



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95720** (13) **U**
(51) МПК
G01N 21/76 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 03766**
(22) Дата подання заявки: **10.04.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **12.01.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.01.2015, Бюл.№ 1**

(72) Винахідник(и):
Лук'янчук Віктор Дмитрович (UA),
Кравець Дмитро Станіславович (UA),
Крилова Олена Володимирівна (UA),
Лук'янчук Ольга Вікторівна (UA),
Романенко Дарина В'ячеславівна (UA),
Поліщук Євген Миколайович (UA),
Грекова Олександра Валеріївна (UA),
Сенченко Олексій Михайлович (UA)
(73) Власник(и):
Лук'янчук Віктор Дмитрович,
вул. Ватутіна, 75/9, м. Луганськ, 91034 (UA),
Кравець Дмитро Станіславович,
вул. Польова, 11, смт Біле-1, Лутугінський р-н, Луганська обл., 92015 (UA),
Крилова Олена Володимирівна,
вул. Луначарського, 60-а, кв. 27, м. Луганськ, 91000 (UA),
Лук'янчук Ольга Вікторівна,
вул. Воскресенська, 12-а, кв. 135, м. Київ, 02125 (UA),
Романенко Дарина В'ячеславівна,
вул. Залізнична, 88, с. Роскішне, Лутугінський р-н, Луганська обл., 92013 (UA),
Поліщук Євген Миколайович,
вул. Фрунзе, 134, с. Вербки, Павлоградський р-н, Дніпропетровська обл., 51453 (UA),
Грекова Олександра Валеріївна,
кв. Волкова, 12, кв. 127, м. Луганськ, 91000 (UA),
Сенченко Олексій Михайлович,
кв. Героїв Сталінграда, 7, кв. 85, м. Луганськ, 91000 (UA)

(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ТКАНИН ОРГАНІЗМУ

(57) Реферат:

Спосіб комплексної оцінки біохемілюмінесценції тканин організму, в основі якого лежить знаходження ряду значень розрахункових показників біохемілюмінесценції, базується на тому, що на підставі проведеного БХЛ-аналізу тканин організму і визначення амплітуди швидкого спалаху, амплітуди повільного спалаху, часу індукції повільного спалаху, а також загальної світлосуми реакції визначають запропоновані нами показники, а саме: потужність антиоксидантної системи, радикальний пул, абсолютну радикальну активність, абсолютну антиоксидантну активність, показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, а також напругу антиоксидантної системи, що дозволить всебічно характеризувати стан антирадикальної і антиоксидантної систем захисту організму в цілому.

UA 95720 U

Хімічні реакції супроводжуються, як правило, виділенням енергії у формі тепла. Існують, однак, і такі реакції, які супроводжуються випромінюванням світла. Це світіння називається хемілюмінесценцією, яка спостерігається в тому випадку, якщо в реакції відбувається виділення великої кількості енергії, наприклад в реакції взаємодії двох радикалів або в реакціях за участю

перекисів. Власне ("надслабке") світіння клітин і тканин тварин і людини обумовлено реакціями вільних радикалів фосфоліпідів і кисню, а також окису азоту - сполуками, що грають ключову роль в житті організму, а при певних умовах і в розвитку низки патологічних станів [1, 2].

Проте, нестабільність вільних радикалів, їх швидкий розпад і включення в метаболізм продуктів вільно-радикального окислення (ВРО) ускладнюють їх виявлення в біологічному матеріалі [1-3].

Наразі найбільш інформативним методом дослідження кінетики вільно-радикальних реакцій є реєстрація біохемілюмінесценції (БХЛ), що виникає при взаємодії радикалів. До переваг цього способу слід віднести високу чутливість, можливість виявлення навіть найменш реакційноздатних радикалів, які іншими методами не реєструються. Біохемілюмінесценція - це ексклюзивний метод безпосереднього дослідження характеру плину ВРО, що повністю відповідає сучасним вимогам до експрес-методів фізико-хімічного аналізу перебігу процесів надслабкого світіння у біосередовищах. Процеси вимірювання БХЛ ведуться в заданому автоматичному режимі, що дозволяє підвищити точність і достовірність одержуваної інформації, не ставлячи високих вимог до кваліфікації дослідника [1].

Реєстрація індукованої біохемілюмінесценції біологічних об'єктів застосовується для діагностики низки захворювань та патологічних станів, зокрема порушень ліпідного обміну, запальних, киснедефіцитних, інфекційних та онкологічних захворювань. У клінічних умовах показник БХЛ також може бути застосований для визначення гостроти перебігу патологічного процесу, ступеня його тяжкості тощо [4]. Крім того, з нашої точки зору, метод БХЛ можна вважати одним з найбільш оптимальних і коректних в плані інформативності щодо визначення особливостей фармакодинаміки, в тому числі тонких механізмах дії фармакологічних агентів, а також порівняльної оцінки фармакотерапевтичної ефективності лікарських засобів за умов їх застосування при різних патологічних, в т.ч. екстремальних станах.

Існуючі на теперішній час методи оцінки параметрів БХЛ полягають лише у визначенні амплітуди швидкого спалаху (I_1), амплітуди повільного спалаху (I_2), часу індукції повільного спалаху (τ), а також загальної світлосуми реакції (S) [1]. Однак, вельми вагомими недоліками саме такого методичного підходу оцінки БХЛ є:

1) неможливість оцінки взаємного впливу антиоксидантної та антирадикальної систем в конкретних умовах, що вивчаються;

2) неможливість реалізації диференційного підходу в плані оцінки вкладу чинника, що вивчається на ініціацію розгалуження вільнорадикальних процесів відносно фоновому рівню вільнорадикального окислення в організмі;

3) неможливість встановлення фактичної різниці між антирадикальною та антиоксидантною активностями лікарського засобу або іншого чинника, що вивчається;

4) існуючий спосіб оцінки впливу чинника, що вивчається на стан антиоксидантної системи за даними БХЛ-аналізу не дозволяє визначити окремо ємність та активність антиоксидантного захисту організму;

5) існуючий спосіб БХЛ-оцінки тканин організму не дозволяє всебічно оцінити реальний стан проксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі.

Для усунення вищевказаних недоліків нами запропоновано низку оригінальних показників, які дозволяють максимально всебічно дослідити в динаміці перебіг вільнорадикальних реакцій та стан (ємність та активність) антиоксидантної системи організму в цілому та їх взаємозв'язок, що власне і склало задачу даної корисної моделі.

Для досягнення поставленої мети нами вперше запропоновано спосіб визначення низки оригінальних параметрів БХЛ, а саме:

1. Потужність антиоксидантної системи:

$$P = \frac{I_1}{I_2}, \text{ де}$$

I_1 - амплітуда швидкого спалаху,

I_2 - амплітуда повільного спалаху;

2. Радикальний пул:

$$RP = \frac{S}{I_1 + I_2}, \text{ де}$$

S - загальна світлосума реакції,
 I_1 - амплітуда швидкого спалаху,
 I_2 - амплітуда повільного спалаху;
 3. Абсолютна радикальна активність:

$$AR = \frac{I_1}{S}, \text{ де}$$

I_1 - амплітуда швидкого спалаху,
 S - загальна світлосума реакції;
 4. Абсолютна антиоксидантна активність:

$$AA = \frac{I_2}{S}, \text{ де}$$

I_2 - амплітуда повільного спалаху,
 S - загальна світлосума реакції;
 5. Показник проксидантно-антиоксидантної рівноваги:

$$PB = \frac{(I_1 + I_2)}{S} + \tau, \text{ де}$$

I_1 - амплітуда швидкого спалаху,
 I_2 - амплітуда повільного спалаху,
 S - загальна світлосума реакції,
 τ - час індукції повільного спалаху;
 6. Напряга антиоксидантної системи:

$$PA = \frac{\tau}{I_2}, \text{ де}$$

τ - час індукції повільного спалаху,
 I_2 - амплітуда повільного спалаху.

Характеристика розрахункових показників оцінки біохемілюмінесценції, що запропоновані, наведена в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика (тлумачення) розрахункових показників оцінки біохемілюмінесценції

№ з/п	Показник	Розмірність	Характеристика (тлумачення)
1.	Потужність антиоксидантної системи (P)	умов. од.	Показник, що характеризує потужність антиоксидантної системи, тобто силу дії даної системи впродовж інтервалу часу. Іншими словами, показник P вказує на спроможність компонентів антиоксидантної системи зменшувати інтенсивність другого (повільного) спалаху БХЛ (I_2).
2.	Радикальний пул (RP)	C	Показник, що характеризує загальну (фонову та індуковану) кількість вільних радикалів в системі, тобто тих, що утворюються в організмі під впливом чинника, що досліджується.
3.	Абсолютна радикальна активність (AR)	c^{-1}	Показник, що характеризує кількість вільних радикалів, які утворюються в біосубстраті після індукції їх утворення за умов впливу фактора, що досліджується. Іншими словами, величина AR відображає саме ту кількість вільних радикалів, яка індукована.
4.	Абсолютна антиоксидантна активність (AA)	c^{-1}	Показник, що характеризує тривалість дії антиоксидантної системи за умов індукції вільнорадикального окислення. Тобто даний параметр вказує на час, впродовж якого антиоксидантна система здатна протистояти вільнорадикальному окисленню за конкретних умов.

Характеристика (тлумачення) розрахункових показників оцінки біохемілюмінесценції

5.	Показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (РВ)	умов. од.	Показник, що дозволяє надати комплексну оцінку стану проксидантно-антиоксидантного гомеостазу та його порушення шляхом зміщення рівноваги про- та антиоксидантних агентів в організмі.
6.	Напруга антиоксидантної системи (РА)	$c^2/имп$	Показник, що характеризує ступінь напруги антиоксидантної системи за умов експерименту, що вивчається. Тобто даний параметр БХЛ свідчить про спроможність компонентів системи антиоксидантного захисту зменшувати величину другого піку БХЛ (I_2) та віддаляти його у часі.

Для демонстрації ефективності реалізації запропонованого способу, вважаємо за доцільне представити в якості моделі комплексної оцінки БХЛ тканин організму за умов впливу вперше синтезованих германій органічних сполук, як потенційних лікарських засобів, на характер змін над слабого світіння при різних патологічних станах (гіпоксія замкнутого простору та ішемія головного мозку).

Приклад

Дослідження виконані на 98 білих статевозрілих безпородних щурах обох статей масою 190-230 г, відповідно до методичних рекомендацій Дії "Державний експертний Центр МОЗ України" (ДП "ДЕЦ МОЗ України") [5], у лабораторії кафедри фармакології ДЗ "Луганський державний медичний університет", яка сертифікована ДП "ДЕЦ МОЗ України" на предмет проведення доклінічних досліджень лікарських засобів (посвідчення № 03 від 25 грудня 2008 р.).

Як експериментальні моделі були вибрані: гострий ішемічний інсульт головного мозку та гіпоксія замкнутого простору (ГЗП).

Моделювання гострого церебральною інсульту у щурів здійснювали шляхом двосторонній одномоментній оклюзії загальних сонних артерій до місця їх біфуркації на зовнішню та внутрішню гілки під натрій-тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) [5].

Гіпоксію з прогресуючою гіперкапнією моделювали шляхом розміщення щурів в ізольовані скляні гермооб'єми (10 дм³), які перевертали догори дном і опускали в піднос з водою, щоб попередити потрапляння повітря. При цьому експозиція склала 30 хвилин [6].

Всі дослідження були проведені через 6 годин з моменту моделювання патологічного стану, оскільки саме в ці строки реєструються найбільш виражені зміни показників БХЛ як в умовах гострого ішемічного інсульту, так і в умовах ГЗП [6-8].

Тварини були поділені на 4 групи: інтактну ("здорові" щури), контрольну (патологічний стан без лікування), референтну (патологічний стан + препарат порівняння) та дослідну (патологічний стан + лікування).

Для терапії гострого церебрального інсульту було обрано координаційну сполуку германію з калієм та лимонною кислотою (ОК-7), яка виявила найбільшу активність в проведеній раніше скринінговій серії досліджень [7]. ОК-7 вводили в розробленому раніше дозовому режимі, а саме: внутрішньоочеревинно у вигляді 1 % водного розчину в дозі 65 мг/кг через 35 хвилин після перев'язування судин [8].

Як референтний препарат в умовах гострого церебрального інсульту був вибраний Пірацетам, (виробництва "Фармак", Україна) у вигляді 20 % розчину в ампулах по 5 мл, який вводили внутрішньоочеревинно в дозовому режимі (250 мг/кг через 30 хвилин після ішемії), що є загальноприйнятим і широко використовується в клінічній практиці [9-13].

Для попередження наслідків ГЗП використовували ВІТАГРЕМ-3 (комплексна координаційна сполука на основі германію і діетилентриамінпентаоцтової кислоти з калієм) [14], який вводили внутрішньоочеревинно у вигляді 1 % водного розчину у раніше розробленому дозовому режимі: 48,67 мг/кг за 36,04 хв. до початку моделювання гіпоксії замкнутого простору [15].

Препаратом порівняння при моделюванні 100 ГЗП був мексидол (виробництво "Фармасофт", Російська Федерація), який щурам вводили у дозі мг/кг за 36,04 хв. до початку розвитку форми гіпоксичного синдрому, що моделюється [16].

Інтенсивність процесів БХЛ у сироватці крові вивчали, як вже було зазначено раніше, через 6 годин з моменту моделювання патології. У роботі використовували удосконалений співробітниками кафедри метод визначення в тканинах активності процесів БХЛ, що індукували 3 % розчином перекису водню. Біохемілюмінограми сироватки крові реєстрували протягом 5

хвилин з моменту індукції за допомогою хемілюмінометра "Emilite-1105". Досліджуваний біосубстрат попередньо інкубували (15 хвилин при 37 °C). Перед виміром записували фонові значення та спонтанний рівень БХЛ [1].

Кінетику вільнорадикальних реакцій вивчали через 6 год. з початку моделювання патологічного стану оцінювали за наступними показниками: амплітуда швидкого спалаху (I_1), амплітуда повільного спалаху (I_2), час індукції повільного спалаху (τ), а також загальна світлосума реакції (S). Розрахунок досліджуваних параметрів проводили за допомогою спеціально розробленої на кафедрі фармакології Державного закладу "Луганський державний медичний університет" комп'ютерної програми в системі програмування Delphi [1].

Результати проведених досліджень наведені в табл. 2.

Аналіз динаміки змін величин амплітуди швидкого спалаху при ГЗП, дозволяє зазначити суттєве підвищення цього показника у контролі в 1,6 разів у порівнянні з інтактними тваринами. Тобто, встановлений ступінь збільшення амплітуди швидкого спалаху у крові щурів із ГЗП свідчить про накопичення перекисних продуктів і, в першу чергу, гідропероксидів ліпідів, що вказує на високу інтенсивність перебігу процесів ліпідперекиснення, а, отже, й на надлишкове утворення продуктів останнього.

У дослідній же групі під впливом ВІТАГЕРМ-3 протягом усього експерименту значення I_1 у 1,5 рази нижчі за такі, що реєструються у тварин контролю.

Аналізуючи зміни I_2 у сироватці крові за умов ГЗП (контроль) (див. табл. 2), слід зазначити, що цей параметр БХЛ впродовж всього дослідження суттєво перевищує аналогічний показник на 52 % після моделювання гіпоксії з прогресуючою гіперкапнією, відповідно, у порівнянні з інтактною серією. Із застосуванням ВІТАГЕРМ-3 інтенсивність надслабкого світіння у ранньому постгіпоксичному періоді зазнає істотних змін. Так, величини другого піку БХЛ у дослідній серії зменшуються у порівнянні із значеннями I_2 , зафіксованими у контрольних тварин на 34 %, не відрізняючись при цьому від значень I_2 інтактної групи у всі терміни дослідження.

Таблица 2

Біохемілюмінесцентний аналіз протигіпоксичної дії ВІТАГЕРМ-3 та протіішемічної дії ОК-7 на моделях ГЗП та церебрального інсульту, відповідно

n=6											
№ п/п	Назва	Позна- чка	Розмір- ність	Патологічний стан, що вивчається							
				Гіпоксія замкнутого простору				Ішемічний інсульт			
				Групи тварин				Групи тварин			
				Інта- тна	Контро- льна	Дослі- дна	Рефе- рентна	Інта- тна	Конт- рольна	Дослі- дна	Рефе- рентна
Існуючі параметри											
1.	Ампліту- да швид- кого спалаху	I_1	імп/с	335,67	601,50	391,17	444,50	412,87	979,75	393,37	710,5
2.	Ампулі- туда повіль- ного спалаху	I_2	імп/с	314,83	479,83	315,17	354,00	324,75	588,87	259,62	579,37
3.	Час індукції повіль- ного спалаху	τ	с	21,83	15,50	20,83	21,17	28,00	30,00	32,37	29,37
4.	Загальна світло- сума реакцій	S	імп	37143,33	59626,33	33772,00	40603,33	35816,87	84532,37	39412,37	71689,31

Таблиця 2

Біохемілюмінесцентний аналіз протигіпоксичної дії ВІТАГЕРМ-3 та протишемічної дії ОК-7 на моделях ГЗП та церебрального інсульту, відповідно

Параметри БХЛ, що пропонуються											
5.	Потужність антиоксидантної системи	P	умов. од	1,066	1,254	1,241	1,25565	1,271	1,663	1,515	1,226
6.	Радикальний пул	RP	c	57,10 0	55,14 2	47,81 3	50,850	48,55 7	53,889	60,35 7	55,57 9
7.	Абсолютна Радикальна активність	AR	c ⁻¹	0,90·10 ⁻²	1,01·10 ⁻²	1,16·10 ⁻²	1,10·10 ⁻²	1,15·10 ⁻²	1,16·10 ⁻²	1,00·10 ⁻²	0,99·10 ⁻²
8.	Абсолютна антиоксидантна активність	AA	c ⁻¹	0,85·10 ⁻²	0,81·10 ⁻²	0,93·10 ⁻²	0,87·10 ⁻²	0,91·10 ⁻²	0,70·10 ⁻²	0,66·10 ⁻²	0,81·10 ⁻²
9.	Показник прооксидантноантиоксидантної рівноваги	PB	умов. од	0,382 3	0,281 1	0,435 7	0,4163	0,576 6	0,5567	0,536 3	0,528 4
10.	Напруга антиоксидантної системи	PA	c ² /имп	6,93·10 ⁻²	3,23·10 ⁻²	6,61·10 ⁻²	5,98·10 ⁻²	8,62·10 ⁻²	5,10·10 ⁻²	12,47·10 ⁻²	5,07·10 ⁻²

На підставі отриманих даних є підстави дійти висновку щодо вираженої здатності потенційного лікарського засобу корегувати патологічні зміни, що виникають за умов гіпоксії, і, в першу чергу, ефективно пригнічувати генерацію радикалів та розгалуження ланцюгових вільно-радикальних реакцій за даних екстремальних умов.

Наступним показником, що аналізувався, є величина τ , яка вказує на рівень антиокислювальної активності фосфоліпідів і, також, відображає співвідношення про- та антиоксидантів у системі. При аналізі динаміки цього показника (див. табл. 2), очевидним є те, що в контрольній групі тварин відзначається зменшення значень τ , щодо інтактних щурів на 29 %.

Виявлена в експерименті модифікація БХЛ-кривої за часом індукції повільного спалаху спостерігається в групі тварин, котрим попередньо вводили ВІТАГЕРМ-3. Так, у дослідній групі реєструється порівняно з контролем, збільшення тривалості латентного періоду генерації повільного спалаху на 34 %. Отримані дані є свідченням підвищення вмісту антиоксидантів за рахунок наявності ВІТАГЕРМ-3 у системі, тобто в організмі, що сприяє захисту ендогенних антиоксидантів від вільно-радикального пошкодження у ранньому постгіпоксичному періоді. Це є ще одним підтвердженням здатності германійорганічної сполуки, що досліджується, зберігати пул компонентів антиоксидантної системи захисту організму при формі гіпоксії, що досліджується.

За світлосумою надслабкого світіння (S) можна оцінити число ланцюгів розгалуження, реакцій утворення вільних радикалів, тобто скільки перекисних радикалів, що утворилися, припадає на один іон двовалентного заліза або іншими словами - величина S характеризує здатність фосфоліпідів піддаватися вільно-радикальному окисненню за конкретних умов. Оцінюючи комплексно всі параметри надслабкого світіння є очевидною значна модифікація БХЛ-кривої загалом, а разом з тим, і світлосуми БХЛ-реакції (S). Так, зокрема, у контрольній групі значення S у сироватці крові у 1,4 рази вище за аналогічні показники у інтактних тварин.

Разом з тим, інша БХЛ-картина спостерігається у сироватці щурів дослідної серії, тобто при застосуванні ВІТАГЕРМ-3 перед початком розвитку форми гіпоксії, що моделюється. Так, загальна світлосума БХЛ-реакції у сироватці крові дослідних тварин у 1,8 рази нижче за аналогічний показник, що є у контрольній групі.

У порядку обговорення маємо наголосити, що отримані дані вельми переконливо свідчать про підвищення стійкості фосфоліпідів до вільнорадикального окиснення у щурів в період реоксигенації після вилучення із гермооб'ємів на фоні застосування сполуки, що досліджується.

Таким чином, аналіз БХЛ-профілю у тварин як на моделі ГЗП, так і інсульту головного мозку за умов застосування потенційного антигіпоксанта та церебропротектора, відповідно за показниками, що існують нині, дозволяє скласти певне уявлення щодо характеру перебігу вільно радикальних процесів в експериментах, що вивчаються. Разом з тим, отримана інформація не є такою, яка б задовольнила дослідника в плані повноти картини вільнорадикального окиснення фосфоліпідів.

З огляду на це, нами в табл. 2 наведено низку параметрів БХЛ, що пропонуються, для комплексної оцінки прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі тварин на обох експериментальних моделях, що досліджуються, а саме: гіпоксії замкнутого простору та ішемічного інсульту.

Особливої уваги було приділено аналізу запропонованих нами показників комплексної оцінки біохемілюмінесценції тканин організму. Так, потужність антиоксидантної системи в контрольній, дослідній та референтних групах збільшується в 1,25 разу в порівнянні з інтактною групою, що, насамперед, є наслідком адаптаційного підсилення захисних механізмів організму в умовах ГЗП. При цьому особливу увагу звертає на себе той факт, що радикальний пул в дослідній групі на 16,3 % знижується у порівнянні з інтактною групою, що свідчить про антирадикальні властивості ВІТАГЕРМ-3.

Аналіз абсолютної радикальної активності показує, що в контрольній, дослідній та референтних групах вона декілька підсилюється, це пов'язане з активацією процесів вільно-радикального окислення на тлі ГЗП. Однак, при цьому на себе звертає увагу той факт, що тривалість дії антиоксидантної системи, про що свідчить величина такого показника, як абсолютна антиоксидантна активність, в дослідній групі тварин зростає, в порівнянні зі всіма групами тварин.

При аналізі показника прооксидантно-антиоксидантної даний показник звертає на себе увагу та обставина, що в контрольній групі тварин рівновага зміщується в бік прооксидантних процесів. Однак, застосування ВІТАГЕРМ-3 реалізується підвищенням активності антиоксидантних процесів, про що свідчить збільшення величини РВ у 1,55 рази у порівнянні з контролем.

Аналогічних змін зазнає і напруга антиоксидантної системи. Так, у контрольній групі тварин величина РД більш ніж у 2 рази знижується в порівнянні з такою, що зареєстрована у інтактних тварин. Це свідчить про збільшення оксидативного стресу в організмі в умовах ГЗП. Застосування ж ВІТАГЕРМ-3 сприяє збільшенню напруги антиоксидантної системи практично до рівня інтактних тварин.

Метою наступного фрагмента було дослідження кінетики вільнорадикальних реакцій за умов гострої ішемії головного мозку на тлі застосування потенційного церебропротектора - ОК-7. Результати вивчення впливу германіюорганічної сполуки ОК-7 на інтенсивність процесів БХЛ у сироватці крові щурів за умов експерименту, що досліджується, наведено в табл. 2.

При вивченні змін амплітуди швидкого спалаху БХЛ сироватки крові (I_1), яка відображає інтенсивність генерації вільних радикалів привертає увагу те, що у контрольній групі величина цього показника у 2,4 разу перевищує дані інтактної групи.

При застосуванні ж ОК-7 за умов гострого ішемічного інсульту (дослідна група тварин) величина I_1 знижується на 60 % порівняно з контролем.

Аналізуючи динаміку змін амплітуди повільного спалаху світіння (I_2), котрий, як відомо, пов'язаний з переокисненням ліпідів за участі Fe^{2+} , у контрольній групі має місце майже двократне збільшення цього показника відносно інтактної групи.

У той самий час на тлі застосування ОК-7 з лікувальною метою при гострій ішемії головного мозку спостерігається нормалізація цього показника, про що свідчить відсутність різниці порівняно навіть з інтактними тваринами. Картина, що спостерігається, є, на нашу думку, результатом зменшення інтенсивності генерації вільних радикалів, яка відбувається саме за каталітичної участі металів змінної валентності. Загалом це сприяє попередженню агресивної дії такого роду металів, а саме Fe^{2+} на мітохондрії і, як наслідок, деструкції мембран нейронів.

Антиоксидантний профіль у тварин за умов гострої ішемії головного мозку оцінювали за таким параметром БХЛ, як час індукції повільного спалаху надслабкого світіння (τ). Отримані при цьому дані наведено в табл. 2.

Величина цього показника залежить від співвідношення активностей про- та антиоксидантної систем. Як показали результати біохемілюмінометрії, при застосуванні ОК-7 з лікувальною метою цей показник не має відмінностей від інтактної та референтної серій, що свідчить про нормалізацію рівня ендогенних та екзогенних антиоксидантів під впливом досліджуваної германіюорганічної сполуки. Не виключено, що саме остання й робить суттєвий внесок у цей процес.

Не менш інформативним є аналіз загальної світлосуми БХЛ-реакцій (S), яка, як відомо, становить площу під біохемілюмінесцентною кривою та відображає інтенсивність вільнорадикального окиснення біомолекул. У середньому цей показник у контрольній групі

тварин у 2,5 рази більший, ніж у інтактній групі. Це досить яскраво свідчить про посилення утворення вільних радикалів у киснедефіцитних умовах тотальної ішемії головного мозку.

У той самий час у групі тварин, яким вводили ОК-7 з лікувальною метою, рівень відповідного показника менший (на 53 %) під контролю. Цікаво, результати дослідної групи не відрізняються від інтактної серії. Зменшення величини S може свідчити про те, що у відповідь на збільшення інтенсивності вільнорадикального окиснення починають діяти компенсаторні механізми антирадикальної спрямованості, які направлені на зменшення інтенсивності плину прооксидантних процесів за умов церебральної ішемії.

Отже, отримані в динаміці результати біохемілюмінометрії дають підстави дійти висновку, що в умовах гострої ішемії головного мозку відбувається гі-перініціація вільнорадикальних процесів. Разом з тим раціональне застосування з лікувальною метою координаційної сполуки германію, калію та лимонної кислоти (ОК-7) забезпечує зменшення надмірної неконтрольованої продукції вільних радикалів, що є експериментальним обґрунтуванням твердження того, що потенційний церебропротектор ОК-7 володіє вельми вираженими антирадикальними властивостями, що власне й забезпечує ефективну регуляцію прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі за умов поширеної гострої форми ішемії головного мозку.

Як зазначалось раніше, важливий інтерес представляє аналіз запропонованих нами показників комплексної оцінки біохемілюмінесценції тканин організму.

Отже, дані, які наведені в табл. 2 розширюють нашу уяву про потенційний церебропротектор ОК-7, який, як було зазначено раніше, володіє вельми вираженими антирадикальними властивостями за умов гострого ішемічного інсульту головного мозку.

Так, потужність антиоксидантної системи в контрольній та дослідній групах збільшується в 1,25 разу в порівнянні з інтактною групою, а цей показник в референтній групі знаходиться нарівні з інтактною. Це свідчить про адаптаційне підсилення захисних механізмів організму в умовах гострої церебральної ішемії. Слід відмітити, що в дослідній групі тварин під впливом ОК-7 радикальний пул в 1,2 рази збільшується в порівнянні з інтактною групою. А такі показники, як абсолютна радикальна активність та абсолютна антиоксидантна активність знаходиться приблизно на одному рівні у всіх дослідних групах.

При аналізі показника прооксидантно-антиоксидантної рівноваги можна констатувати, що в контрольній, дослідній та референтній групах рівновага декілька зміщується в бік прооксидантних процесів. Але слід відмітити такий показник, як напруга антиоксидантної системи, котрий в групі тварин під впливом ОК-7 збільшується в 1,5 рази порівняно з інтактною групою. Це свідчить про те, що потенційний церебропротектор - ОК-7 збільшує силу та ємність антиоксидантної системи при гострому інсульті головного мозку.

Таким чином, застосування запропонованих нами показників дозволяє більш глибоко оцінити біохемілюмінесценцію тканин організму, а також з'ясувати зв'язок між антиоксидантною та антирадикальними системами організму, тобто дозволяє оцінити взаємний вплив антиоксидантної та антирадикальної систем в конкретних умовах, що вивчаються; дозволяє оцінити вклад чинника, що вивчається на ініціацію розгалуження вільнорадикальних процесів відносно фонового рівня вільнорадикального окиснення в організмі; дозволяє встановити фактичну різницю між антирадикальною та антиоксидантною активностями лікарського засобу або іншого чинника, що вивчається; дозволяє визначити окремо ємність та активність антиоксидантного захисту організму; дозволяє всебічно оцінити реальний стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі.

Джерела інформації:

1. Биохемилуминесцентный анализ фармакодинамики лекарственных средств / Лукьянчук В.Д., Кравец Д.С., Витохина Н.В.[и др.] // Метод рекоменд. Луганск, 2010.-42 с.

2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю.А. Владимиров // Биохимия. 2004. - Т. 69. Вып. 1. С. 5-7.

3. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилуминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии.-2009. - Т.49. - С. 341-388.

4. О роли активации свободнорадикального окисления в структурной и функциональной дезорганизации биосистем в условиях патологии / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, Е.Ф. Понукалина, Г.А. Афанасьева, М.Н. Бизенкова // Фундаментальные исследования.-2009. - № 5. -С. 122-130.

5. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / під ред. член. кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіценна, 2002.-567 с.

6. Лук'янчук В.Д. Антирадикальний захист головного мозку сполукою ВІТАГЕРМ-3 за умов гіпоксичного пошкодження / В.Д. Лук'янчук, К.О. Шебалдова // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2013.- № 3 (34). С 18-22.

5 7. Житіна І.О. Скринінг і порівняльна оцінка протиішемичної ефективності серед координаційних сполук германію при гострій цереброваскулярній недостатності / В.Д. Лук'янчук, І.О. Житіна, І.Й. Сейфулліна та ін. // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2010. - № 1-2 (14-15). - С. 61-64.

8. Житіна І.О. Експериментально-математичний аналіз режиму застосування потенційного нейропротектора ОК-7 при церебральному ішемічному інсульті / В.Д. Лук'янчук, І.О. Житіна, Д.С. Кравець та ін. // Одеський медичний журнал.-2011. № 6 (128). - С. 19-21.

10 9. Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the piracetam in Acute Stroke Study (PASS) group / P. P. De Deyn, J. D. Reuck, W. Deberdt [et. al.] // Stroke.-1997. - Vol. 28(12). - P. 2347-2352.

15 10. Скрининг потенциальных церебропротекторов в ряду новых координационных соединений германия с комплексодами и гидроксикарбоновыми кислотами на модели тотальной ишемии головного мозга / В.Д. Лук'янчук, Е.В. Крылова, И.И. Сейфуллина и др. // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаяєва. - 2008. - Т. 9, № 4. - С. 123-126.

20 11. Чадова Л.В. Скринінг і порівняльна оцінка ефективності протиішемичних засобів серед координаційних сполук германію з біолігандами при гострій цереброваскулярній недостатності / Л.В. Чадова, І.Й. Сейфулліна, В.М. Ткаченко // Одеський медичний журнал.-2005. - № 6. С. 19-22.

25 12. Лук'янчук В.Д. Скринінг і порівняльна оцінка ефективності потенційних церебропротекторів серед похідних тіазолідину на моделі гострої ішемії головного мозку / В.Д. Лук'янчук, Р.Б. Лесик, М.В. Оглобліна // Фармацевтичний журнал.-2003. - № 6. - С. 51-56.

13. Бибики О.Ю. Експериментальне обґрунтування комбінованого застосування ацелізіну та тіотриазоліну в умовах гострої ішемії головного мозку: авто-реф. дис. на здобуття наук, ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.05 "Фармакологія" / О.Ю. Бибики. - К., 2002. 20 с.

30 14. Порівняльні скринінгові дослідження в ряду координаційних сполук германію на моделі гіпоксії замкнутого простору / В.Д. Лук'янчук, І.Й. Сейфулліна, К.О. Шебалдова [та ін.] // Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О. Можаяєва.-2013. - № 1. – С. 81-84.

15. Шебалдова К.О. Дослідження фармакометричних показників режиму дозування антигіпоксанта ВІТАГЕРМ-3 / В.Д. Лук'янчук, К.О. Шебалдова, Д.С. Кравець, Л.С. Бобкова // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2013. - № 4-5 (35). – С. 66-69/

35 16. Вплив мексидолу на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та процеси окисного фосфорилування в мітохондріях міокарда щурів за умов гострої гіпоксії / М.М. Стешенко, О.О. Гончар, В.І. Носарь, С.Б. Французова, І.М. Маньковська // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2010. - № 4 (17). – С. 64-69.

40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб комплексної оцінки біохемілюмінесценції тканин організму, в основі якого лежить знаходження ряду значень розрахункових показників біохемілюмінесценції, базується на тому, що на підставі проведеного БХЛ-аналізу тканин організму і визначення амплітуди швидкого спалаху, амплітуди повільного спалаху, часу індукції повільного спалаху, а також загальної світлосуми реакції визначають запропоновані нами показники, а саме: потужність антиоксидантної системи, радикальний пул, абсолютну радикальну активність, абсолютну антиоксидантну активність, показник прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, а також напругу антиоксидантної системи, що дозволить всебічно характеризувати стан антирадикальної і антиоксидантної систем захисту організму в цілому.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601