанский медицинский журнал. — 2013. — № 5. — С. 628-632.

7. Пат. 66392 Україна, МПК (2011.01.) А61Р 1/16 (2006.01), А61К 31/30 (2006.01), А61К 9/14 (2006.01), G09В 23/28 (2006.01). Медгерм — біологічно активна гепатопротекторна речовина / Тимчишин О. Л., Годован В. В., Кресюн В. Й., Сейфулліна І. Й., Марцинко О. Е. ; заявник та патентовласник Одеський національний медичний університет. - № u201113639 ; заявл. 21.11.2011 р. ; опубл. 26.11.2011 р., Бюл. № 24. — 6 с. *(Внесок дисертанта — проведення експериментів, їх аналізу результатів, написання та оформлення патенту).*

7. Пат. 70302 Україна, МПК (2012.01.) А61В 10/00. Спосіб оцінки функціонального стану печінки в експерименті / Кресюн В. Й., Годован В. В., Тимчишин О. Л., Андронов Д. Ю. ; заявник та патентовласник Одеський національний медичний університет. - № u201112597 ; заявл. 27.10.2011 ; опубл. 11.06.2012, Бюл. № 11. — 5 с. *(Внесок дисертанта — проведення експериментів, їх аналізу результатів, написання та оформлення патенту).*

8. Тимчишин О. Л. Оцінка фармакодинамічних ефектів медгерма методом ЛКС-метрії / О. Л. Тимчишин, В. Й. Кресюн, В. В. Годован // Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині : міжнарод. дистанц. наук.-практ. конф., вересень 2010 р., Одеса : тези. — Одеса : ОДМУ, 2010. — С. 62-63. *(Внесок дисертанта — проведення дослідження, аналізу результатів*

та статистичної обробки, написання та оформлення роботи).

9. Тимчишин О. Л. Влияние медгерма на интегральные показатели функции печени интактных крыс / О. Л. Тимчишин // Фармація України. Погляд у майбутнє : VII національний з'їзд фармацевтів України, 15-17 вересня 2010 р., Харків : матер. — Харків, 2010. — С. 134.

10. Тимчишин О. Л. Вплив нової біологічно активної речовини медгерм на функціональний стан печінки інтактних щурів / В. Й. Кресюн, В. В. Годован, О. Л. Тимчишин, Л. А. Полукарова // 100 років Українському лікарському товариству : XIII Конгрес світової федерації Українських лікарських товариств, 30 вересня – 03 жовтня 2010 р. : матер. — Львів-Київ-Чикаго, 2010. — С. 608. *(Внесок дисертанта — проведення дослідження, аналізу результатів, написання та оформлення тез).*

11. Тимчишин О. Л. Вплив біологічно активної речовини медгерм на показники обміну міді у інтактних щурів / О. Л. Тимчишин, В. В. Годован, Л. А. Полукарова // Спортивна медицина, лікувальна фізкультура та валеологія – 2010 : XV ювілейна міжнародна наук.-практ. конф., 11-12 жовтня 2010 р., Одеса : матер. — Одеса, 2010. — С. 167. *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, статистичної обробки, аналізу та узагальненню результатів, написання та оформлення тез).*

12. Тимчишин О. Л. Токсикологічна характеристика нової біологічно активної речовини медгерму / О. Л. Тимчишин, В. В. Годован // Клінічна та експериментальна фармакологія метаболічних коректорів, органопротекція, доказова медицина : VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячена 90-річчю від дня народження професора О. О. Столярчука, 10-11 листопада 2010 р., Вінниця : матер. — Вінниця, 2010. — С. 385-387. *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, статистичної обробки, аналізу результатів, написання та оформлення тез).*

13. Тимчишин О. Л. Нові підходи до оцінки функціонального стану печінки методом лазерної кореляційної спектроскопії / О. Л. Тимчишин // Вісник морської медицини. — 2011. — № 4 — С. 125 (Актуальні питання професійної патології : наук.-практ. конф., 1-2 грудня 2010 р., Одеса : матер.).

14. Тимчишин О. Л. Вплив медгерму на інтегральні показники функціонального стану печінки при експериментальному гепатиті у щурів / О. Л. Тимчишин // 100 років Українському лікарському товариству : XI з'їзд Всеукраїнського лікарського товариства, 28-30 вересня 2011 р., Харків : матер. — Київ, 2011. — С. 285.

15. Тимчишин О. Л. Оцінка впливу медгерму на вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у тварин з експериментальним токсичним гепатитом / О. Л. Тимчишин, В. Й. Кресюн, В. В. Годован // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : XXX Всеукраїнська наук.-практ. конф. з міжнародною уч., 23 травня 2013 р., Харків : матер. — Харків, 2013. - С. 108. *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, статистичної обробки, аналізу результатів, написання та оформлення тез).*

16. Тимчишин О. Л. Вплив медгерму на показники ферментативної ланки

антиоксидантної системи у тварин з токсичним гепатитом / О. Л. Тимчишин, В. Й. Кресюн, В. В. Годован // Українські медичні вісті. – 2013. – Т.10 (1-4). – С. 277 (XII з'їзд Всеукраїнського лікарського товариства (ВУЛТ), 5-7 вересня 2013 р., Київ : матер.) *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, статистичної обробки, аналізу результатів, написання та оформлення тез).*

17. Тимчишин О. Л. Оцінка впливу медгерму на фармакологічні ефекти тіопенталу натрію / О. Л. Тимчишин // Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології : наук.-практ. конф. з міжнар. уч., 26-27 вересня 2013 р., Харків : матер. — Харків, 2013. — С. 166.

18. Тимчишин О. Л. Вивчення протизапальних та анальгетичних властивостей нового похідного германієвої солі діфосфонові кислоти з купрумом / О.Л. Тимчишин, В. В. Годован // Клінічна фармакологія та фармакотерапія у світлі доказової медицини : VII Всеукраїн. наук.-практ. конф. з міжнародн. уч., 25-26 листопада 2013 р., Вінниця : матер. — Вінниця, 2013. — С. 237-238. *(Внесок дисертанта — проведення експерименту, аналізу і узагальнення результатів, написання та оформлення роботи).*

АНОТАЦІЯ

Тимчишин О.Л. Фармакологічна активність нової біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендіфосфонатогерманату. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Одеський національний медичний університет МОЗ України. - Одеса, 2015.

Дисертацію присвячено оцінці токсико-фармакологічного профілю нової біологічно активної речовини – купрум-оксіетилідендіфосфонатогерманату (медгерму), виявленню її специфічної активності та основних механізмів дії. Вперше у гострому і хронічному експериментах встановлено його безпечність. Вперше визначено його дозозалежний депримуєчий нейротропний вплив, анксиолітичну активність, відсутність гіпнотичної та міорелаксантичної дії, а також анальгетичний і протизапальний ефекти, підсилення детоксикуєчої функції печінки. Вперше виявлено антагоністичну взаємодію з амфетаміном, синергізм з 5-окситриптофаном, що свідчить про вплив сполуки на моноаміноергічну центральну передачу. Вперше встановлено перевищуючий в 1,5-2,0 рази референс-препарат есенціале гепатозахисний ефект профілактично-лікувального введення медгерму дозою 0,4 мг/кг при гострому галактозаміновому гепатиті, який реалізувався переважно за рахунок активації антиоксидантної системи, а також пригнічення пероксидації ліпідів, вмісту загального холестерину крові та печінці. Отримані дані висвітлюють доцільність застосування медгерму як потенційного високоефективного і безпечного гепатопротекторного засобу.

Ключові слова: купрум-оксіетилідендіфосфонатогерманат, нешкідливість, фармакологічна активність, галактозамін, гепатопротекторні ефекти.

АННОТАЦІЯ

Тимчишин О.Л. Фармакологическая активность нового биологически активного вещества – купрум-оксиэтилдендифосфонатогерманата. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Одесский национальный медицинский университет МЗ Украины. – Одесса, 2015.

Диссертация посвящена оценке токсико-фармакологического профиля нового биологически активного вещества (БАВ) - купрум-оксиэтилдендифосфонатогерманата (медгерма), выявлению его специфической активности и основных механизмов действия. Впервые установлено, что медгерм относится к малотоксичным веществам (IV класс токсичности) при пероральном введении и умеренно токсичным веществам (III класс) при внутрибрюшинном и подкожном применении. Новое БАВ при всех путях введения не обладало потенциальной возможностью развития отравления и не являлось небезопасным для человека. По данным изучения подострой, субхронической и хронической токсичности, а также кумулятивных, местнораздражающих и антигенных свойств подтверждена безопасность медгерма. Анализ общих фармакологических свойств медгерма установил, что в достаточных дозах БАВ дозозависимо ($1/40 > 1/80$ ЛД₅₀) вызывало нейротропный депримирующий эффект, который характеризовался достоверным угнетением общей двигательной (преимущественно горизонтальной) и ориентированно-исследовательской активности, уменьшением эмоциональной реактивности и тревожности у крыс в тесте «открытое поле». Анксиолитические эффекты БАВ подтверждались и тем, что на фоне антагонизма с амфетаминем медгерм дозой $1/80$ ЛД₅₀ в 2,4 раз повышал противотревожную активность животных, а также достоверно сохранял их ориентированно-исследовательскую деятельность. Наряду с этим, выявлена его синергизм с предшественником серотонина 5-окситриптофаном. Медгерм не обладал гипнотическим и миорелаксантичным действием. БАВ ($1/40$ и $1/80$ ЛД₅₀) сокращало длительность тиопенталового сна, усиливая детоксикационную функцию печени. Медгерм также обладал дозозависимой анальгетической и антиэкссудативной активностью.

Впервые установлено, что курсовое внутрибрюшинное введение медгерма в диапазоне доз интактным животным не вызывало существенных изменений активности маркерных ферментов печени, содержания интегральных биохимических показателей функционального состояния организма, меди и церулоплазмينا в сыворотке крови и печени, а также не приводило к грубым необратимым морфологическим нарушениям паренхиматозных органов. Все вышеуказанные эффекты и изменения в организме интактных животных под влиянием БАВ имели дозозависимый характер и, в основном, оказывались в достаточно высоких дозах. Дозой $1/160$ ЛД₅₀ ($0,4$ мг/кг) медгерм не вызывал достоверных изменений исследуемых показателей.

Профилактично-лечебное введение медгерма ($0,4$ мг/кг) существенно по-

вышало толерантность животных к галактозамину, о чем свидетельствовали 100 % выживаемость крыс, достоверное уменьшение активности ферментов цитолиза и холестаза, выраженности изменений интегральных биохимических показателей, содержания купрума и церулоплазмينا в сыворотке крови и ткани печени, морфогистохимических нарушений в ткани печени уже на 1-е сутки развития галактозаминового гепатита. Восстановление этих показателей до уровня контроля происходило в 2-5 раз быстрее, чем в группе леченых крыс и в 1,5-2 раза по сравнению с референс-препаратом эссенциале ($p < 0,05$). Одномоментная многопараметровая интегральная оценка изменений в сыворотке крови и печени интактных животных лазерной корреляционной спектроскопией (ЛКС) коррелировала с биохимическими и морфологическими исследованиями. ЛКС-метрия гомогената печени (впервые предложена как способ оценки степени ее поражения) и сыворотки крови установила, что медгерм существенно предупреждал, превышая референс-препарат по выраженности действия срокам восстановления показателей, те патологические гомеостатические сдвиги, которые выявлялись при галактозаминоном гепатите и характеризовались как аутоиммунные и дистрофические процессы.

Гепатозащитный эффект медгерма на фоне острого токсичного гепатита реализовался преимущественно за счет активации ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы, а также угнетения пероксидации липидов, содержания общего холестерина крови и печени. Результаты исследований позволяют рекомендовать медгерм в дальнейшем как потенциальное эффективное и безопасное гепатопротекторное лекарственное средство.

Ключевые слова: купрум-оксиэтилендифосфонатогерманат, безвредность, фармакологическая активность, галактозамин, гепатопротекторные эффекты.

SUMMARY

Tymchishin O. L. Pharmacological activity of new biologically active compound – cuprum-oxyethylidenebiphosphonogermanate. – As a manuscript.

Thesis for a scientific degree of Candidate of medical sciences in speciality 14.03.05 – pharmacology. - Odessa National Medical University Ministry of Health Care of Ukraine. – Odesa, 2015.

The thesis are devoted to a new biologically active compound - cuprum-oxyethylidenebiphosphonogermanate (medgerm) - toxic-pharmacological profile estimation, its specific activity determination as well as the main mechanisms of action. For the first time it was established medgerm's safety. For the first time it was found medgerm's dose-dependent depriving influence on CNS, anxiolytic activity, absence of both hypnotic and myorelaxant effects as well as presence of analgesic and anti-inflammatory effects, and increasing of hepatic detoxicative function. Its antagonism with amphetamine and synergic activity with 5-oxytryptophan were revealed firstly that certify the compound influence on monoaminergic central neurotransmission. Its hepatoprotective effect was revealed firstly in case of prophylactic and curing strategy of administration (i.p., 0.4 mg/kg)

– 1.5-2.0 times more expressed compared with reference-compound essential in conditions of acute galactoseamine-induced hepatitis. The mentioned effect realized due to activation of antioxidant system as well as inhibition of lipids peroxidation, decreasing of serum and hepatic cholesterol level. The obtained data prove reasonability of medgerm application as potential highly effective and safe medical hepatoprotective agent.

Key words: cuprum-oxyethylidenebiphosphonogermanate, harmless, pharmacological activity, galactoseamine, hepatoprotective effects.

Підписано до друку 25.03.15. Формат 60×90/16.
Папір письмовий. Друк різнографічний. Обл.-вид. арк. 0,9.
Тираж 100. Зам. 1105.

Одеський національний медичний університет
65082, Одеса, Валіховський пров., 2.
Свідоцтво ДК № 668 від 13.11.2001.