

## ВПЛИВ ФАРМАКОПЕЙНИХ ПРЕПАРАТІВ — ПОХІДНИХ ФЕНОТІАЗІНУ НА NADPH- ТА NADH-ЗАЛЕЖНЕ ПОЛ В НОРМІ ТА ПРИ ДІЇ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ФАКТОРІВ

С. А. Олійник, Д. М. Зоценко

Український Державний медичний університет

Ряд сполук — похідних фенотіазіну є фармакопейними препаратами і знаходять широке застосування в практичній медицині. Зокрема, серед похідних фенотіазіну є нейролептики (аміназін, трифтазін, мажептіл, неулептіл), коронаролітики (нонахлазін), антиаритмічні (етмозін, етацизін), протиблювотні (тіетілперазін), антигістамінні (піпольфен) та антисептичні (метиленовий синій) (Машковский М. Д.) препарати. Механізм їх дії в принципі різний, оскільки різні патогенези захворювань, при яких вони застосовуються. Проте відомо, що в патогенезі більшості з цих захворювань значну роль відіграє перекисне окислення ліпідів (ПОЛ). Так, зокрема, доведена активація ПОЛ при психічних захворюваннях (Александровський Ю. А.), променевому ураженні (Барабой В. А.), серцевих аритміях (Меерсон Ф. З.), ішемії міокарду (Биленко М. В.) та інших патологічних станах. Значну роль відіграють процеси ПОЛ також в розвитку загального адаптаційного синдрому (стресу) (Меерсон Ф. З.; Кузнецов І. Г.).

В той же час відомо, що деякі препарати — похідні фенотіазінового ряду, а також їх метаболіти мають антиоксидантні властивості. Так, зокрема, доведено, що метаболіти аміназину — його оксипохідні, передусім 7-оксиаміназін — мають такі властивості та гальмують NADPH-залежне ПОЛ в мікросомах мозку (Елуашвили І. А., 1978), а сам аміназін в мікромолярних концентраціях запобігає ішемічним пошкодженням ізольованого серця та значно зменшує в ньому накопичення малонового діальдегіда (МКА) (Афанасьев С. А.). В роботі Елуашвили І. А. (1977) показано гальмуючий вплив аміназину на ферментативне NADPH-залежне ПОЛ в мікросомах печінки щурів. Авторами цієї роботи доведено, що цей ефект обумовлений: 1) антиоксидантною дією оксипохідних аміназину, які утворюються в ході його метаболізму NADPH-залежними мікросомальними оксигеназами і 2) конкуренцією за відновлені компоненти електронатранспортних ланцюгів між двома NADPH-залежними процесами — метаболізмом аміназину і ПОЛ.

В роботі Блажевич Н. В. показано, що антиоксидантні властивості має також піпольфен. Є відомості (Уайт А.) про те, що метиленовий синій має деякі властивості вітаміна Є і навіть здатен до певної міри його замінювати. Відомо також здатність метиленового синього активувати пентозофосфатний шунт, що сприяє відновленню NADPH.

В той же час антиоксидантні властивості інших фармакопейних препаратів — похідних

фенотіазінового ряду, так само як і вплив будь-яких препаратів на NADH-залежне ПОЛ до цього часу не вивчені. Відомості про те, що NADH може збільшувати продукцію МДА при додаванні його в систему NADPH-залежного ПОЛ з'явилися ще в кінці 70-х років (дивись, зокрема, роботу Белевич Н. А. і співавторів), однак дослідження ПОЛ в системі, до якої входять лише NADH,  $F^{2+}$ , пірофосфат і біологічний матеріал, вперше досліджена нами (Зоценко Д. М.). Разом з тим, антиоксидантні властивості можуть мати певне значення при застосуванні цих препаратів для попередження стресового та ішемічного пошкодження органів і тканин, для корекції рівня ПОЛ при радіаційному ураженні, тощо. Тому метою нашого дослідження було вивчення і порівняння антиоксидантних властивостей препаратів — похідних фенотіазіну, що різняться між собою як за хімічною будовою, так і за клінічним застосуванням, вивчення їх впливу на різні види ферментативного ПОЛ, визначення ефективності застосування деяких з них для корекції ПОЛ при стресі.

В роботі використовували NADPH і NADH фірми Reanal (Угорщина), пропіонільні похідні фенотіазіну: мажептіл і трифтазін, піперидинове похідне фенотіазіну неулептіл, N,N,N',N'-тетраметілтіоніна хлорид — метиленовий синій, інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «х. ч.». Накопичення МДА в гомогенаті печінки лабораторних мишей визначали за (Владимиров Ю. А.). NADH-залежне ПОЛ визначали аналогічно NADPH-залежному, вносячи еквімолярну кількість NADH замість NADPH у відповідні проби. Білок визначали за Лоурі (Р. Досон). При вивченні кінетичних параметрів змінювали концентрацію NADPH і аскорбінової кислоти (в 0,01; 0,1; 0,5; 2; 5; 10; 100 разів). Антиоксидантну активність хлороформних екстрактів по Д. Гледвіну визначали за методикою, наведеною в монографії Барабоє В. А. Вміст дієнів, кетодієнів та триєнів визначали за І. А. Волчегорським.

Стрес моделювали жорсткою фіксацією щурів в горизонтальному стані на протязі 2 годин. Контроль досягнення реакції «стрес» проводили за методом Гаркаві Л. Адаптаційний вплив до дії іммобілізаційного стресу досягали 5 сеансами примусового плавання щурів групи «Адаптація» в теплій (37°С) воді по півтори години кожного дня. Щури групи «Стрес» були піддані іммобілізації *per se*. Для вивчення дії трифтазину *in vivo* його вводили внутрим'язово в дозі 0,30 мг/кг щурів в групі «Трифтазін» безпосередньо перед іммобілізацією. Галаскорбін вводили інтрагастрально *per os* також безпосередньо перед іммобілізацією в дозі 100 мг щурам групи «Галаскорбін». Кожна група налічувала по 6 щурів. Результати дослідів оцінювали за допомогою непараметричних методів статистичного аналізу, регресійного аналізу (Ю. И. Иванов), обчислювали на ЕОМ.

При дослідженні впливу препаратів *in vitro* на аскорбат- і NADPH-залежне накопи-

чення МДА в мітохондріях печінки мишей, виявлено тісні кореляційні зв'язки між концентрацією кожного препарату і інгібуванням ПОЛ. Результати дослідів представлено на таблицях 1 і 2. Співвідношення АЗП/НЗП зростало із збільшенням концентрації препарату, що може, зокрема, свідчити про переважну активність препаратів щодо неферментативного ПОЛ.

Таким чином, всі досліджені препарати в діапазоні концентрацій  $10^{-3}$ — $10^{-7}$  М були ефективними антиоксидантами і гальмували ферментативне і неферментативне ПОЛ, причому ефективність гальмуючого впливу на АЗП залежала від концентрації препаратів значно більшою мірою, ніж у випадку ферментативного ПОЛ. Оцінюючи цю закономірність, можна висловити припущення, що у випадку аскорбатзалежного ПОЛ фенотіазінові похідні виконують виключно функцію переносу електронів (зменшуючи ефективну концентрацію центрів радикалоутворення і «розряджаючи» вільні радикали). Що стосується NADPH-залежного ПОЛ, то менша (в порівнянні з неферментативним ПОЛ) залежність антиоксидантного ефекту від концентрації препарату може свідчити про наявність ще й інших механізмів антиоксидантного ефекту.

Для визначення типу інгібування було проведено визначення максимальної швидкості реакції ( $V_{max}$ ) і константи Міхаеліса ( $K_m$ ) для ферментативного і неферментативного ПОЛ без інгібіторів і в присутності 10 мМ аміназіну або трифтазіну. Значення  $V_{max}$  у відсутності інгібіторів, в присутності аміназіну і трифтазіну дорівнювали відповідно для аскорбатзалежного ПОЛ: 86,0; 61,7; 57,5 нМоль МДА/мг білку за хвилину; для NADPH-залежного ПОЛ 115,0; 119,1; 87,7 нМоль МДА/мг білку за хвилину.

Значення константи Міхаеліса для NADPH-залежного ПОЛ у відсутності і в присутності аміназіну і трифтазіну складало в середньому 13,7; 142,9; 434,8 нМоль. Зважаючи на те, що аміназін і трифтазін не змінюють суттєво сумарної реакції утворення МДА в реакціях ферментативного ПОЛ, значно змінюючи при цьому (на порядок і більше)  $K_m$ , вони є конкурентними інгібіторами перекисоутворення. В той же час  $V_{max}$  для аскорбатзалежного ПОЛ змінюється в присутності фенотіазінових антиоксидантів, що свідчить, зокрема, про частково неконкурентний механізм їх антиоксидантної дії. Менша залежність антиоксидантного ефекту переважної більшості препаратів від їх концентрації саме у випадку ферментативного ПОЛ, зважаючи на конкурентний характер інгібування, за високою вірогідністю підтверджує наявність конкуренції між двома ферментними системами: NADPH-залежного ПОЛ і NADPH-залежного гідроксилування препаратів.

Для перевірки наявності антиоксидантної дії і можливого застосування похідних фенотіазіну при деяких патологічних станах, зокрема при стресі, вивчена дія при застосуванні *in vivo* одного з досліджуваних препаратів,

трифтазіна. Накопичення МДА в системах NADH-, NADPH- і аскорбатзалежного ПОЛ представлено в табл. 3.

Звертає на себе увагу розбіжність між вираженою антиоксидантною дією препаратів на ферментативне ПОЛ (як NADPH-, так і NADH-залежне) і відсутністю ефекту (або його різноспрямованим характером) щодо неферментативного аскорбатзалежного ПОЛ. Якоюсь мірою це підтверджує наявність конкуренції за субстрат (NADPH, NADH) між системами ПОЛ і окислення ксенобіотика — трифтазіна. Відомий факт індукції мікросомального окислення ксенобіотиків при стресі може пояснити відносно збільшення ефективності антиоксидантної дії трифтазіна на фоні стресу.

Відома властивість нейролептиків гальмувати розвиток загального адаптаційного синдрому також повною мірою підтверджується в наших дослідях: в групах «Трифтазін» та «Галаскорбін» (адаптогенну дію останнього виявлено раніше — Бышовец Р. В.) переважалою реакцією була реакція активації, тоді як в групі «Стрес» було однозначно досягнуто реакції стрес у всіх тварин, це свідчить про те, що трифтазін, разом з іншими нейролептиками, має центральну антистресорну дію. Зважаючи на те, що дія трифтазіну на більшість вивчаємих процесів близька до дії адаптації, ці властивості повною мірою можна вважати адаптогенами.

Таким чином, антиоксидантна дія трифтазіну є органонеспецифічною, з переважною активністю щодо обох видів ферментативного ПОЛ і проявляється невдовзі після внутрим'язового введення. Препарат блокує накопичення продуктів ПОЛ (дієнів, кетодієнів) в ізопропанольних екстрактах мозку та серця (табл. 4), зменшує продукцію МДА в системах ферментативного ПОЛ в мітохондріях печінки, мікросомальних фракціях печінки та головного мозку, збільшує пул—ліпофільних антиоксидантів в еритроцитах та наднирниках (див. табл. 5). За таких обставин, найбільш обґрунтованим може бути застосування препаратів фенотіазінового ряду в ситуаціях, коли крім їх специфічної фармакологічної дії вимагається наявність антиоксидантної дії, особливо — в умовах індукції мікросомального окислення (останнє майже однозначно вимагає додаткових кількостей антиоксидантів). Щодо контролю неферментативного ПОЛ, цілком логічно здається комбінація з іншими антиоксидантними препаратами, зокрема — з катехінами, галаскорбіном, оскільки останній в наших дослідях суттєво зменшував саме неферментативне ПОЛ при стресі (див. табл. 2).

Зважаючи на те, що при стресі значно зростає інтенсивність процесів ПОЛ, зокрема, в різних структурах головного мозку (Кузнецов И. Г.) і враховуючи відому властивість нейролептиків гальмувати розвиток психоемоційного стресу, а також високу концентрацію нейролептиків фенотіазінового ряду в тканині головного мозку при їх застосуванні в тера-

пептичних дозах, доведено нами в експерименті *in vivo* їх антиоксидантну дію, можна обґрунтовано пропонувати першочергове застосування саме похідних фенотіазіну серед інших нейролептиків для корекції рівня розвитку психоемоційного стресу. Для деяких нейролептиків фенотіазінового ряду характерна також протиблювотна дія (Машковський М. Д.), що в сполученні з антистресовим та антиоксидантним ефектами обумовлює доцільність їх застосування при променевому ураженні.

Результати дослідів свідчать про високу ефективність застосовуваних в фармакології похідних фенотіазіна як конкурентних інгібіторів перекисного окислення ліпідів, що може пояснювати деякі їх фармакологічні властивості.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Александровский Ю. А., Поюровский М. В., Незнамов Г. Г. и др. Перекисное окисление липидов при эмоциональном напряжении и невротических расстройствах//Журнал невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.— 1988.— 88, вып. 11 — С. 95—101.
2. Афанасьев С. А., Лаптев Б. И., Прокофьева В. Д. Исследование защитного действия аминазина при ишемии и реперфузии изолированного сердца//Биологические науки.— 1986.— № 3.— С. 25—29.
3. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация.— Киев: Наукова думка, 1991.— 256 С.
4. Белевич Н. П., Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И. НАДФ-Н- и НАД-Н-зависимая система гидроксилирования бенз(а)пирена. II. Связь с перекисным окислением липидов//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.— 1981.— № 2.— С. 158—160.
5. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения).— М.: Медицина, 1989.— 368 С.
6. Блажевич Н. В. Изучение роли окислительных процессов в механизме гемолитического действия витамина D<sub>2</sub>//Биоантиокислители. Труды МОИП.— Т. 52.— М.: Наука, 1975.— С. 61—64.
7. Бышовец Р. В., Зоценко Д. М. Новые свойства галаскорбина//Studentu mokslines draugijos 3LII konferencejos pranesimu. Vilnius, 1990. сс. 18—19.
8. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.— 320 С.
9. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови//Вопр. мед. химии.— 1989.— Т. 35, вып. 1.— С. 127—131.
10. Гаркави Л., Квакина Е., Уколова М. Адаптационные реакции организма. Ростов-на-Дону, 1977.— 234 С.
11. Елушвили И. А., Пашинова Т. П. Богданова Е. Д. и др. Влияние аминазина на ферментативное

окисление липидов//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.— 1977.— 84, № 9.— С. 323—326.

12. Елушвили И. А., Прилипко Л. Л., Каган В. Е. Ферментативное перекисное окисление липидов и окислительный метаболизм аминазина в микросомальной фракции мозга//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1978.— 86, № 10.— С. 432—434.

13. Зоценко Д. М., Олійник С. А., Хмелевський Ю. В. NADH як субстрат перекисного окислення ліпідів//Український біохімічний журнал.— 1992.— № 4. (прийнято до друку).

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

15. Кузнецов И. Г. Динамика перекисаации липидов в створовых структурах мозга при стрессе//Сибирский биологический журнал.— 1992.— № 4.— С. 44—48.

16. Машковский М. Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей.— Кишинев: Карта Молдовеняска, 1990.— Т. 1—543 С, Т. 2—528 С.

17. Меерсон Ф. З., Пшеникова М. Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам.— М.: Медицина, 1988.— 253 С.

18. Справочник биохимика: Пер. с англ./Досон Р., Элит Д., Элиот У., Джонс К.— М.: Мир, 1991.— 554 С.

19. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии.— М.: Мир, 1981.— Т. 3.— 726 С.

Таблица 1

Залежність NADPH—залежного ПОЛ від концентрації фенотіазінових препаратів (накопичення МДА мкмоль на мг білку за 15 хв.)

Препарат	Логарифм молярної концентрації					
	—8,0	—7,0	—6,0	—5,0	—4,0	—3,0
Аміназин	891	1066	1178	1306	—	—
Етацизин	1960	1780	1595	1412	—	—
Нонахалазин	856	389	879	287	—	95
Мажептіл	2458	1729	1392	993	—	—
Метил. синій	238	209	232	332	25	6
Трифтазин	2988	1809	—	1040	—	—
Піпольфен	1254	1242	1107	1238	—	—

Таблица 2

Залежність аскорбат-залежного ПОЛ від концентрації фенотіазінових препаратів (накопичення мкмоль МДА на мг білку за 15 хв.)

Препарат	Логарифм молярної концентрації					
	—8,0	—7,0	—6,0	—5,0	—4,0	—3,0
Аміназин	4586	406	4	53	—	—
Етацизин	—	1883	253	23	—	—
Нонахалазин	1355	1436	1234	47	—	—
Мажептіл	3598	922	232	208	238	315
Метил. синій	212	50	57	43	—	—
Неулептіл	980	806	903	718	254	139
Піпольфен	1952	1033	872	725	—	—

Таблица 3

Продукція МДА в різних фракціях печінки та головного мозку щурів різних груп (мкмоль МДА/мг білку за 15 хв.)

Субклітинні фракції	Аскорбат-залежне ПОЛ			NADH-залежне ПОЛ			NADPH-залежне ПОЛ		
	Контроль	Стрес	Трифтазін	Контроль	Стрес	Трифтазін	Контроль	Стрес	Трифтазін
Мітохондрії печінки	3,35	2,88	1,75	5,67	3,77	2,79	11,21	5,87	5,68
Мікросоми печінки	10,46	9,78	8,19	13,67	10,38	9,24	22,08	17,88	11,43
Мікросоми мозку	18,3	26,5	27,9	15,5	19,4	12,0	36,7	17,8	13,5

Таблиця 4

Вміст вторинних продуктів ПОЛ дієнів та кетодієнів в ізопропанольних екстрактах мозку та серця щурів різних груп

Екстракти:	Контроль	Стрес	Адаптація	Трифлазін	Галаскор-бін
Мозок, A232/m	182	184	172	164	112
Мозок, A278/m	50	54	53	46	39
Серце, A232/A220	64	118	109	113	66
Серце, A278/A220	20	42	39	42	24

Таблиця 5

Антиоксиданта активність хлороформних екстрактів еритроцитів та наднирників, ( $-A_{517} \times 1000$ )/м, од. погл./г.

Тканини	Контроль	Стрес	Адаптація	Трифлазін	Галаскор-бін
Еритроцити	119	35	182	49	92
Наднирники	153	179	92	196	110

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ НА УНІВЕРСАЛЬНІ СИГНАЛЬНІ СИСТЕМИ КЛІТИНИ

Петренко В.І., Срібний С. М. ✓

Український Державний медичний університет

Нині можна вважати доведеним, що у клітині існує дві основні системи трансмембранної сигналізації: аденілатциклазна і Са-поліфосфоїнозитна (Taylog S. at al., 1986). У аденілатциклазній системі (СІ) сигнали з рецепторів передаються на G-білки (активуєчі — на  $G_s$ , гальмівні — на  $G_i$ ), а потім — на аденілатциклазу. Завдяки збалансованій дії аденілатциклази (АдЦ) і фосфодіестерази циклічного аденозин-монвофосфату (цАМФ) у клітині підтримується певний його рівень, який визначає активність протеїнкінази А, що виконує роль регуляторного механізму.

Са-поліфосфоїнозитна система (СІІ) має складнішу структуру. Активуєчі сигнали з рецепторів надходять на білки, що зв'язують гуанозинтрофосфат ( $G_p$ ,  $G_o$ ), а потім на фосфоліпазу С котра розщеплює фосфатидилінозитдифосфат на диацилглицерин (ДАГ) і інозинтрифосфат ( $IP_3$ ). При цьому ДАГ безпосередньо активує протеїнкіназу С, а  $IP_3$  — опосередковано (через мобілізацію Са із клітинних депо) — кальмодулінзалежні протеїнкінази, крім того, кооперативно з ДАГ, впливаючи на активність протеїнкінази С.

Важливим компонентом СІІ є каскад арагіднової кислоти, що утворюється з ДАГ під впливом ДАГ-ліпази, а також з фосфоліпідів за допомогою фосфоліпази  $A_2$ . Є також експериментальні факти, що свідчать про зв'язок тирозинкіназної системи з компонентами СІІ (Tauber J. P. at al., 1988), модуляцію ключових елементів СІ і СІІ стероїдними гормонами (Сергеев П. В. та ін., 1988), зв'язок нікотинових холінергічних рецепторів з СІІ (6), участь СІ—СІІ у регуляції процесів проліферації і диференціювання клітин (Lockwood A. H. at al., 1983).

Таким чином, ні в якому разі не ігноруючи наявності інших трансдукторних систем, можна стверджувати, що системи, котрі можна віднести до СІ і СІІ прямо, або опосередковано контролюють більшість клітинних процесів і функцій. При цьому вплив фармакологічно активних речовин на ці сигнальні системи слід оцінювати як їх активацію, або гальмування, що надалі позначатиметься як +I, -I, +II і -II відповідно. Оскільки СІ і СІІ зв'язані між собою внутрішніми і зовнішніми (відносно клітини) функціональними зв'язками, що забезпечують у більшості випадків їх реципрокно взаємодію, то активація СІ (+I) супроводжується пригніченням СІІ (-II), а дія -I типу еквівалентна +II (Луйк А. И. та ін. 1990).

Проведені дослідження були спрямовані на поглиблення існуючих уявлень і отримання принципово нових даних про механізм дії протитуберкульозних препаратів. Вивчення молекулярних механізмів дії на рівні сигнальних систем клітини іонізаиду, ріфампіцину та стрептоміцину, завдяки їх широкому застосуванню у фтизіатричній практиці і необхідності тривалих строків влікування хворих на туберкульоз набуває у цьому плані не тільки теоретичного, але й практичного значення.

Робота виконувалася переважно на клітинних моделях, що інтегрально відбувають функції біорегуляторних систем. Агрегація тромбоцитів, окремі види активності імуннокомпетентних клітин, рухливість поліморфноядерних лейкоцитів якраз і є такими показниками, що однозначно характеризують баланс активності СІ і СІІ. При зміщенні вказаного балансу в бік переважання активності СІІ спостерігається підсилення перелічених реакцій і навпаки. Що стосується використання в експерименті концентрацій протитуберкульозних препаратів, то вони цілком адекватні з точки зору можливості реалізації їх ефектів у цілісному організмі (Пилипчук Н. С. та ін., 1988).

Агрегацію тромбоцитів вивчали на клітинах, виділених з крові кролів (Gazepav J. P. at al., 1983). Отримували плазму, збагачену тромбоцитами, з концентрацією клітин у межах  $(1.2-1.5) \cdot 10^5$  кл/см<sup>3</sup>, що відповідала оптичній щільності 0.45—0.60 при довжині хвилі 590 нм. За таких умов оптична щільність суспензії лінійно знижується по мірі зменшення концентрації клітин. Результати відображували у вигляді швидкості зміни оптичної