

Украинское биофизическое общество  
Ukrainian Biophysical Society

Украинское биохимическое общество  
Ukrainian Biochemical Society

Украинское физиологическое общество  
Ukrainian Physiological Society

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
Taras Shevchenko National University of Kyiv

Физико-химический институт им. А. В. Богатского Национальной академии наук Украины  
A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute of NAS of Ukraine

Институт биохимии им. А.В. Палладина Национальной академии наук Украины  
O.V. Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского  
V.I. Vernadsky Taurida National University

Национальный фармацевтический университет  
National University of Pharmacy

**Научно-практическая конференция**  
**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:**  
**фундаментальные и прикладные вопросы**  
**получения и применения**

**Новый Свет, Крым, Украина**  
**25–30 мая 2009**

**Тезисы докладов**

**Scientific Conference**

**BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES:**  
**Fundamental and Applied Problems**

**Novy Svet, AR Crimea, Ukraine**  
**May 25–30, 2009**

**Abstracts**

mavis



PUBLISHER

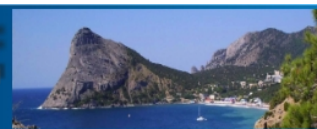
Киев

2009



## Биологически активные вещества:

фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения  
25 - 30 мая 2009, Новый Свет, АР Крым, Украина



### ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

#### Сопредседатели:

Академик НАН Украины, д.х.н.,  
проф. **Андронати С.А.**  
Д.б.н., профессор **Остапченко Л.И.**

#### Члены программного комитета:

Академик НАН Украины, д.б.н.,  
проф. **Комисаренко С.В.**  
Академик НАН Украины, д.б.н.,  
проф. **Магура И.С.**  
Академик НАН Украины, д.б.н.,  
проф. **Лозинский М.О.**  
Чл.-кор. НАН Украины, д.б.н.,  
проф. **Костерин С.А.**  
Чл.-кор. НАН Украины, д.б.н.,  
проф. **Донченко Г.В.**  
Чл.-кор. НАН Украины, д.х.н.,  
проф. **Георгиевский В.П.**  
Чл.-кор. НАН Украины, д.х.н.,  
проф. **Черных В.П.**  
Д.б.н., проф. **Береговая Т.В.**  
Д.б.н., проф. **Мирошныченко Н.С.**  
Д.б.н., проф. **Темурьянц Н.А.**

### PROGRAM COMMITTEE

#### Co-Chairs:

Academician of NAS of Ukraine,  
prof. **Andronati S.A.**  
prof. **Ostapchenko L.I.**

#### Members of Program Committee:

Academician of NAS of Ukraine,  
prof. **Komisarenko S.V.**  
Academician of NAS of Ukraine,  
prof. **Magura I.S.**  
Academician of NAS of Ukraine,  
prof. **Lozynsky M.O.**  
member of NASU,  
prof. **Kosterin S.O.**  
member of NASU,  
prof. **Donchenko G.V.**  
member of NASU  
prof. **Georgievsky V.P.**  
member of NASU  
prof. **Chernykh V.P.**  
prof. **Beregova T.V.**  
prof. **Miroshnychenko M.S.**  
prof. **Temuryants N.A.**

### ОРГКОМИТЕТ

Д.х.н., проф. **Чирва В.Я.** (сопредседатель)  
Д.б.н., проф. **Мартынюк В.С.** (сопред-ль)  
Д.б.н., проф. **Макарчук Н.Ю.**  
Д.б.н., проф. **Чуян Е.Н.**  
К.х.н. **Павловский В.И.**

### ORGANIZING COMMITTEE

prof. **Chirva V.Ya.** (co-chair)  
prof. **Martynyuk V.S.** (co-chair)  
prof. **Makarchuk M.Yu.**  
prof. **Chuyan E.N.**  
PhD **Pavlovsky V.I.**

УДК 577:54.05  
ББК 20.1я 43 + 26.23я 43  
Т 29

Тезисы докладов Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 25 - 30 мая, 2009, Новый Свет, Украина. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2009. – 488 с.

ISBN 978-966-96879-2-0

Сборник тезисов докладов Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Рассмотрен широкий круг междисциплинарных вопросов по проблеме получения и применения биологически активных веществ.

Рассчитан на участников конференции и широкий круг читателей, работающих в сфере получения и применения биологически активных веществ.

ISBN 978-966-96879-2-0

ББК 20.1я 43 + 26.23я 43

© Авторы тезисов, 2009

© В.С. Мартынюк, 2009, дизайн, обложка



**Биологически активные вещества:**

фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения

25 - 30 мая 2009, Новый Свет, АР Крым, Украина



## **Новые технологии получения биологически активных веществ**

## **New Technologies of Obtaining of Bioactive Substances**



## Биологически активные вещества:

фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения

25 - 30 мая 2009, Новый Свет, АР Крым, Украина





## **ПРАВОПРИМЕНИТЕЛЬНАЯ ПРАКТИКА, СЛОЖИВШАЯСЯ ЗА ГОДЫ ДЕЙСТВИЯ НОРМ ПАТЕНТНОГО ПРАВА НА ПОСТСОВЕТСКОМ ПРОСТРАНСТВЕ: ПЛЮСЫ И МИНУСЫ**

*Агуреев А.П.*

Союзпатент, Москва, Россия. e-mail: [agureev@sojuzpatent.com](mailto:agureev@sojuzpatent.com)

Безусловным прорывом в области патентного права в постсоветский период было возвращение к традиционной форме охраны продуктов интеллектуальной собственности – охране патентом. К плюсам, конечно, следует отнести и расширение списка объектов, которым предоставляется охрана, а также разумный подход к определению самого списка, который перестал быть исчерпывающим. Однако, по-видимому, недостаточное внимание со стороны государства, отсутствие с его стороны четкой политики в области охраны интеллектуальной собственности не позволяет сделать вывода об обоснованности правоприменительной практики, которая не имеет пока заданных ориентиров.

Зачем заявитель испрашивает патент, насколько государство заинтересовано в монополии заявителя (отечественного или зарубежного) на тот или иной продукт – вопросы, не имеющие, как правило, четкого ответа. Почему позволительно выхолащивать идею автора, выдавая очень слабый, легко обходимый третьими лицами патент? Государство в лице Ведомства, которому поручено проводить политику в области охраны прав на интеллектуальную собственность, обязано иметь четкую позицию, но она наблюдается с трудом. Невозможно объяснить, почему отечественные разработчики практически не используют опыт своих западных коллег, когда определяют объем притязаний. Если обратиться к публикациям Патентных ведомств России и др. бывших союзных республик, вы не найдете в них, за исключением патентов, выданных ведущим фармацевтическим фирмам Запада, примеров использования структур Маркуша, позволяющих охватывать многие тысячи соединений; нет практики охраны патентом библиотек, несмотря на то, что комбинаторной химией занимаются практически все институты и университеты; крайне ограничен список патентов, в которых охраняются клетка, химерные ДНК и т.д. Зато нормой является охрана от 1 до десятка конкретных соединений, получение которых прямо расписано в заявке. Ничего хорошего такой подход к охране особенно новых химических соединений не даст уже по той простой причине, что на постсоветском пространстве практически нет достаточного количества высоких химических технологий, чтобы масштабировать производство новой тонкой химии. Следовательно, узкая охрана превращается в подарок все тем же мировым фармацевтическим гигантам, поскольку после публикации патента или заявки будет четко указана область поиска перспективного лекарственного средства. И наоборот, правоприменительная практика не использует преимущества, предоставляемые институтом «селективных изобретений», который, кстати, крайне скупо прописан в законодательных нормах. Для государств на постсоветском пространстве, которые сохранили фармацевтическую промышленность, ничто не мешает сделать селективные изобретения хозяйственно независимыми – это только один из возможных вариантов поддержки отечественного производителя и потребителя, который предусмотрен, но четко не прописан, а следовательно не используется на практике. Другая важная и недостаточно контролируемая Ведомствами сторона правоприменительной практики – диктат со стороны патентных экспертов в отношении авторов – одностороннее ущемление для авторов прочтение норм патентных законов и правил. Это ничто иное, как необдуманное превышение собственных полномочий, которые по закону сводятся только к тому, чтобы оценить новизну предлагаемой к охране разработки – все остальное отдано на усмотрение автору, то есть действительно высококлассному специалисту (а не среднему, каковым по закону является эксперт) в той или иной области.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### THE LEGAL RELATIONSHIP PRACTICE DURING THE YEARS SINCE PATENT REGULATIONS STANDARDS CAME INTO EFFECT IN THE POST-SOVIET AREA: PRO AND CONTRA

*Agureev A.P.*

Sojuzpatent, Moscow, Russia. e-mail: [agureev@sojuzpatent.com](mailto:agureev@sojuzpatent.com)

An absolute breakthrough in the field of patent rights in the post-Soviet period was a return to the traditional form of protection of products of intellectual property – patent protection. An undoubtedly positive result is an extension of a list of protectable subject-matters and a reasonable approach to sizing the list per se, which has ceased to be comprehensive. However, insufficient attention devoted by the Government to protection of intellectual property and the absence of a clear governmental policy in this regard do not permit making a valid conclusion about the legal relationship practice, which has not been given well-defined orientation yet.

Why applicant claims for a patent, how much the Government is concerned about the applicant's monopoly (domestic or foreign) on a product – these are questions that are not, as a rule, answered. Why is it possible to geld the author's idea by granting a very weak patent that can be easily circumvented by third parties? The Government embodied in the Patent Office, which is authorized to carry out the policy of protecting intellectual property rights, should take a firm position, but it is barely perceptible. It is inexplicable why domestic developers hardly ever use the experience of their western colleagues in defining the scope of claims. If we take publications of the Patent Offices of Russia and other former USSR republics, we will not find therein, with the exception of patents of leading pharmaceutical companies of the West, examples of using the Markus' structures, which make it possible to cover many thousands of compounds; neither there exists the practice of patent protection of libraries, although almost all institutes and universities are engaged in combinatorial chemistry; a list of patents that protect cell, chimeric DNA, etc. is extremely limited. However, it is considered normal to afford protection of one to ten particular compounds, the preparation of which is directly described in the application. None positive results may be expected from such an approach to protecting chemical compounds, especially new, for a simple reason that there are almost no high chemical technologies in the post-Soviet area to scale up the production of new fine chemistry. Therefore, a narrow protection turns into a gift presented to the world pharmaceutical giants because publishing a patent or an application will clearly result in pointing to the direction of search for a promising drug. On the contrary, the legal relationship practice does not use advantages offered by the institute of "selective inventions", which is scarcely reflected in legislative acts. Nothing can prevent the post-Soviet countries, which have maintained their pharmaceuticals, from making selective inventions economically independent – this is only one of possible variants of support of domestic manufacturers and consumers; this variant is stipulated but is not legitimated and, as a consequence, is not used to the benefit. Another important and underestimated by Patent Offices aspect of patent practice is the patent examiners' dictatorship towards authors, i.e., a lop-sided and disadvantageous to the author interpretation of patent laws and regulations. This is nothing but an irrational abuse of own authorities, which, in accordance with the law, are confined to assessment of novelty of an invention claimed for protection – all the rest is left to the author's discretion, who is a really high-class expert in the field (but not an ordinary one, i.e., of a kind he is by law).



## СЕЛЕКЦИЯ МИКРОМИЦЕТОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Айзенберг В.Л., Стойко В.И., Борисенко А.В., Капичон А.П., Твердохлиб И.А., Омельчук Е.А., Иванов А.А.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: v\_stoiko@mail.ru

В последние годы биотехнологические процессы успешно используют для получения биологически активных веществ, в частности ферментов микробного происхождения. Одно из основных направлений в области изучения биологически активных метаболитов грибов – установление условий их максимального биосинтеза.

В настоящее время в Украине не организовано производство промышленно ценных гидролаз. Фактором, сдерживающим восстановление отечественного производства ферментных препаратов, является отсутствие высокопродуктивных и технологичных штаммов микроскопических грибов-продуцентов ферментов.

Отдел физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины владеет государственного значения коллекцией мезо-и термотолерантных микромицетов, насчитывающей около 8 тыс. культур более 500 видов.

В отделе проводится селекционная работа по созданию стабильных и конкурентоспособных штаммов грибов – продуцентов гидролаз: липазы (КФ 3.1.1.3), инулиназы (КФ 3.2.1.7), эндоглюканазы (КФ 3.2.1.4), пектинэстеразы (КФ 3.1.1.11) и др. с целью их дальнейшего применения в биотехнологии. Изучены морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства ферментов, продуцируемых селекционированными грибами. Нами разработан спектрофотометрический метод определения липолитической активности (ЛА) по реакции с пара-нитрофенилпальмитатом (пНФП-метод). В результате проведенных исследований селекционирован новый штамм гриба *Rhizopus* sp. 2000ФМ – активный продуцент экзолипазы, осуществляющей гидролиз разнообразных жиров и масел. Штамм отличается высокой устойчивостью в широком диапазоне щелочных значений pH. Благодаря повышенной щелочестойкости штамм сможет найти применение в бытовой химии и соответствующих промышленных отраслях. В результате скрининга по способности к образованию инулиназы, гидролизующей полисахарид инулин до фруктозы отобраны новые штаммы грибов, продуцирующие внеклеточную инулиназу: *Penicillium* sp.225 и *Aspergillus* sp.8TX. полученные данные по влиянию источников углерода. Азота. Фосфора на биосинтез фермента дали возможность подобрать и оптимизировать состав питательной среды для культивирования грибов. Нами была отработана, применительно к микромицетам как объектам исследований, методика определения активности инулиназы, основанная на принципе восстановления редуцирующих сахаров. Методика опубликована в журнале «Биотехнология» (Москва), №5, 2007. Путем направленного ступенчатого скрининга среди коллекционных культур Отдела получены мезофильные микромицеты – продуцент пектинэстеразы (ПЭ) – *Penicillium dierckxii* 57699 – активный «моноферментный» штамм и *P. sclerotiorum* 8Н – продуцент комплекса пектиназ, синтезирующий биотин. Совместно с Институтом винограда и вина (ИВиВ) «Магарач» (Ялта, Крым) впервые установлена возможность использования ПЭ из *P. dierckxii* 57699 на стадии деметоксирования сырья для получения яблочного пектина. Полученный низкометоксилированный пектин характеризуется высокой комплексообразующей способностью. Данную биотехнологию можно рекомендовать для производства пектина лечебно-профилактического назначения. В Отделе создан банк штаммов микроскопических грибов – продуцентов гидролаз с новыми свойствами, среди которых отобран гриб *Aspergillus* sp.8TX, обладающий, помимо инулиназой, целлюлолитической (эндоглюканазной) активностью. В современных условиях в качестве альтернативного для производства спирта предлагается инулин- и целлюлозосодержащее сырье, например топинамбур. Ферментативный гидролиз нетрадиционного сырья и его предобработка с помощью инулиназ, целлюлаз и других ферментных препаратов с последующим использованием промышленных штаммов дрожжей позволит осуществить серийное производство этилового спирта. В ходе первичного скрининга по способности грибов к образованию эндоглюканазы при культивировании на средах с целлюлозосодержащими отходами наиболее высокие показатели эндоглюканазной активности отмечены у мезо- и термотолерантных штаммов грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Corynascus*.



## THE SELECTION OF MICROMYCETES – THE PRODUCERS OF HIGHTECHNOLOGIC HYDROLITIC ENZYMES

*Aisenberg V.L., Stoiko V.I., Borisenko A.V., Kapichon A.P., Tverdokhlib I.A.,  
Omelchuk E.A., Ivanov A.A.*

Institute of Microbiology and Virology, Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine  
e-mail: v\_stoiko@mail.ru

Last years the biologic processes are successfully used for the obtaining of biologic active substances, in particular, the enzymes of microbial origin. One of the main approaches in the field of the biologic active fungi metabolites is the determination of the conditions of their maximum biosynthesis.

Nowadays the production of industrial valuable hydrolases in Ukraine is not organized.

The fact restraining the reconstruction of the home production of enzymes preparations is the absence of high-productive and technologic strains of microscopic fungi – the enzymes producers.

The Department of Physiology and Systematics of Micromycetes of the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine has a state collection of meso- and thermotolerant micromycetes having more than 8000 cultures of more than 500 species.

The Department carries out the selection work to create a stable and compatible fungi strains – the hydrolases producers: lipase (KF 3.1.1.3), inulinase (KF 3.2.1.7), endoglucanase (KF 3.2.1.4), pectinesterase (KF 3.1.1.11) and others for the purpose of their further utilization in biotechnology. It has been studied morphologic-cultural and physiologic-biochemical enzyme properties, produced by fungus selection. We have worked out a spectral-photometric method of lipolytic activity (LA) determination by the reaction with a p-nitrophenilpalmitate (pNP-method). As a result of these investigations it has been selected a new *Rhizopus* sp.2000 FM fungus strain – an active producer of Exolipase carrying out the hydrolise of various fats and oils. The strain demonstrates a constitutive character in a wide range of alkali values of pH. Thanks to its high alkali stability the strain could be used in an everyday chemistry and corresponding industrial branches. As a result of a screening able to produce inulinase (hydrolising polysaccharide inuline to a fructose), there were selected new fungus strains producing Extra-cellular inulinase: *Penicillium* sp.225 and *Aspergillus* sp.8TX. The obtained data according to the influence of carbon, nitrogen and phosphorus sources on the enzyme biosynthesis gave the opportunity to choice and optimize the nutritious media composition for fungus cultivation. We have elaborated in respect to micromycetes as the objects of the investigation, the methods of the determination of inulinase activity based on the principles to reconstruct the reducing saccharides. The methods are published in the journal "Biotechnology" (Moscow) № 5, 2007. By means of a directed step screening among collection cultures of the Department there were obtained mesophylic micromycete – a producer of Pectinesterase (PE) *Penicillium dierckxii* 57699 and *P. sclerotiorum* 8H – a producer of pectinase complex synthesizing biotin. Together with the Institute of Grapes and Wine "Magaratch" (Yalta, the Crimea) it has been stated for the first time the possibility to use PE from *P. dierckxii* 57699 on the stage of raw material demetoxilation for the apple pectin obtaining. The obtained Low-metoxilated pectin is characterized by a high complex-forming ability. Given biotechnology could be recommended for pectin production in medical-prophylaxis purposes. The Department has created a bank of strains of microscopic fungus – hydrolyses producers with new properties among which the fungus *Aspergillus* sp.8TX, possessing except the Inulinase, the Cellulase (Endoglucanase) activity. In modern conditions as an alternative for a spirit production it is proposed inulin and culluloso-contain raw material, for example, jerusalem artichoke. Fermentative hydrolise of non-traditional raw material and its pre-cultivation by means of inulinases, cellulases and other enzyme preparations with the further utilization of industrial yeast strains will allow to carry out a serial production of Ethyl Spirit. In the course of initial screening according to fungus ability in the formation of Endoglucanase by the cultivating in media with cellulose-contain wastage the highest indices of endoglucanase activity are marked in mezo-and thermotolerant fungus strains of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Corynascus* species.





## ПРОИЗВОДНЫЕ $\alpha$ -АМИНОФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ КАК ПЕПТИДОМИМЕТИКИ. АСИММЕТРИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

Альфонсов В.А.

Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: alfonsov@iopc.knc.ru

Наличие в природе множества биологически активных натуральных пептидов дает в руки химикам огромное количество фармакофоров, которые могут быть использованы для создания новых терапевтических лекарственных средств. В результате связывания с ферментами или мембранными рецепторами пептиды способны влиять на клеточный обмен и контролировать такие жизненно важные процессы, как метаболизм, иммунную защиту и др. Однако низкая стабильность и склонность к быстрому метаболизму в организме лимитирует их применение в качестве терапевтических средств. В сравнение с природными пептидами синтетические пептидомиметики вследствие их более высокой стабильности, селективности и, как правило, большей доступности (простоты синтеза) являются очень важной группой ингибиторов, которые могут действовать как в качестве агонистов, так и антагонистов клеточных рецепторов.

Достаточно привлекательными среди этих соединений являются  $\alpha$ -аминофосфонаты, биологическая активность которых широко известна. Ее объяснение базируется на концепции «аналогов переходного состояния» (“transition state analogs”), которая рассматривает  $\alpha$ -аминофосфонаты как структурные аналоги переходного состояния реакций ферментативного гидролиза, аминолитиса и других реакций натуральных пептидов.

Получение  $\alpha$ -аминофосфонатов в энантиомерном виде представляет особый интерес, поскольку энантиомерия является одним из базовых свойств хиральных биологически активных соединений. Одним из способов получения аминокислот является реакция Пудовика. В докладе обсуждены возможности использования этой реакции в энантиоселективном синтезе, включая собственные исследования. Найдены новые удобные способы синтеза циклических и линейных аминокислот, основанные на взаимодействии соединений трехвалентного фосфора с  $\beta$ -альдиминоспиртами и иминокислотами. При использовании хиральных исходных реагентов большинство реакций протекает диастереоселективно, что позволяет получать целевые продукты с хорошими выходами в диастерео- и энантиомерном виде. Показано, что эффективным приемом повышения стереоселективности является использование реакций циклизации в стереоконтролирующей стадии.

*Работа поддержана грантами Civilian Research and Development Foundation (грант №. RUC2-2638-KA-05) Российского фонда фундаментальных исследований (грант №. 07-03-00617).*



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### $\alpha$ -AMINOPHOSPHONIC ACIDS DERIVATIVES AS PEPTIDOMIMETICS. ASYMMETRIC SYNTHESIS

Alfonsov V.A.

A.E.Arbusov Institute of Organic and Physical Chemistry, KazSC RA S, Kazan, Russian Federation.  
e-mail: alfonsov@iopc.knc.ru

The discovery of a multitude of naturally occurring bioactive peptides has revealed a wealth of pharmacophores, which are used by medicinal chemists in their effort to develop new therapeutic drugs. After binding to an enzyme or a membrane receptor they influence cell-to-cell communication and control a variety of vital functions such as metabolism, immune-defense and so on. But instability and rapid metabolism by proteolysis limit their application as therapeutic drugs. Artificial peptidomimetics owing to their improved stability, selectivity and, as a rule, more availability (simple synthesis) form the important family of enzyme inhibitors acting as receptor agonists and antagonists.

Rather attractive among these compounds are  $\alpha$ -aminophosphonates owing to their well-known bioactivity. The explanation of the bioactivity was proposed in the concept of "transition-state analogs", which treated  $\alpha$ -aminophosphonates as structural analogues of intermediates in enzymatic hydrolysis and aminolysis reactions and other reactions of natural peptides. Herewith various bioactivity of  $\alpha$ -aminophosphonates will be considered.

The preparation of enantiopure  $\alpha$ -aminophosphonates has been of great interest because enantiomerism is essential feature of bioactive compounds. One of the ways to the  $\alpha$ -aminophosphonic acids derivatives is Pudovik reaction. In this report the use of this reaction in enantioselective synthesis of aminophosphonates is shortly shown and our own investigations in this field will be delivered. We have found several new and efficient ways of the synthesis of cyclic and acyclic aminophosphonic acids derivatives by the reaction of trivalent phosphorus compounds with  $\beta$ -aldiminoalcohols and iminocarbonic acids. In the case of chiral initial compounds most of these reactions proceed diastereoselectively that permits to obtain final products with very high diastereo- and enantiopurity. The essential way for increasing stereoselectivity of such reactions is the use of cyclisation as stereocontrolling steps.

*This work was supported by the Civilian Research and Development Foundation (grant no. RUC2-2638-KA-05) and the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 07-03-00617).*



## БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДА-ИММУНОМИМЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ КАНЦЕРОГЕНОВ

Апалько<sup>1</sup> С.В., Глушков<sup>1</sup> А.Н., Филипенко<sup>2</sup> М.Л., Матвеева<sup>2</sup> В.А., Храпов<sup>2</sup> Е.А., Костянко<sup>1,3</sup> М.В.

<sup>1</sup> Институт экологии человека СО РАН, Кемерово, Россия,  
e-mail: apalko@ngs.ru

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Несмотря на очевидные достижения в онкологии, рак остается одной из главных причин смертности в развитых странах. Поэтому проблема профилактики рака остается весьма актуальной. Ведущим фактором развития злокачественных опухолей в индустриально развитых странах является воздействие на человека химических канцерогенов. Наиболее опасными химическими канцерогенами являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Индикаторным веществом этой группы соединений признан бензо[а]пирен (БП).

При рассмотрении возможных подходов к иммунопрофилактике рака и других заболеваний, возникающих под действием химических канцерогенов, отмечалось, что наиболее подходящими кандидатами на роль вакцин против химических канцерогенов являются моноклональные антиидиотипические антитела (АТ). Они не содержат в своем составе канцерогенов и поэтому не способны индуцировать опухоль в месте введения. В то же время они несут в себе так называемый «внутренний иммунологический образ» канцерогена и поэтому способны индуцировать синтез соответствующих анти-канцерогенных АТ. В работах J.L. Chagnaud et al. показано, что моноклональные антиидиотипические АТ к БП тормозят появление и рост химически индуцированных опухолей у животных.

Для изучения возможности проведения активной иммунизации против ПАУ в ИЭЧ СО РАН совместно с ИХБФМ СО РАН была получена гибридома, секретирующая моноклональное АТ, специфичное к Вр (мАТ В2). Полиспецифические АТ (полиАТ) получены в результате иммунизации кроликов конъюгатом БП-БСА с последующей аффинной хроматографией на колонках с пришитым конъюгатом канцероген-гексокиназа.

Для получения пептида с иммунологическим образом БП была использована технология фагового дисплея, как наиболее эффективная в изучении белок-белковых взаимодействий и способная к обнаружению новых молекул. Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolabs) основана на комбинаторной библиотеке рандомного 12-мерного пептида, соединенного с минорным поверхностным белком (pIII) М13 фага.

Аффинное обогащение библиотеки специфическими клонами проводили на мАТ В2 и на полиАТ к БП с дополнительным перекрестом в 3 раунде. Тестирование популяции фагов после каждого раунда биопенинга и скрининг индивидуальных клонов по способности связываться с АТ проводили при помощи ИФА. Отобрали 5 положительных клонов. Полученные клоны подвергали прямому секвенированию на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems). Аминокислотная последовательность рекомбинантного пептида была идентична у всех полученных клонов. Идентичность последовательности рекомбинантного пептида в данном случае можно объяснить конформационной жесткостью структуры исходного эпитопа (низкомолекулярное органическое соединение – БП).

С помощью вестерн-блот-анализа исследовали связывание искомого пептида в составе pIII белка выделенного клона (рабочее название 2мм) с мАТ В2, полиАТ к БП, бензо[а]антрацену (БА), антрацену, хризену, пирену. Окрашивание выявило образование иммунных комплексов 2мм с мАТ В2 и полиАТ к БП, 2мм с полиАТ к БА. Не выявлено связывания белков исследуемых фагов с IgG интактных мыши и кролика, а так же с полиАТ к антрацену, хризену и пирену.

Для исследования полученного пептида на способность индуцировать образование антител против бензо[а]пирена *in vivo* нами был проведен пилотный эксперимент, в котором мышей иммунизировали: 1 - амплифицированным клоном фага 2мм, презентующим специфический пептид; 2 - диким фагом М13mp8 в качестве отрицательного контроля и 3 - конъюгатом БП-БСА в качестве положительного контроля. Через 3 недели после начала иммунизации был проведен анализ сыворотки крови на содержание специфических АТ к БП.

Выяснилось, что после иммунизации диким фагом М13mp8 АТ к БП не появляются. В то же время обнаружено наличие специфических АТ к БП в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатом БП-БСА и селектированным клоном фага 2мм. Положительные значения были получены лишь при низких разведениях сыворотки. Это можно объяснить недостаточным для полноценной иммунизации количеством антигена.

Таким образом, получен специфический пептид-иммуномиметик химического канцерогена, специфически взаимодействующий с АТ к БП и способный индуцировать образование АТ к БП после иммунизации *in vivo*.

Результаты настоящего исследования раскрывают новые подходы к получению антиканцерогенных вакцин пептидной природы, основанных на высокой конформационной гомологии с молекулами канцерогенов.



## **BIOTECHNOLOGY FOR GENERATION IMMUNOMIMETIC PEPTIDE OF CHEMICAL CARCINOGENS**

*Apalko<sup>1</sup> S.V., Glushkov<sup>1</sup> A.N., Filipenko<sup>2</sup> M.L., Matveeva<sup>2</sup> V.A., Khrapov<sup>2</sup> E.A., Kostyanko<sup>3</sup> M.V.*

<sup>1</sup>Institute of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Science, Kemerovo, Russia

e-mail: apalko@ngs.ru

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

The main etiological factor of cancer diseases is the influence of chemical carcinogens on humans. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are the most dangerous among chemical carcinogens known as factors in the development of oncological diseases. Benzo[a]pyrene (Bp) is recognized as an indicator for this group of compounds.

The more suitable candidates for the role of vaccines against the above group of compounds are the monoclonal anti-idiotypic Ab, which contain no carcinogens in their compositions and, at the same time, carry the so-called internal immunological image; therefore, they are capable to induce the synthesis of the corresponding anticarcinogenic Ab. Monoclonal anti-idiotypic Ab to Bp was also shown to slow the emergence and growth of chemically-induced tumors.

In this investigation the phage display method was applied to obtain a peptide that imitates Bp immunological properties.

Hybridomas producing monoclonal antibodies (mAb) B2 to benzo[a]pyrene were prepared. To obtain polyclonal Ab, rabbits were immunized with the Bp-BSA conjugate. Monospecific Ab from antisera against each of the PAHs were isolated using affinity chromatography on PAH-hexokinase-sepharose

In Ph.D-12™ Phage Display Peptide Library Kit (New England BioLabs) random peptides of 12 amino acid residues long are displayed on the M13 phage surface in the composition of the minor pIII protein. Affinity enrich of specific clones obtained by incubating the primary library with mono- and polyclonal Ab to Bp and crossmapping of Ab in the third round of biopanning. The recombinant bacteriophage populations obtained after each round of affinity selection, as well as the primary peptide phage library, were tested in ELISA for the ability to bind to mAb B2. As a result, five positive clones were revealed. The results of the DNA sequencing of these clones have shown that all five clones had identical amino acid sequences of the recombinant peptide. The identity of the recombinant peptide's sequence can be explained in this case by the high specificity of Ab used for biopanning and conformation rigidity of the primary epitope's structure (Bp is a low molecular compound).

Using Western-blot-analysis, the binding of the sought-after peptide within the pIII protein from the isolated 2mm clone to mAb B2 and monospecific polyclonal anti-PAH Ab was shown. This Abs was not reacted with the pIII protein of the wild-type M13mp8 phage. In addition, the monospecific polyclonal Ab against chrysene, pyrene, and anthracene did not react with the peptide 2mm under study. No binding of the proteins of the phages under study with IgG of intact mice and rabbit has been revealed.

ICR mice were immunized with selected phage clone for studying its immunogenicity. Mice were immunized with the following: 1. 2 mm amplified phage clone representing a specific peptide; 2. wildtype M13mp8 phage as a negative control; and 3. Bp-BSA conjugate as a positive control. It has been found that no Ab to Bp appears after immunization with the wild-type M13mp8 phage. On the contrary, specific Ab to Bp was found in the blood sera of the mice immunized with Bp-BSA conjugate and the selected 2mm phage clone.

Thus, we have obtained recombinant phage clones that express a Bp immunomimetic peptide. This results have revealed novel approaches for preparation of anticarcinogenic vaccines of a peptide nature, which are based on high-conformation homology with carcinogen molecules.



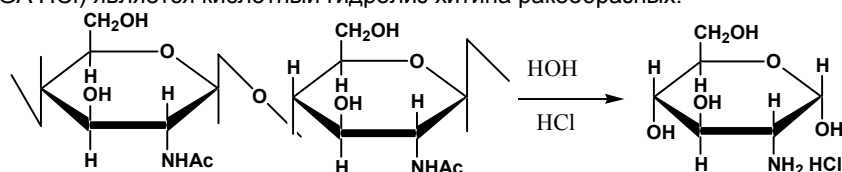
## ВЫСШИЕ ГРИБЫ – ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Артамонова С.Д., Шарнина Ф.Ф., Ившина Т.Н.

Марийский государственный университет, Марий Эл, Йошкар-Ола, Россия  
Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия  
e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Глюкозамин – природный аминсахар, синтезируемый человеческим организмом и содержащийся в некоторых продуктах питания. Он играет важную роль в формировании, сохранении и восстановлении суставных связок. Солянокислый D-глюкозамин является основной субстанцией лекарственных препаратов, используется для лечения артритов, артрозов, инфекционных и онкологических заболеваний, применяется в качестве иммуностимуляторов и компонентов пищевых добавок.

На сегодняшний день основным и единственным способом получения солянокислого D(+)-глюкозамина (DGA·HCl) является кислотный гидролиз хитина ракообразных:



Хитин-глюкановый комплекс (ХГК), получаемый из высших грибов, по своим показателям ни в чем не уступает хитину. Поэтому нами была предпринята попытка препаративного выделения DGA·HCl из ХГК высших грибов, которые являются более дешевым и доступным сырьем для данной цели.

На основе изучения процесса кислотного гидролиза хитина нами была разработана новая методика выделения DGA·HCl: нагревание хитина в течение 3,5–4 ч в концентрированной HCl при температуре 75–80 °С с последующим упариванием кислоты при 40 °С. Высаживание DGA·HCl проводилось сильно охлажденной концентрированной HCl. При этом выход целевого продукта составил 70 %. Затем по данной методике с учетом особенностей состава ХГК из гидролизата ХГК гриба вида *Armillariella mellea* препаративно был выделен DGA·HCl с выходом 50 % от ХГК. В качестве стандартных образцов сравнения применяли: DGA·HCl, фруктозу, D(+)-глюкозу и маннозу. Строение DGA·HCl гриба *A. mellea* подтверждено методом ИК-спектроскопии в сравнении с ИК-спектрами DGA·HCl хитина ракообразных и подмора пчел.

Показана возможность выделения DGA·HCl из высших грибов различного вида. В зависимости от вида, класса и формы плодового тела грибов выход конечного продукта лежит в пределах 20–60 %, что связано с различным содержанием хитина в ХГК.

Характеристики солянокислого D(+)-глюкозамина, полученного из различного хитинсодержащего сырья

образец	выход, %	T <sub>пл.</sub> , °С	[α <sub>D</sub> <sup>20</sup> ], ° в воде	основное вещество, %
DGA·HCl sp.	-	210-211	72.5	98.0
<i>Arthropoda</i>	68.5	209-210	72.5	97.8
<i>Cantharel. cibarius</i>	57.8	210	72.5	97.9
<i>Armillariel. mellea</i>	50.5	210	72.5	97.8
<i>Macrole. excoriate</i>	46.8	210-211	72.0	97.6
<i>Lactarius rufus</i>	42.4	210-211	72.5	97.5
<i>Amanita muscaria</i>	43.7	209-210	72.0	97.5
<i>Suillus bouinus</i>	40.3	210-212	72.0	97.2
<i>Morchel. esculenta</i>	23.8	209-210	72.5	97.9
<i>Apis Mellifera</i>	71.3	210	72.5	98.1



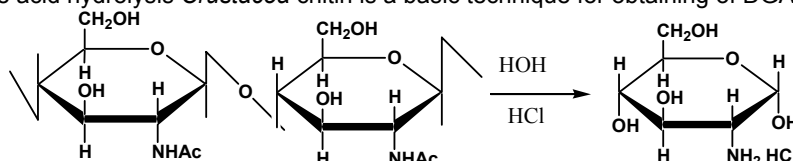
## HIGHER FUNGI – PERSPECTIVE RAW MATERIAL FOR THE SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Artamonova S.D., Sharnina F.F., Ivshina T.N.

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia  
Mari State University, Yoshar-Ola, Mari El, Russia  
e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Glucosamine is a natural sugar produced by the body and found in certain foods. It plays an important role in the production, maintenance, and repair of cartilage. *D*(+)-glucosamine hydrochlorid (DGA) is the main substance of drug. It is used for the therapy of arthritis, arthrosis, infectious and oncological diseases. In addition, DGA·HCl is employed as an immunostimulant and a component of food supplements.

At present, the acid hydrolysis *Crustacea* chitin is a basic technique for obtaining of DGA:



In all respects chitin-glucan complex (ChGC) isolated from higher fungus biomass is not worse than chitin. Therefore we made attempt the preparative obtaining DGA·HCl from ChGC of higher fungi.

A new modified technology for the isolation DGA·HCl from crab chitin have been development: heating of chitin in concentrated HCl at temperature 75-80 °C for 3.5–4 h following by evaporation of HCl at temperature 40 °C. The DGA·HCl was precipitated by strongly cooled concentrated HCl. At that, the base product yield was 70 %. Then, DGA·HCl from hydrolyzate of ChGC isolated from biomass of fungus *Armillariella mellea* using this method was obtained. Yield of DGA·HCl was estimated to be of 50 %. The DGA·HCl, fructose, glucose and mannose were used as a sample standard comparison. The structure of DGA·HCl was confirmed by comparison with DGA·HCl from *Arthropod* chitin and *Apis Mellifera* chitin with the use FTIR spectroscopy.

The isolation possibility of DGA·HCl from higher fungi biomass of different kind have been demonstration. The difference in the final product yield (20 %-60 %) according to the kind, class and shape of mycothallus, is caused by the different content of chitin in ChGC.

Characteristics of *D*-glucosamine hydrochloride obtained from different chitin-containing raw material

Sample	yield, %	T <sub>m</sub> , °C	[α <sub>D</sub> <sup>20</sup> ], ° in water	ground substance, %
DGA·HCl sp.	-	210-211	72.5	98.0
<i>Arthropoda</i>	68.5	209-210	72.5	97.8
<i>Cantharel. cibarius</i>	57.8	210	72.5	97.9
<i>Armillariel. mellea</i>	50.5	210	72.5	97.8
<i>Macrole. excoriate</i>	46.8	210-211	72.0	97.6
<i>Lactarius rufus</i>	42.4	210-211	72.5	97.5
<i>Amanita muscaria</i>	43.7	209-210	72.0	97.5
<i>Suillus bouinus</i>	40.3	210-212	72.0	97.2
<i>Morchel. esculenta</i>	23.8	209-210	72.5	97.9
<i>Apis Mellifera</i>	71.3	210	72.5	98.1



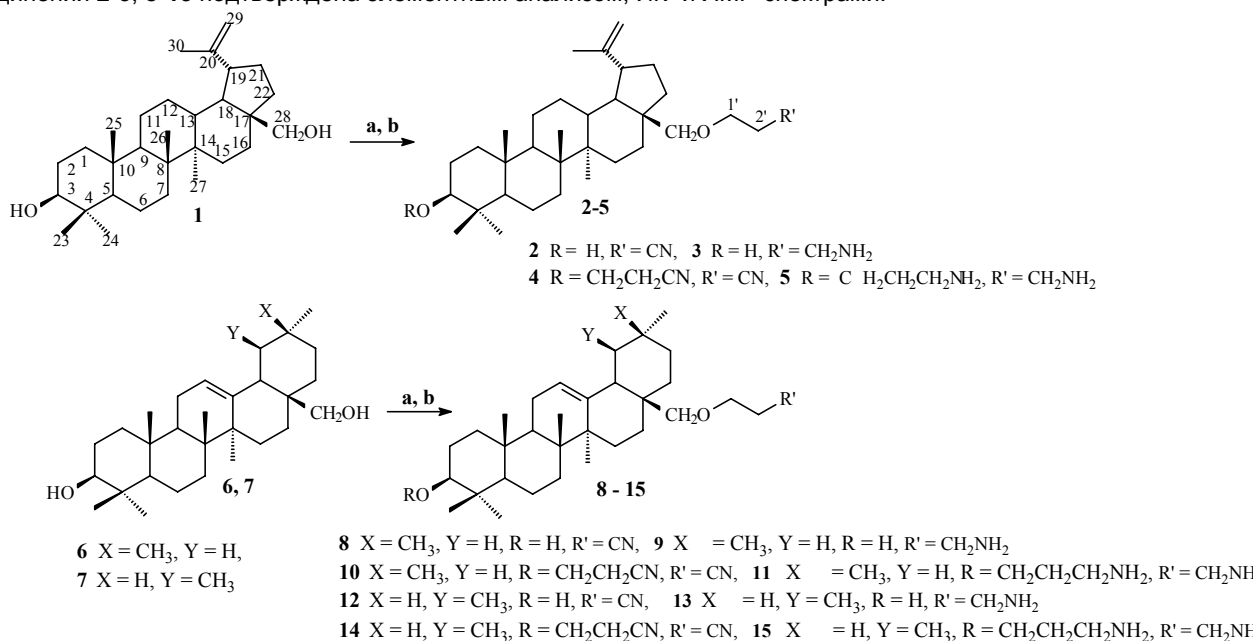
## СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ О-ПРОПИЛАМИНОПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА, ЭРИТРОДИОЛА И УВАОЛА

Байкова И. П., Гиниятуллина Г. В., Казакова О. Б., Спирихин Л. В., Толстиков Г. А.

УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия. e-mail: obf@anrb.ru

Производные хелевой кислоты, содержащие О-пропиламиноновые фрагменты в структуре стероида, снижают эффективную концентрацию в отношении грамположительных бактерий [1]. Актуальным является синтез О-пропиламинопроизводных тритерпеноидов в качестве перспективных антибактериальных соединений.

Цианэтилирование бетулина **1**, эритродиола **6** и уваола **7** привело к смеси моно- и ди-О-пропионитрилов **2, 4, 8, 10, 12, 14**, охарактеризованных в индивидуальном виде после хроматографической очистки. При каталитическом гидрогенолизе нитрилов были получены 3β-гидрокси-28-О-пропиламино- **3, 9, 13** и 3β-28-бис-О-пропиламино **5, 11, 15** с выходом 65-82%. Структура соединений **2-5, 8-15** подтверждена элементным анализом, ИК- и ЯМР-спектрами.



Условия: а. CH<sub>2</sub>CHCN, 1,4 - диоксан, 40% KOH, 36 ч; б. H<sub>2</sub>, Ni-Raney, MeOH, 16 ч, 100 атм

С использованием двумерной спектроскопии СН-корреляции проведено полное отнесение сигналов протонных и углеродных атомов. Из спектров CHCORR следует, что протоны CH<sub>2</sub>-1' и CH<sub>2</sub>-4' в спектрах соединений **2-5, 8-15** проявляются в виде мультиплета при  $\delta$  3.62-3.68 м.д., соответствующие им атомы углерода имеют химический сдвиг 65.9 м.д. и 64.1 м.д. Для сигналов атомов C28 в спектрах производных лупана **2-5** характерен химический сдвиг при 69.7 м.д., в то время как для олеанана и урсана **8-15** – при 78.0 м.д.

### Литература:

1. Schmidt E., Boswell J. S., Walsh J. P., Schellenberg M. M., Winter T. W., Li Ch., Allman G. W., Savage P. B. // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2001. Vol. 47. P. 671-674.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-03-00868).



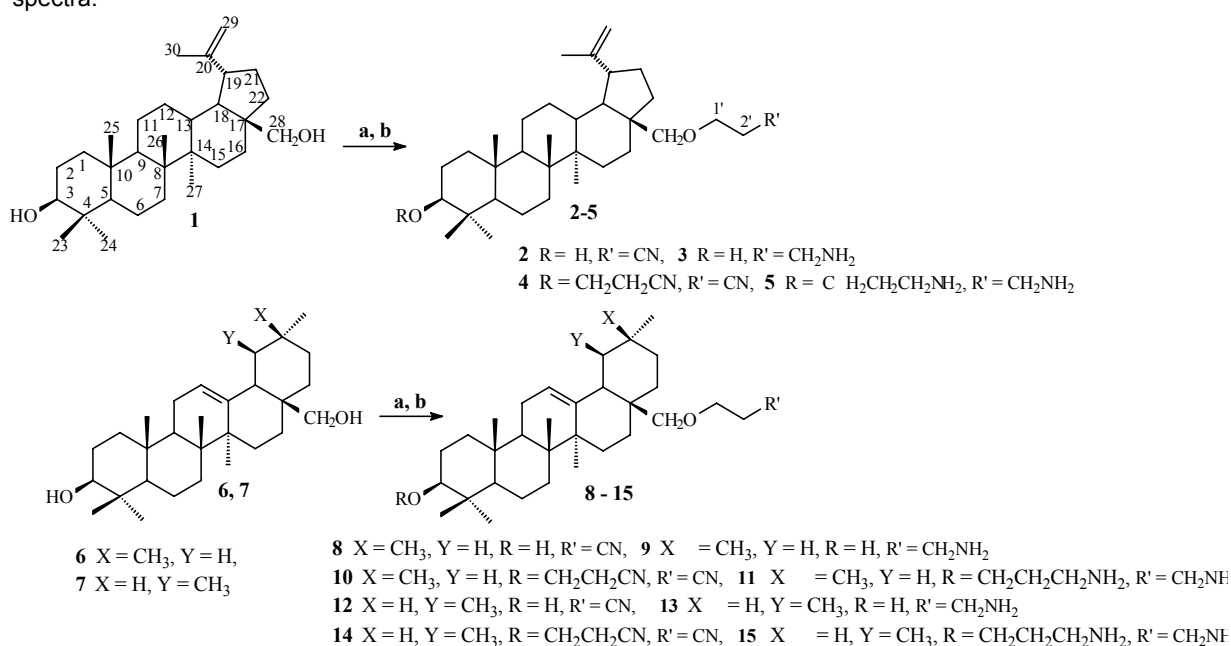
**SYNTHESIS AND STRUCTURE OF O-PROPYLAMINODERIVATIVES  
OF BETULIN, ERYTHRODIO AND UVAOL**

*Baykova I. P., Giniyatullina G. V., Kazakova O. B., Spirikhin L. V., Tolstikov G. A.*

Institute of Organic Chemistry Ufa Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation  
e-mail: obf@anrb.ru

Derivatives of cholic acid containing O-propylamine fragments in steroid structure decrease the effective concentration against gram-positive bacteria [1]. The synthesis of propylaminoderivatives of triterpenoids as prospective antibacterial compounds is actual.

The cyanoethylation of betulin **1**, erythrodiol **6** and uvaol **7** led to a mixture of mono- and di-O-propionitriles **2**, **4**, **8**, **10**, **12**, **14**, which were characterized individually after the chromatographic purification. The catalytic hydrogenolysis resulted in 3 $\beta$ -hydroxy-28-O-propylamines **3**, **9**, **13** and 3 $\beta$ -28-bis-O-propylamines **5**, **11**, **15** in the yield 65-82%. The structure of compounds **2-5**, **8-15** was confirmed by the elemental analysis, IR- and NMR-spectra.



Conditions: a. CH<sub>2</sub>CHCN, 1,4-dioxane, 40% KOH, 36 h; b. H<sub>2</sub>, Ni-Raney, MeOH, 16 h, 100 atm

Using CHCORR spectroscopy of CH-correlation the full assignment of signals of proton and carbon atoms was carried out. As follows from CHCORR spectra, protons CH<sub>2</sub>-1 and CH<sub>2</sub>-4 in spectra of compounds **2-5**, **8-15** became apparent as multiplet at 3.62-3.68 ppm, corresponding carbon atoms show the chemical shift 65.9 and 64.1 ppm. For the signals of C28 atoms in the spectra of lupane derivatives **2-5** a chemical shift at 69.7 ppm is characterized, whereas for oleanane and ursane **8-15** at 78.0 ppm.

**References:**

1. Schmidt E., Boswell J. S., Walsh J. P., Schellenberg M. M., Winter T. W., Li Ch., Allman G. W., Savage P. B. // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2001. Vol. 47. P. 671-674.

*This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 05-03-32832).*





## ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОЛОВ КАК ИНДИКАТОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

*Бельтюкова С.В., Бычкова А.А.*

Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, Украина.  
e-mail: bychkovaab@mail.ru

В последние годы появляется большой интерес к природным фенольным соединениям в пищевых продуктах и напитках, так как показано, что они обладают антисклеротическим и антиканцерогенным действием. Одна из основных причин опасных заболеваний и старения организма человека – это накопление свободных радикалов в биологических жидкостях человека. Природные фенольные соединения нейтрализуют действие свободных радикалов и тем самым защищают организм от заболеваний. Наиболее важные соединения этого типа – флавоноиды. Одним из ключевых свойств флавоноидов является их антиоксидантная активность, в т.ч. способность подавлять процессы перекисного окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и других соединений. Флавоноиды обладают капилляроукрепляющим, противовоспалительным, антиаллергическим, антибактериальным эффектами. Они оказывают спазмолитическое действие, в том числе на сосуды сердца и головного мозга, положительно влияют на обменные процессы в миокарде, обладают антиаритмическим действием. Для ряда флавоноидных соединений установлена антимикробная и противовирусная активность. Флавоноиды оказывают положительное влияние на метаболизм печени, усиливая желчеотделение и повышая детоксикационную функцию, некоторые обладают мочегонным действием. Большой интерес вызывают флавоноиды как перспективные противоопухолевые средства.

Среди биологически активных веществ ведущее место занимают полифенолы. Их биологическое действие связано с R – витаминной активностью флавоноидов, антимикробной – катехинов, а весь комплекс полифенолов обладает антилучевым, антистрессовым, антиоксидантным действием. Наиболее распространенными биоантиоксидантами ряда флавоноидов являются флавонолы кверцетин, рутин и морин.

Учитывая большой интерес к антиоксидантной активности, разработка методов экспресс-оценки АОА является весьма актуальной. Известные методы определения флавоноидов – это ВЭЖХ с электрохимическим, масс-спектрометрическим или УФ детектированием, или хемилюминесцентное определение.

Нами разработаны простые методики определения кверцетина, рутина и морина основанные на использовании собственной люминесценции этих препаратов, усиленной в присутствии ионов соответствующих лантанидов (III): иттрия (III), скандия (III). Изучены оптимальные условия комплексообразования флавоноидов с ионами лантанида. При комплексообразовании с ионами РЗЭ (III) интенсивность люминесценции кверцетина, рутина и морина возрастает за счет того, что возрастает жесткость молекулы и уменьшаются внутримолекулярные потери энергии возбуждения. Интенсивность люминесценции комплексов кверцетина с ионами иттрия (III) и морина с ионами скандия (III) сохраняется на сорбентах и комплекса рутина с ионами иттрия (III) увеличивается на сорбентах. Экспериментально были выбраны сорбенты, на которых I люм. кверцетина, рутина и морина наибольшая. Для этого исследована сорбция комплексов на различных сорбентах: пенополиуретане, цеолитах (CaA, NaA), фосфате алюминия, силикагеле, Sephadex G-50, G-75, G-150. Максимальная интенсивность люминесценции комплекса кверцетина наблюдается на силикагеле и фосфате алюминия, иммобилизованном ионами иттрия (III), а максимальная I люм. комплексов рутина и морина наблюдается на Sephadex G-75 и Sephadex G-150. Подобраны оптимальные условия сорбции. Установлены зависимости интенсивности люминесценции комплексов от концентрации лиганда, ионов соответствующего металла (III). Рассмотрено влияние растворителя, поверхностно-активных веществ на люминесцентные характеристики комплекса. Максимальная интенсивность люминесценции комплекса кверцетина наблюдается при pH=4,5, при pH=6,4 – рутина и при pH=4,1 – морина. Интенсивность люминесценции сорбата кверцетина возрастает в присутствии анионного поверхностно-активного вещества – лаурилсульфата натрия и донорно-активного вещества – триоктилфосфинооксида. Значительно усиливается I люм. сорбата рутина при введении альбумина. Снизить предел обнаружения рутина и морина можно, используя в качестве усиливающего реагента бычий сывороточный альбумин, в присутствии которого I люм. комплексов возрастает в 2-4 раза.

На основании полученных результатов разработана методика тест-определения кверцетина, рутина и морина в экстрактах, настоях лекарственных растений, растительном сырье. Так определено содержание кверцетина в экстракте шелухи лука, шишках хмеля, в настоях прополиса, боярышника, эвкалипта и календулы, а так же содержание морина в листьях шелковицы, цветах липы, чабреце, листьях зверобоя. Установлено, что наибольшим содержанием рутина характеризуется настойка из цветков бузины.



## LUMINESCENT DEFINITION OF FLAVONOIDS AS INDICATOR COMPONENTS OF VEGETATIVE MEDICINAL RAW MATERIALS

*Beltyukova S.V., Bytchkova A.A.*

Odessa national academy of food technology, Odessa, Ukraine  
e-mail: bychkovaab@mail.ru

Last years there is a great interest to natural phenolic compounds in foodstuff and drinks as it is shown that they possess antisclerotic and anticancerogenic action. One of principal causes of dangerous diseases and human body ageing is an accumulation of free radicals in biological liquids of the person. Natural phenolic compounds will neutralise action of free radicals and by that protect an organism from diseases. The most important compounds of this type – the flavonoids. One of key properties of the flavonoids is them antioxidant activity, including ability to suppress processes of lipid's oxidations, fibers, nucleinic acids and other compounds. The flavonoids possess anti-inflammatory, antiallergenic, antibacterial effects. They render spasmolytic action, including on heart and brain vessels, positively influence exchange processes in a myocardium, possess antiaritmia action. For a number of the flavonoids it is established antimicrobial and antiviral activity. Flavonoids make positive impact on a liver metabolism, strengthening the branch of bile and raising the function of detoxication, some possess diuretic action. Great interests cause the flavonoids as perspective antitumour means.

Among biologically active substances the leading place is occupied with polyphenols. Their biological action is connected with P – vitamin activity of flavonoids, antimicrobial – catechins, and all complex of polyphenols possesses antitumour, antistressful, antioxidant action. The most widespread bioantioxidants of a number flavonoids are the flavonols quercetin, rutin and morin.

Considering a great interest to antioxidant activity, working out of methods of express estimation AOA is rather actual. Known methods of flavonoids definition are HPLC with electrochemical, mass spectrometer either UV detecting, or chemiluminescent definition.

We develop simple techniques of definition of quercetin, rutin and morin based on use of own luminescence of these preparations increased in the presence of ions corresponding lanthanides (III): itrium (III), scandium (III). Optimum conditions the complex formation of flavonoids with ions of lanthanides are studied. At the complex formation with ions REE (rare earth elements) intensity of a luminescence of quercetin, rutin and morin increases because rigidity of a molecule increases and intramolecular losses of energy of excitation decrease. Intensity of a luminescence of complexes of quercetin with ions itrium (III) and morin with ions of scandium (III) remains on sorbents and a complex the rutin with ions itrium (III) increases on sorbents. Sorbents, on which intensity of a luminescent of quercetin, rutin and morin the greatest have experimentally been chosen. It is for this purpose investigated sorption complexes on various sorbents: penopoliretan, zeolites (SaA, NaA), aluminum phosphate, silicagel, Sephadex G-50, G-75, G-150. The maximum intensity of a luminescence of a complex of quercetin is observed on silicagel and aluminum phosphate, which were immobilized by ions itrium (III), and maximum intensity of a luminescent complexes of the rutin and morin is observed on Sephadex G-75 and Sephadex G-150. Optimum conditions of a sorption are picked up. Dependences of intensity of a luminescence of complexes on concentration ligand, ions of corresponding metal (III) are established. Influence of solvent, surface-active substances on luminescent characteristics of a complex is considered. The maximum intensity of a luminescence of a complex of quercetin is observed at pH=4,5, at pH=6,4 for rutin and at pH=4,1 for morin. Intensity of a luminescence the sorbat of quercetin increases in presence anionic surface-active substance – sodium dodecil sulfate (SDS) and donor-active substance – trioctylphosphin oxide (TOPO).

Considerably amplifies intensity of a luminescence of a sorbat of rutin at introduction albumin. To lower a limit of detection rutin and morin it is possible, using as a strengthening reagent bovine serum albumin, at which presence intensity of a luminescence of the complexes increases in 2-4 times.

On the basis of the received results the test definition technique of quercetin, rutin and morin in extracts, an infusion of herbs, vegetative raw materials is developed. So the content of quercetin in an extract of a peel of onions, hop cones, in infusions of propolis, a hawthorn and calendulas, and as the content of morin in mulberry leaves, leaves of a linden is defined. It is established that the rutin is characterised by the greatest content tincture from flowers an elder.



## О НЕКОТОРЫХ АСПЕКТАХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСТРАКТАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Богушевич С.Е., Матвейчук С.В.

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, г. Минск  
e-mail: bse@ifoch.bas-net.by; msv@ifoch.bas-net.by

Одной из наиболее важных характеристик биологической активности растительных препаратов, широко используемых в фармацевтической и пищевой промышленности, является их антиоксидантная активность. Антиоксиданты, способные тормозить цепные процессы свободно-радикального окисления, играют важную роль в организме человека, защищая его от воздействия различных физических и химических факторов, оказывая влияние на патологические состояния, связанные со свободно-радикальной этиологией (воспалительные, онкологические, атеросклероз). Среди антиоксидантов растительного происхождения выделяются флавоноиды – класс полифенольных соединений, имеющих в составе молекул бензопирановый гетероцикл и гидроксильные группы с подвижным атомом водорода. В цепных реакциях окисления происходит его перенос к свободным радикалам с превращением их в стабильные молекулы и может сопровождаться образованием парамагнитных продуктов. Исследование парамагнитных свойств растительных экстрактов предоставляет важную информацию о механизме химических превращений содержащихся в них полифенольных соединений, об условиях образования парамагнитных центров (ПМЦ), что необходимо для предсказания биохимического действия разрабатываемых лекарственных препаратов.

Методом ЭПР исследованы исходные образцы коры дуба, шелухи репчатого лука, толокнянки и их сухие экстракты, полученные из неполярного (хлороформ) и полярных (вода, этанол, водно-этанольные смеси) растворителей. В исходном растительном сырье в порядке убывания – шелуха репчатого лука > кора дуба > толокнянка – обнаружены ПМЦ, характеризующиеся псевдоизотропным сигналом ЭПР с шириной линии  $\Delta H = 0,6$  мТ и  $g$ -фактором  $g(iso) = 2,0050$ , отнесенные к семихинонным радикалам (СР). Показано, что последние переходят в перечисленные экстракты с малыми изменениями спектральных параметров ( $g(iso) = 2,0046$ ;  $\Delta H = 0,5-1,0$  мТ). Концентрация их, определяемая по относительной интенсивности  $I_{отн}$  данного сигнала ЭПР, зависит от условий экстрагирования. Результаты приведены в таблице и свидетельствуют о преимущественной способности воды извлекать из растений СР:

Растительное сырье	$I_{отн}$ в сырье	$I_{отн}$ в экстрактах		
		из воды	из этанола	из хлороформа
Кора дуба	50	27	16	14
Луковая шелуха	96	19	10	9
Толокнянка	19	12	8	8

При использовании в качестве экстрагента водно-этанольные смеси в полученных сухих экстрактах также регистрируется возрастание содержания ПМЦ при увеличении в смесях массовой доли воды. Более того, при хранении водных экстрактов в виде растворов количество СР по сравнению со свежеприготовленными резко возрастает. Например, для луковой шелухи через 3 недели оно увеличивается в 5 раз, через 5 недель – почти в 30. С течением времени СР продолжают накапливаться и в ее высушенных водных экстрактах, увеличиваясь в ~1,5 раза за 60 суток выдерживания на воздухе при 20°C. В то же время их концентрация в спиртовом экстракте практически не изменяется. Кроме того, на примере извлечений луковой шелухи водно-этанольными смесями с содержанием спирта более 45 масс. % установлено, что число СР в свежеприготовленных сухих экстрактах зависит от условий удаления растворителя. Она уменьшается более чем в 2,5 раза в ряду следующих способов высушивания экстракта: водяная баня (~100°C) ≥ комнатная температура > сушильный шкаф (~60°C) > роторный испаритель (50°C). Баланс между количеством СР в исходном растительном сырье и суммарным их количеством в отработанном материале и полученном сухом экстракте сохраняется в двух последних случаях. При 100°C число наблюдаемых СР как минимум в 2 раза выше и мало зависит от соотношения вода-этанол в применяемом экстрагенте. Рост количества СР в ходе высушивания при 20°C также связан с постепенным увеличением массовой доли воды в растворе. Высказана точка зрения о подверженности полифенольных соединений растительных экстрактов окислительным превращениям, продуктом которых являются СР. Количество последних можно представить мерой интенсивности их протекания. Определен уровень стабильности СР. По данным ЭПР, при 20°C они достаточно устойчивы. Отжиг наблюдается выше 40°C и сопровождается появлением на плече соответствующей им спектральной линии нового сигнала с  $g(iso) = 2,0040$ , обусловленного формирующейся конденсированной углеродной системой. Интенсивность его быстро растет, и в окрестности 80°C он уже полностью перекрывает сигнал от СР. Эти явления необходимо учитывать при разработке методик получения растительных экстрактов.

Таким образом, накопление СР в растительных экстрактах свидетельствует об уменьшении концентрации полифенольных соединений и может являться качественной характеристикой степени сохранности экстрактов.



**ON SOME ASPECTS OF THE TRANSFORMATIONS POLYPHENOLIC COMPOUNDS  
IN THE OFFICIAL PLANTS EXTRACTS**

*Bogushevich S.E., Matveichuk S.V.*

Institute of Physical-Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
e-mail: bse@ifoch.bas-net.by; msv@ifoch.bas-net.by

Official products are widely used in pharmaceutical and food industries. Antioxidative activity is one of the most important characteristics of their biological activity. Antioxidants are able to inhibit chain processes of free-radical oxidation and plays an important role in the human body. They protect him from exposure to various physical and chemical factors that influence the pathological condition associated with free-radical etiology (inflammation, cancer, atherosclerosis). Flavonoids are allocated among the antioxidants of the officinal origin. This is a class of polyphenolic compounds, which are composed of benzopyran heterocycle and hydroxyl groups with mobile hydrogen atom. His transfer comes to the free radicals that are transformed into stable molecules in the chain reaction of oxidation. A paramagnetic products can also be formed. The study of paramagnetic properties of officinal plants extracts provides important information about the mechanism of chemical transformations of polyphenolic compounds, the conditions of formation of paramagnetic centers (PMC). It is necessary to predict the biochemical actions of officinal plants.

Initial samples of the oak bark, large onion-skin, bearberry and its dry extracts studied by means of ESR. Samples are obtained from nonpolar (chloroform) and polar (water, ethanol, water-ethanol mixtures) solvents. The concentrations PMC in the original plant materials are decreased in number of large onion-skin > bark oak > bearberry. Their pseudoisotropic ESR signal is equals to line width  $\Delta H=0.6$  mT and g-factor  $g(\text{iso})=2,0050$  and assigned to semiquinone radicals (RS). Its shown that the RS going over in listed extracts with small changes of spectral parameters ( $g(\text{iso})=2,0046$ ,  $\Delta H=0,5-1,0$  mT). Their concentration is defined by the relative intensity  $I_{\text{rel}}$  of the ESR signal depends on the conditions of extraction. The results are shown in the table and point out the superior ability of the water to extract RS from the plants:

Plants raw materials	$I_{\text{rel}}$ in the raw materials	$I_{\text{rel}}$ in the extracts		
		from water	from ethanol	from chloroform
Oak bark	50	27	16	14
Large onion-skin	96	19	10	9
Bearberry	19	12	8	8

In the obtained dry extracts the content of PMC also increases with an increase in water-ethanol mixtures of mass fraction of water. Moreover, the amount of CP increased sharply compared with the fresh-prepared on storage of water extracts in the form of solutions. For example, it increases to large onion-skin is 5 times in 3 weeks, almost 30 - in 5 weeks. Over time, the RS continues to be accumulated in the its dried water extracts: in the ~ 1.5-fold in 60 days (air, 20°C). At the same time, their concentration does not change practically in alcohol extracts. It was founded, that the number of RS depends on the conditions remove solvent. It decreases by more than 2.5 times using the following methods: water bath (~100°C) ≥ room temperature > oven (~ 60°C) > rotary evaporator (50°C). The balance between the number of RS in the original plant raw materials and their total number of waste materials and received the dry extract is stored in two recent cases. This is shown by the example of fresh-cooked large onion-skin extracts prepared with the help of water-ethanol mixtures (ethanol > 45 wt.%). The number of observed RS in ~ 2-fold higher in 100°C, and little depends on the ratio of water-ethanol in the extractant. The growth of the amount RS is also links to the gradual increase of the mass fraction of water in the solution during drying at 20°C. Point of view expressed on the susceptibility of the polyphenolic compounds of the plant extracts to oxidative transformations. RS is their products and offered a measure of intensity of their course. The level of stability of the RS is determined. ESR data show that they are stable at 20°C. The annealing occurs > 40°C, and accompanied by the appearance on the shoulder of the corresponding spectral line of new signal with  $g(\text{iso})=2,0040$ , which is due to the emerging system of condensed carbon. Its intensity increases rapidly. It exceeds the signal from the RS is fully about 80°C. These phenomena should be taken into account when developing methods of obtaining plant extracts.

Thus, the accumulation of RS gives evidence about of decrease concentration of the polyphenolic compounds in plant extracts and may be the quality of the extracts preservation state.



## СПЕКТРАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АДДУКТОВ В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРИЛАМИДА С ИНКОРПОРИРОВАННЫМ ГИДРОКСИАПАТИТОМ

*Болдескул<sup>1</sup> И.Е., Самченко<sup>2</sup> Ю.М., Суходуб<sup>3</sup> Л.Б.*

<sup>1</sup>Институт прикладной физики Национальной академии наук Украины, Сумы, Украина  
e-mail: boldeskul@voliacable.com

<sup>2</sup>Институт биокolloидной химии им.Ф.Д.Овчаренко Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт микробиологии и иммунологии им.И.И.Мечникова Академии медицинских наук Украины, Харьков, Украина

Ранее было показано, что колебательная спектроскопия является достаточно информативным аналитическим методом контроля процесса синтеза и диагностики гомо- и сополимерных матриц медицинского назначения, пребывающих в различных консистентных состояниях.

Процессы полимеризации (сшивки) в гидрогелевых матрицах отчетливо проявляются в их ИК-спектрах в сравнении с исходными мономерами, прежде всего в области "отпечатков пальцев" функциональных групп 1500-500 см<sup>-1</sup> [1].

Целью настоящего исследования является спектральный анализ гидрогелевых матриц, содержащих гидроксиапатит, инкорпорированный в их поровое пространство посредством золь-гель синтеза.

Спектральная идентификация образующихся ортофосфатных фаз проводилась методами ИК- и КРС-спектроскопии в области характерных частот фосфатных групп и была подтверждена рентгенофазовым анализом. В порах гидрогелевых матриц образуется преимущественно наноаморфный гидроксиапатит, иногда с примесью брусита или монентита. При этом показано, что колебательная спектроскопия, включая метод МНПВО, представляется более чувствительной для целей экспресс-диагностики, что особенно важно для материалов медицинского назначения.

Отдельно рассмотрены эффекты гидратации и роль межмолекулярных водородных связей, образуемых активными центрами инкорпорированных ортофосфатов и гидроксиапатита, в частности, и терминальными функциональными группировками порового пространства с участием молекул воды в качестве мостиков с водородной связью.

Кластеры ортофосфатов и молекулы воды в связанном состоянии локализованы в порах размером 20-50 нм, при этом состояние "структурированной" воды в кластерах может несколько изменяться, на что указывает варьирование химического сдвига в спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР)  $\delta(\text{OH})=2.0\div 2.2$  мд.

### **Литература:**

1. Ю.М.Самченко, И.Е.Болдескул, Л.Б.Суходуб, С.Н.Данильченко, Л.И.Береза, З.Р.Ульберг Синтез и спектральная идентификация гидрогелевых нанокomпозитов для протезирования костной ткани. Наноструктурное материаловедение. 2009. № 1, С.81-88



## **SPECTRAL IDENTIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDUCTS IN HYDROGEL MATRIX SYNTHESIS BASED ON ACRYLAMIDE WITH INCORPORATED HYDROXYAPATITE**

*Boldeskul<sup>1</sup> I., Samchenko<sup>2</sup> Yu., Sukhodub<sup>1,3</sup> L.*

<sup>1</sup>Institute of Applied Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine.

e-mail: boldeskul@voliacable.com

<sup>2</sup>Institute of Biocolloidal Chemistry named after F.D.Ovcharenko, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>I.I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Vibrational spectroscopy was earlier shown to be rather informative analytical technique to control synthesis and diagnostics of homo- and copolymeric matrices various consistency states used for medical purposes [1].

Polymerization processes in hydrogel matrices are clearly seen in their vibrational spectra compared to initial monomers, first of all in the "finger prints" region of functional groups i.e.1500-500 cm<sup>-1</sup>

The objective of the present study is spectral analysis of hydrogel matrices containing hydroxyapatite incorporated in matrix pores using zol-gel synthesis. In hydrogel matrix pores nanoamorphous hydroxyapatite was mostly formed, sometimes with brushite or monetite traces.

Orthophosphate phases spectral definition was made by IR- and Raman spectroscopy in the interval of phosphate group characteristic frequencies and proved by X-Ray phase analysis. Additionally, vibrational spectroscopy, ATR including, seems to be more sensitive for the purposes of express diagnostics, the fact being very important for medical material analysis.

Hydration effects and role of intermolecular hydrogen bonds (H-Bonds) formed in the particular by the active centers of orthophosphates and hydroxyapatite as well as by terminal functional groups of porous space with water molecules acting as bridges with H-Bond were also studied.

Clusters of orthophosphates and water molecules in the bound state are localized in the 20-

50 nm. pores and the state of structured water in clusters can somewhat change indicating chemical shift variation in spectra of proton magnetic resonance  $\delta(\text{OH})=2.0\div 2.2$  ppm.

The results receiving are in good agreement with the investigations of X-Ray phase diffraction and <sup>31</sup>P NMR MAS spectroscopy.

### **References:**

1. Yu.M.Samchenko, I.E.Boldeskul, L.B.Sukhodub, S.N.Danilchenko, J.J.Bereza, Z.R.Ulberg Synthesis and spectral identification of hydrogel nanocomposites for bone tissue implant. Nanostructural Materials Study, 2009, №1, pp.81-88



## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ 3-АРИЛКУМАРИНОВ

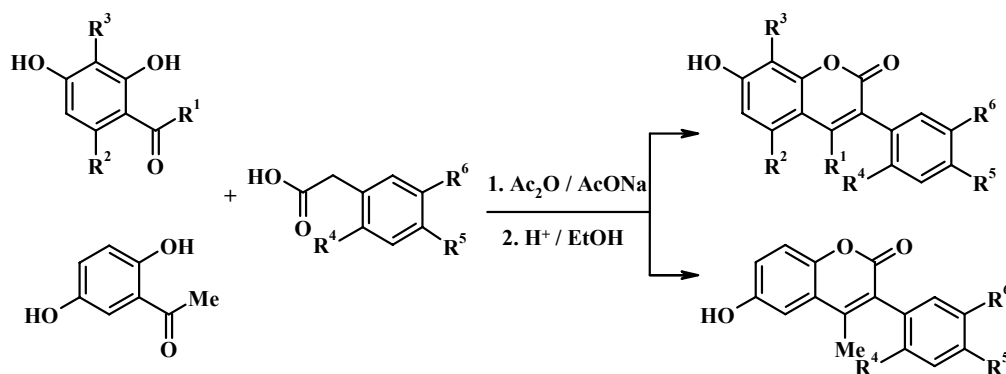
Бондаренко С.П.<sup>1</sup>, Фрасинюк М.С.<sup>1</sup>, Хиля В.П.<sup>1</sup>, Шарабура Л.Б.<sup>2</sup>, Безверха И.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина, Киев, Украина  
e-mail: mfras@i.kiev.ua

<sup>2</sup>ГУ "Институт геронтологии АМН Украины, Киев, Украина"

Кумарины, широко представленные среди природных соединений растительного происхождения, чаще всего встречаются в гидроксированной, метоксилированной и гликозилированной формах и, как известно, обладают широким спектром фармакологического действия.

Синтез аналогов природных 3-арилкумаринов был осуществлен в условиях реакции Перкина конденсацией замещенных фенилуксусных кислот с 2,4-дигидроксибензальдегидом, а также 2,4-дигидрокси- и 2,5-дигидроксиацетофенонами в уксусном ангидриде в присутствии ацетата калия с последующей переэтерификацией 7-ацетокси-3-арилкумаринов в этиловом спирте в присутствии серной кислоты. Подбор оптимальных условий конденсации дал возможность получить 6- и 7-гидрокси-3-арилкумарины с электронодонорными группами в кольце В.



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H, Me; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> = H, OMe

Для дифференцирования вида фармакологической активности проведено общепармакологические исследования некоторых синтезированных 3-арилкумаринов на лабораторных мышах и крысах. Все вещества вводили перорально однократно в дозе 1/10 ЛД<sub>50</sub>.

В результате первичного фармакологического скрининга установлено, что некоторые 3-арилкумарины, метоксилированные по кольцу В, обладают желчегонным действием, соизмеримым с действием препарата аллохола, а также проявляют прокоагулянтную и гипохолестеринемическую активность.



### SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NATURAL ANALOGUES OF 3-ARYLCOUMARINES

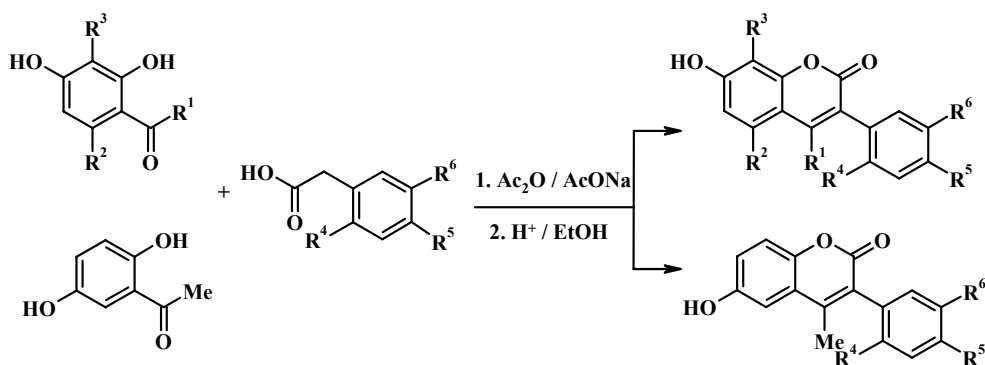
Bondarenko S.P.<sup>1</sup>, Frasinuk M.C.<sup>1</sup>, Khilya V.P.<sup>1</sup>, Sharabura L.B.<sup>2</sup>, Bezverha I.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: mfras@i.kiev.ua

<sup>2</sup>GE "Institute of gerontology AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

Coumarines, widely presented among natural compounds of phytochemistry, more often could be found in hydroxylated, methoxylated and glycosylated forms and, as it is known, possess a wide spectrum of pharmacological action.

Synthesis of analogues of natural 3-arylcoumarines has been carried out in conditions of the Perkin's reaction of substituted phenylacetic acids condensation with 2,4-dihydroxybenzaldehyde, and also 2,4-dihydroxy- and 2,5-dihydroxyacetophenones in acetic anhydride in the presence of potassium acetate with the subsequent trans-esterification of 7-acethoxy-3-arylcoumarines in ethyl alcohol in the presence of sulfuric acid. Development of optimum conditions for the condensation has enabled one to synthesize 6- and 7-hydroxy-3-arylcoumarines with electron-donative groups in the ring B.

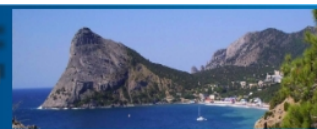


R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H, Me; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> = H, OMe

General pharmacological investigations of several synthesized 3-arylcoumarines on laboratory mice and rats have been performed for differentiation of pharmacological activity. All compounds were entered per oral at once in a dose of 1/10 LD<sub>50</sub>.

As a result of the primary pharmacological screening, it was found that some 3-arylcoumarines methoxylated on the ring B possess cholagogue action, commensurable with the action of alcohol, and also show procoagulant and hypocholesteremic activity.





## **СПОНТАННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ: СТАРЫЙ ТРЮК ПРИРОДЫ С БЛЕСТЯЩИМИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПЕРСПЕКТИВАМИ**

*Бредихин А.А., Бредихина З.А.*

Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова  
Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия  
e-mail: baa@iopc.knc.ru

Спонтанное расщепление соли виноградной кислоты (1848, Pasteur) положило начало современной стереохимии, но и до настоящего времени природа спонтанного расщепления остается в большой степени загадочной. Среди многих причин, делающих исследование спонтанного расщепления увлекательным занятием, достаточно упомянуть только две. Во-первых, очень может быть, что именно спонтанное расщепление биологически активных соединений непосредственно связано с происхождением гомохиральности жизни. Во-вторых, прямые методы получения чистых энантиомеров, основанные на явлении спонтанного расщепления, являются естественным пределом эффективности расщепления рацематов.

Главной задачей данного сообщения является знакомство широкой аудитории связанных с биоактивными соединениями химиков, биохимиков и технологов с этим феноменом. В процессе знакомства вводятся основные определения, упоминаются исторические вехи, говорится о физических причинах и о способах идентификации спонтанного расщепления. Приводятся примеры биологически активных соединений, склонных к спонтанному расщеплению.

Заключительная часть сообщения посвящена описанию разделения энантиомеров методом вовлечения – наиболее технологически разработанному способу использования явления спонтанного расщепления в практических целях.

*Работа поддержана грантом 09-03-00308-а Российского фонда фундаментальных исследований.*



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### SPONTANEOUS RESOLUTION: AN ALD NATURE' TRICK WITH BRILLIANT TECHNOLOGY PERSPECTIVES

*Bredikhin A.A., Bredikhina Z.A.*

A.E. Arbusov Institute of Organic and Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation.  
e-mail: baa@iopc.knc.ru

The spontaneous resolution of the tartaric acid salt (1848, Pasteur) has led to foundation of the modern science of stereochemistry, but up to now the nature of spontaneous resolution remains something of an enigma. Among numerous reasons turning the understanding of the spontaneous resolution into a fascinating problem, two only will suffice to mention: a spontaneous resolution among bioactive compounds could be related to the problem of life homochirality origin, and the direct methods for production of single enantiomers based on this phenomenon refer to natural limits of resolution effectiveness.

The main goal of this presentation consists with an introduction of this phenomenon to the broad audience of bimolecular chemists, biochemists, and manufacturing planners. This introduction will include the main definitions, historic milestones, physical reasons, the methods of identification, and examples of real bioactive compounds prone to spontaneous resolution.

The postamble of the presentation is devoted to racemate resolution through entrainment procedure. Resolution by entrainment is the most technology-enhanced enantiomer separation process based upon spontaneous resolution phenomenon.

*The work was supported by the Russian Fund of Basic Research (grant no. 09-03-00308-a).*



## ПОЛУЧЕНИЕ ЭНАНТИОЧИСТЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ПОМОЩЬЮ СПОНТАННОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ НА ЭНАНТИОМЕРЫ ПРИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Бредихина З.А., Новикова В.Г., Пашагин А.В., Ахатова Ф.С., Бредихин А.А.

Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: zemfira@iopc.knc.ru

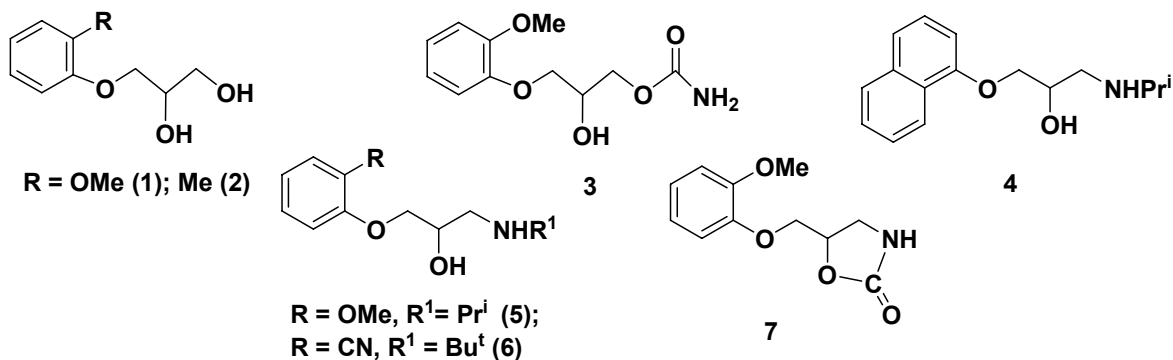
Для целого семейства бета-адреноблокаторов показано, что (*S*)-энантиомеры являются эутомерной компонентой рацемического лекарства, тогда как (*R*)-энантиомеры (дистомеры) обычно проявляют другую (часто нежелательную) активность<sup>1</sup>. Имеются данные, что в случае метокарбамола один энантиомер более активен *in vivo*, чем другой или рацемат<sup>2</sup>.

Принимая во внимание современную тенденцию замены рацемических лекарственных средств на энантиоочищенные, для разработки прямых подходов к обеим энантиомерным формам хиральных биоактивных соединений оказывается необходимым точное знание их фазовых характеристик. Энантиоочищенные лекарственные средства медленно, но уверенно вытесняют с фармацевтического рынка не только рацемические, но и ахиральные лекарства. В связи с этим разработка новых эффективных, легко масштабируемых методов получения нерацемических веществ представляется чрезвычайно важной задачей.

Разделение энантиомеров при кристаллизации рацематов с образованием так называемого *рацемического конгломерата*, то есть механической смеси кристаллов, составленных из энантиоочищенных молекул противоположной конфигурации, известно как *спонтанное разделение*. Основанные на этом явлении прямые методы получения отдельных энантиомеров из их рацемата (расщепление рацемата), например, разделение вовлечением, являются естественным пределом эффективности расщепления, поскольку не требуют специальных энантиоочищенных вспомогательных веществ и дорогостоящего оборудования. Спонтанное разделение может быть использовано как для непосредственного получения энантиоочищенного целевого продукта, так и с целью использовать вновь полученное энантиоочищенное вещество в качестве исходного для получения других энантиоочищенных лекарственных средств.

В данном сообщении мы приводим новые экспериментальные данные об использовании различных подходов, основанных на спонтанном разделении, для получения зарегистрированных лекарственных средств, таких как экспекторант *гвайфенезин* (1), мышечные релаксанты мефенезин (2) и метокарбамола (3), β-адреноблокаторы пропранолол (4) и левомпролол (5), транквилизатор мефеноксалон (7) в энантиоочищенном виде.

### Некоторые энантиоочищенные лекарственные средства, полученные с применением спонтанного разделения на энантиомеры при кристаллизации



Работа выполняется при содействии РФФИ (№ гранта 09-03-00308-а).

#### Литература:

- Mehvar, R.; Brocks, D. R. J. Pharm. Pharm. Sci. 2001, 4, 185-200; For the special case of moprolool see: Harvengt, C.; Desager, J. P. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1982, 20, 57-61; 2. Merlo, L.; Brusoni, B.; Mussini, E.; Ghirardi, P. Boll. Soc. Ital. Cardiol. 1980, 25, 955-961; 3. Ferrari, G.; Vecchietti, V. US Pat. 4 683 245, 1987.
- Souri, E.; Sharifzadeh, M.; Farsam, H.; Gharavi, N. J. Pharm. Pharmacol. 1999, 51, 853-855.



## SINGLE ENANTIOMER CHIRAL DRUGS OBTAINED BY MEANS OF SPONTANEOUS RESOLUTION

Bredikhina Z.A., Novikova V.G., Pashagin A.V., Akhatova F.S., Bredikhin A.A.

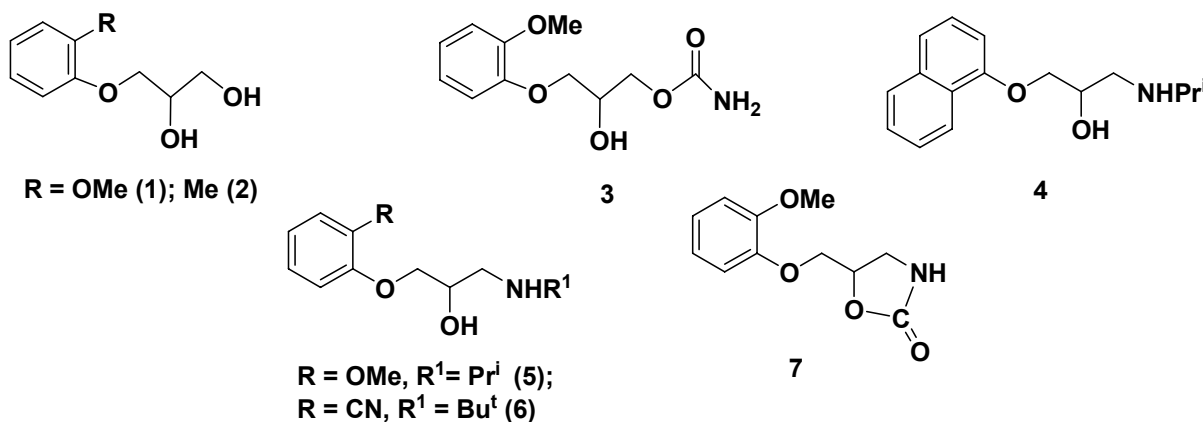
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation  
e-mail: zemfira@iopc.knc.ru

For the whole of the family of chiral  $\beta$ -adrenoblockers, it has been shown that (*S*)-enantiomers are eutomer components of the racemic drug, whereas (*R*)-enantiomers (distomers) usually display other (often undesirable) activity.<sup>1</sup> There are evidences that in the case of methocarbamol one enantiomer is more active in vivo than the other or racemate.<sup>2</sup> From the standpoint of modern tendency to replace racemic drugs by enantiopure ones it is desirable to have a precise knowledge about the phase properties of scalemic bioactive molecules, and to outline the direct access to both it's enantiomeric forms. The single enantiomer drugs slowly but sure press out not only the racemic but achiral drugs as well all over the world market of pharmaceuticals. From the standpoint of the tendency, the call for new effective scaling robust methods for nonracemic matter production is of urgent importance.

The segregation of enantiomers upon crystallization of racemates with the formation of so-called *racemic conglomerate*, i.e. a mechanical mixture of enantiopure crystals composed of the opposite configuration molecules, is known as *spontaneous resolution*. The based on this phenomenon direct method for production of single enantiomers from their racemate, as for instance resolution by entrainment, refer to natural limits of resolution effectiveness because of no need in chiral auxiliaries and specialized equipment. One can use an easily available spontaneously resolved enantiopure compounds as a target product and/or as a New Chiral Pool starting material to obtain another target drugs.

In this communication we wish to share our new experience in using different spontaneous resolution based approaches for obtaining registered drugs, such as expectorant *guaifenesin* (1), muscle relaxants *mephenesin* (2) and *methocarbamol* (3),  $\beta$ -adrenoblockers *propranolol* (4), *levomoprolol* (5), and *bunitrolol* (6), tranquilizer *mephenoaloxone* (7), in an enantiopure form.

### Some single enantiomer chiral drugs obtained with the spontaneous resolution assistance



The work was supported by the Russian Fund of Basic Research (grant no. 09-03-00308-a).

#### Literature:

- Mehvar, R.; Brocks, D. R. J. Pharm. Pharm. Sci. **2001**, 4, 185-200; For the special case of moprolool see: Harvengt, C.; Desager, J. P. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. **1982**, 20, 57-61; Merlo, L.; Brusoni, B.; Mussini, E.; Ghirardi, P. Boll. Soc. Ital. Cardiol. **1980**, 25, 955-961; Ferrari, G.; Vecchietti, V. US Pat. 4 683 245, 1987.
- Souri, E.; Sharifzadeh, M.; Farsam, H.; Gharavi, N. J. Pharm. Pharmacol. **1999**, 51, 853-855.



## КВАНТОВО-ФАРМАКОЛОГИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В РОЗРОБЦІ ТА ВИВЧЕННІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

*Чекман І. С., Небесна Т. Ю., Говоруха М. О.*

National O.O. Bogomolets Medical University, Pharmacology and Clinical Pharmacology Department  
e-mail: nebesnat@gmail.com

Квантова фармакологія – розділ науки, який застосовує методи комп'ютерного моделювання, принципи теоретичної хімії та квантової механіки для встановлення молекулярної структури ліків та механізмів їх взаємодії з рецепторами та іншими біомолекулами організму. Основні напрямки досліджень з квантової фармакології: пояснення механізмів молекулярної дії лікарських засобів; вивчення зв'язку між структурою та біологічною активністю речовин (QSAR); визначення фармакофорів – необхідного просторового розташування молекулярних фрагментів, що забезпечують структуру, фізико-хімічні та квантово-фармакологічні властивості, які в свою чергу визначають біологічну активність речовини; de novo дизайн лікарських засобів – створення нових лікарських засобів, спираючись на хімічну структуру молекули-мішені цих медикаментів в організмі людини. Однак, незалежно від напрямку, базовим предметом квантової фармакології є квантово-хімічні властивості молекул лікарських засобів, які прийнято називати дескрипторами. Молекулярні дескриптори визначають як набір незалежних параметрів, які характеризують електронні, структурні, геометричні та інші властивості молекул. Основним способом розрахунку молекулярних дескрипторів є комп'ютерне моделювання. Всі методи розрахунків можна поділити на три основні групи: молекулярно-механічні (molecular mechanics), неемпіричні (ab initio), напівемпіричні (semi-empirical). У методі молекулярної механіки атоми розглядаються як ньютонівські частинки, які взаємодіють один з одним за допомогою потенційних полів, що задаються емпірично. Потенційна енергія взаємодії залежить від довжини зв'язків, валентних і торсійних кутів і нековалентних взаємодій (у т.ч. Ван-дер-Ваальсових сил, електростатичних взаємодій і водневих зв'язків). У цих розрахунках сили, що діють на атоми, представляють у вигляді функцій координат атомів. Найбільш широко в молекулярній механіці застосовують методи MM+, MM3 і AMBER. Електронну структуру досліджуваних молекул (власне, квантово-хімічні параметри) можна розраховувати використовуючи неемпіричний метод. Неемпіричний (ab initio) метод Хартрі-Фока не вимагає для проведення розрахунків знання будь-яких емпіричних параметрів атомів, які використовують в напівемпіричних методах. Це найбільш точний тип розрахунків. Проте ab initio метод вимагає набагато більше обчислювальних ресурсів, ніж молекулярно-механічні й напівемпіричні методи і може застосовуватись при дослідженні молекул розміром до 100 атомів. Найбільш часто в квантово-фармакологічних дослідженнях застосовують типи розрахунків 6-31G(d, p) та B3LYP. Напівемпіричні методи вирішують рівняння Шредингера для атомів і молекул з використанням певних наближень і спрощень. Всі методи цієї групи характеризуються тим, що розрахунок ведеться тільки для валентних електронів. Напівемпіричні методи, зокрема AM1 та PM3 найбільш часто використовувались в квантово-фармакологічних дослідженнях протягом останніх десяти років.

Встановлення механізмів міжмолекулярної взаємодії між рецепторами та лігандами є основою для створення препаратів. На сьогоднішній день чітко експериментально підтверджене уявлення про природу взаємодії між адренорецепторами та їх природними лігандами або синтетичними препаратами відсутнє. Це зумовлено, в першу чергу, неможливістю рентгеноструктурного аналізу адренорецепторів, оскільки при кристалізації ці структури втрачають свою нативну конформацію, стабілізовану в організмі клітинною мембраною. При неможливості вивчення структури рецептору і його центру зв'язування в сучасній квантовій фармакології застосовуються такі методи, які визначають кількісне співвідношення залежності «структура-активність» (QSAR). При математичному моделюванні залежності між фармакологічною активністю (блокада альфа1A-адренорецепторів) та 50 квантово-хімічними показниками 19 апорфінових похідних встановлено, що існує багатофакторна функціональна залежність показника зв'язування речовини з альфа1A-адренорецептором від зарядів на атомах вуглецю трьох атомів вуглецю молекул апорфінів та таких топологічних дескрипторів, як сума валентних ступенів, топологічний діаметр, загальна зв'язаність та індекс Вінера. Інший підхід полягає в дослідженні та порівнянні квантово-фармакологічних властивостей відомих лікарських засобів, така робота була проведена для молекул бета-адреноблокаторів. В результаті встановлено, що в структурі молекул атенололу, метопрололу та бісопрололу наявний внутрішньо-молекулярний водневий зв'язок, відсутній в молекулі пропранололу, що підтверджується інфрачервоним спектром. Досліджені молекули можуть мати щонайменше дві стабільні конформації з таким зв'язком. Молекули бета-адреноблокаторів мають спільний фрагмент. Геометричні параметри цього фрагменту (відстані між атомами та значення кутів між зв'язками), а також значення електростатичного потенціалу на атомах є схожими у різних препаратів, що дає підставу вважати саме цей фрагмент важливим для взаємодії вивчених препаратів з бета-адренорецепторами. Крім описаних біологічно активних речовин, на кафедрі фармакології та клінічної фармакології НМУ імені О.О. Богомольця також вивчаються квантово-фармакологічні властивості інших груп лікарських засобів, зокрема інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту, серцевих глікозидів та метаболічних препаратів.



**PHARMACOLOGY AND CLINICAL PHARMACOLOGY DEPARTMENT  
QUANTUM-PHARMACOLOGICAL INVESTIGATIONS IN DRUG DESIGN AND DISCOVERY**

*Chekman I. S., Nebesna T. Yu., Govoruha M. O.*

National O.O. Bogomolets Medical University, Pharmacology and Clinical Pharmacology Department  
e-mail: nebesnat@gmail.com

Quantum pharmacology is a science division used computer based techniques, principles of theoretical chemistry and quantum mechanics to study the molecular structure of drugs and mechanisms of their interaction with receptors and other biomolecules of human body. Main directions in quantum pharmacological studies: investigations in mechanisms of drugs action; quantitative structure activity relationship study (QSAR); pharmacophore search – the three-dimensional arrangement of atoms, or groups of atoms, responsible for the physicochemical and biological activity of a drug molecule; de novo drug design - an iterative process in which the three- dimensional structure of the receptor is used to design newer molecules, it involves structure determination of the lead target complexes and the design of lead modifications using molecular modeling tools..

Basic subject of quantum pharmacology is quantum-chemical properties of drugs molecules, which are called molecular descriptors. Molecular descriptors are set of independent parameters , which characterize electronic, structural, geometrical and other properties of molecules. Main approach to calculation of molecular descriptors is computer-aided modeling of drugs quantum-chemical parameters with specialized programs and algorithms. All methods of calculation can be divided into three main groups: molecular mechanics, nonempirical (ab initio) and semi-empirical. The term molecular mechanics refers to the use of Newtonian mechanics to model molecular systems; the potential energy of all systems in molecular mechanics is calculated using empirical force fields. Molecular mechanics potential energy depends on bond length, valent and dihedral angles and noncovalent interactions (including Van der Waals chemical bond, electrostatic interactions and hydrogen bonds). In these calculations forces, acting on atoms, are taken as a functions of atomic coordinates. The most popular methods in molecular mechanics are MM+, MM3 and AMBER. Electronic structure of the investigated substances (quantum-chemical properties) can be calculated by nonempirical method. Nonempirical (ab initio) Hartree-Fock method is based entirely on theory from first principles and does not need any empirical atom parameters for calculations. This method is the most accurate, but takes much more time and computational resources for calculations than semi-empirical methods and can be used only for small-size molecules (100 atoms). The most useful methods from this group are Hartree-Fock and Density Functional methods (such as HF/6-31G(d, p) and DFT/B3LYP). Semi-empirical quantum chemistry methods solve Schrödinger equation for atoms and molecules, but make many approximations and obtain some parameters from empirical data. All methods of this group are characterized by calculations only for valent electrons. Using of empirical parameters significantly decreases computational time. Semi-empirical methods, such as AM1 and PM3, were the most useful in quantum-pharmacological investigations during last ten years.

Investigations of intermolecular interactions between receptors and ligands is a theoretical basis for drug design. Since adrenergic receptors are membrane-bound proteins, experimental determination of their 3D structures is still an extremely difficult task. In the first place it is caused by impossibility of adrenergic receptors X-ray analysis (during crystallization these structures are destroyed). If studying of receptor structure and its binding center is impossible, indirect methods, such as QSAR (quantitative structure-activity relationships), are used in modern quantum pharmacology. Regression analysis of dependency between pharmacological activity (alpha1A-adrenoblocking properties) and 50 quantum-chemical parameters of 19 aporphine derivatives demonstrates multiple-factor functional relation between alpha1A-adrenoblocking activity of aporphine derivatives and charges on three carbon atoms and such topological descriptors, as total valence degree, topological diameter, total connectivity, Wiener index. Another approach to drug design is studying and comparison of quantum-pharmacological properties for well-known drugs, such work have been done for beta-adrenergic blockers molecules. It was shown that the structure of atenolol, metoprolol and bisoprolol molecules are stabilized by intramolecular hydrogen bonds, the same results were obtained by method of infrared spectroscopy. Investigated molecules can have at least two stable conformations with such bond. Beta-adrenergic blockers have common fragment in the structure. Geometrical parameters of this fragment (distances between atoms and angles between bonds), and values of electrostatic potential on atoms are similar for different substances, that can be evidence of important pharmacophore role of the described fragment. Except described biologically active substances, at the department of pharmacology and clinical pharmacology of National O.O. Bogomolets Medical University other groups of drugs, such as inhibitors of angiotensin converting enzymes, cardiac glycosides and metabolic drugs are studied.



## СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ 3-НИТРОХИНОЛИНОВ

Давыдова Н.К.

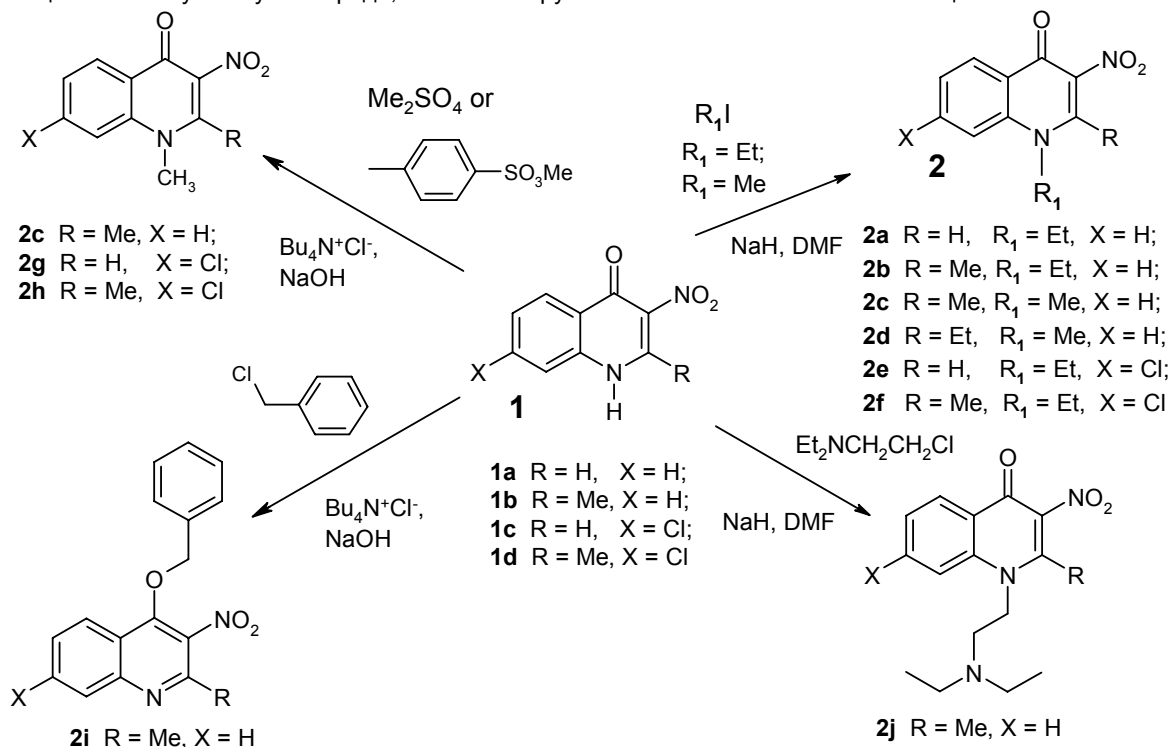
Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской Академии Наук,  
Москва, Россия  
e-mail: davydova@ineos.ac.ru

Открытие антималярийной активности у производных хинолина послужило стимулом к исследованиям, направленным на разработку различных методов их синтеза и установление зависимости биологической активности от структуры синтезированных соединений.

Новым этапом в развитии химии хинолина явилось создание препарата 5-НОК (нитроксолин) и особенно препаратов группы оксолиниевой кислоты (ципрофлоксацин, норфлоксацин и др.), обладающих широким спектром терапевтической активности в отношении бактериальных инфекций. 3-Нитрохинолоны в отличие от их аналогов, содержащих нитро группу в бензольном фрагменте хинолинового цикла, изучены в меньшей степени, возможно из-за их меньшей доступности.

Разработан новый препаративно доступный метод синтеза замещенных 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидрохинолинов **1**. С целью поиска новых биологически активных соединений синтезирован ряд производных 3-нитрохинолинов **2**, исходя из 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидрохинолинов **1**.

Рассмотрение реакционной способности 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидрохинолинов **1** по отношению к алкилирующим агентам показывает, что эти соединения в зависимости от их структуры, условий реакции и природы алкилирующего агента могут реагировать по трем разным центрам: циклическому атому азота, экзоциклическому атому кислорода, метильной группе в положении 2 хинолинового цикла:



Синтезированные N-алкил-3-нитро-4-оксо-1,4-дигидрохинолины **2** проявили выраженную антипротозойную активность. Наибольший интерес представляют 3-нитрохинолоны **2b**, **2c** и **2g**, которые проявили значительную активность в отношении *Trichomonas vaginalis* и *Eutamoeba histolytica*.



## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF COMPOUNDS DERIVED FROM 3-NITROQUINOLINES

Davydova N.K.

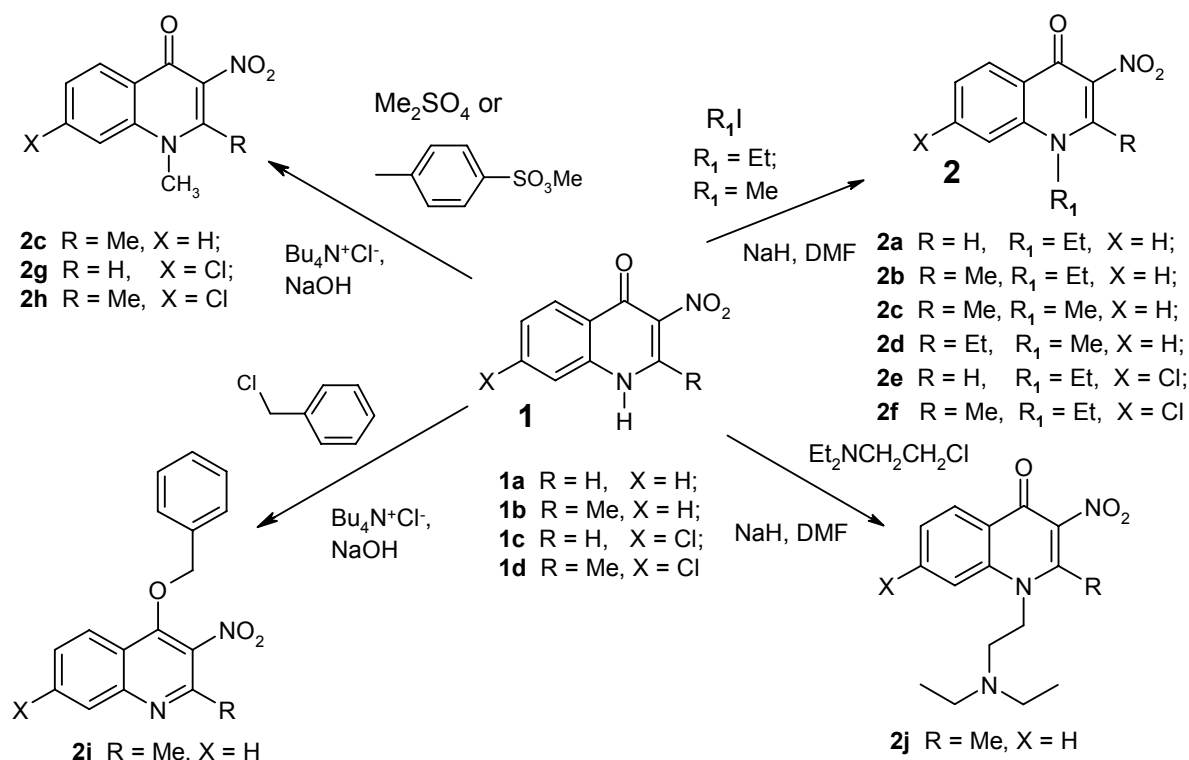
A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
e-mail: davydova@ineos.ac.ru

Discovery of quinolines as antimalarial drugs has stimulated the development of various methods for their synthesis and the establishment of the biological activity-structure relationships.

The design of 5-NOK (Nitroxoline) and, in particular, a group of compounds related to Oxolinic acid (such as Norfloxacin, Ciprofloxacin, etc) exhibiting a broad-spectrum antibacterial activity became a new stage in the development of quinoline chemistry. 3-Nitroquinolones were studied less extensively compared to their analogues containing the nitro group in the benzene fragment of the quinoline ring, most likely because of their less availability.

The new method of synthesis of substituted 3-Nitro-1H-quinolin-4-ones **1** was elaborated. The series of substituted 3-Nitroquinolines **2** were synthesized starting from 3-Nitro-1H-quinolin-4-ones **1** to facilitate the search of the new biological active compounds.

Alkylation of 3-Nitro-1H-quinolin-4-ones **1** allows to obtain a number of derivatives of 3-Nitro-1H-quinolin-4-ones. Positions of alkylation is varied depending on structure of starting 3-Nitro-1H-quinolin-4-ones **1**, reaction conditions and alkylation's reagents. Thus, three different types of alkylation's products were synthesized: N-alkyl (the cyclic nitrogen atom), O-alkyl (the exocyclic oxygen atom) and C-alkyl (the methyl group in the position 2 of the quinoline ring) according scheme:



The synthesized N-alkyl-3-nitro-1H-quinolin-4-ones **2** were found to have a definite antiprotozoal activity. The highest activity against *Trichomonas vaginalis* and *Eutamoeba histolytica* was displayed by N-alkyl-3-Nitro-1H-quinolin-4-ones **2b**, **2c**, **2g**.





### СИНТЕЗ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ДИОКСИМА 1,1'-ДИАЦЕТИЛФЕРРОЦЕНА

Дикусар<sup>1</sup> Е.А., Жуковская<sup>1</sup> Н.А., Поткин<sup>1</sup> В.И., Широкий<sup>1</sup> В.Л., Петкевич<sup>1</sup> С.К., Ювченко<sup>2</sup> А.П., Желдакова<sup>3</sup> Р.А.

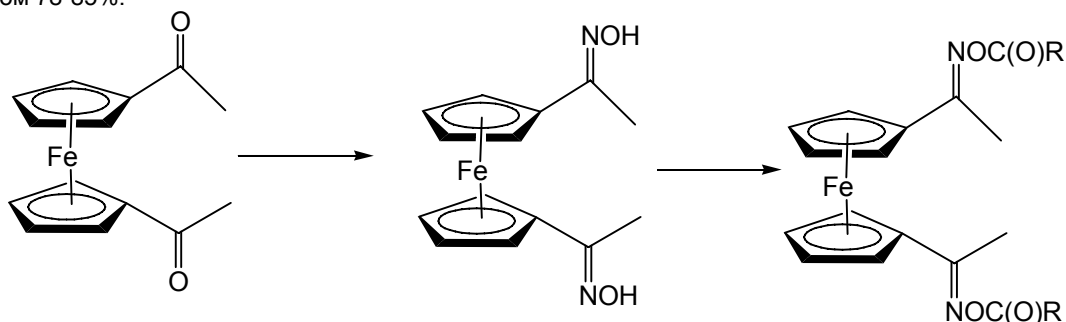
<sup>1</sup>Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Белоруссия  
e-mail: evgen\_58@mail.ru

<sup>2</sup>Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: mixa@ichnm.basnet.by

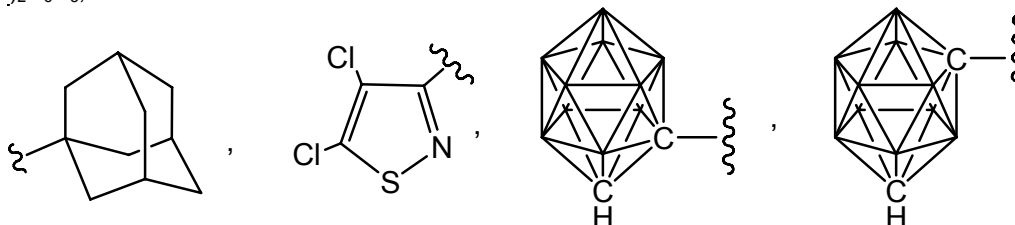
<sup>3</sup>Белгосуниверситет, Минск, Беларусь

Ряд производных ферроцена обладает высокой биологической активностью и может быть использован в качестве компонентов лекарственных препаратов [1-3]. Среди этих соединений можно указать лекарственный препарат *ферроцерон* (натриевая соль 2-карбоксибензоилферроцена).

Неизвестные ранее сложные эфиры диоксима 1,1'-диацетилферроцена получали взаимодействием диоксима 1,1'-диацетилферроцена с хлорангидридами карбоновых кислот в присутствии пиридина (соотношение реагентов 1:2:2) в среде абсолютного диэтилового эфира. В результате были синтезированы ферроценосодержащие сложные эфиры функционально замещенных карбоновых кислот с выходом 78-85%.



R = Cl<sub>2</sub>C=CCl, Cl<sub>2</sub>C=CClCH<sub>2</sub>, 2,4-Cl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>(CHBr)<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C(H)=C(C≡N), 3-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 3,5-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>,



Одним из перспективных направлений синтеза новых ферроценосодержащих биологически активных соединений является использование сложноэфирной связи в качестве крепежного строительного элемента для монтажа различных функциональных и фармакофорных групп. На основе алифатических, циклоалифатических, каркасных полициклических, ароматических, конденсированных ароматических синтонов и фрагментов структур как природного, так и синтетического происхождения можно получать широкий спектр ферроценосодержащих соединений, что служит ярким примером молекулярного дизайна. Достаточно высокая химическая устойчивость сложноэфирной группы к гидролизу, алкоголизу и аммонолизу при нейтральных значениях pH, а также к воздействию биологических сред, позволяет читать ее перспективным и удобным инструментом в области органического синтеза ферроценосодержащих соединений.

Сложные эфиры диоксима 1,1'-диацетилферроцена проявили высокую фунгицидную активность, полностью ингибируя рост мицелия штаммов грибов *Alternaria alternate*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*, *Penicillium lividum* при концентрации 100 мкг/мл.

#### Литература:

1. Staveren D.R., Metzler-Nolte N. Chem. Rev. 2004. Vol. 104. N 12. P. 5931.
2. Snegur L.V., Simenel A.A., Nekrasov Yu.S., Morozova E.A., Starikova Z.A., Peregudova S.M., Kuzmenko Yu.V., Babin V.N., Ostrovskaya L.A., Bluchterova N.V., Fomina M.M. J. Organomet. Chem. 2004, Vol. 689. N 15. P. 2473.
3. Zora M., Gormen M. J. Organomet. Chem. 2007. Vol. 692. N 22. P. 5026.



## SYNTHESIS AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF DIOXIME OF 1,1'-DIACETYLFERROCENE ESTERS

Dikusar E.A.<sup>1</sup>, Zhukovskaya N.A.<sup>1</sup>, Potkin V.I.<sup>1</sup>, Shirokiy V.L.<sup>1</sup>, Petkevich S.K.<sup>1</sup>,  
Yuvchenko A.P.<sup>2</sup>, Zheldakova R.A.<sup>3</sup>

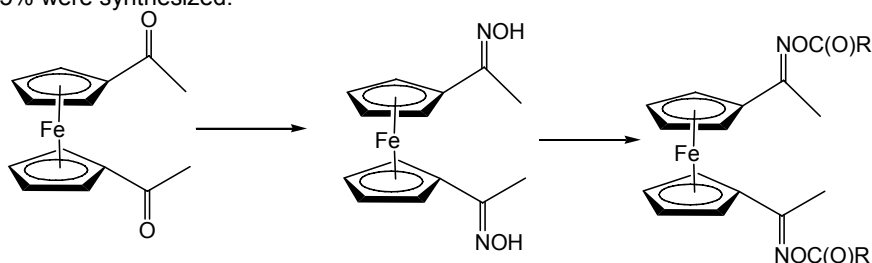
<sup>1</sup>Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of the Sciences of Belarus', Minsk, Belarus  
e-mail: evgen\_58@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Chemistry of the New Materials of the National Academy of the Sciences of Belarus', Minsk, Belarus  
e-mail: mixa@ichnm.basnet.by

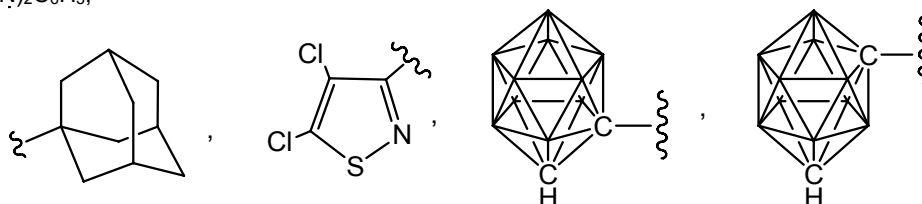
<sup>3</sup>Belgosuniversitet, Minsk, Belarus

The number of the derivatives of ferrocene possesses high biological activity and can be used as the components of medicinal preparations [1-3]. Among these compounds it is possible to indicate medicinal preparation *Ferroceron* (sodium salt of 2-carboxybenzoferrrocene).

Esters of dioxime of 1,1'-diacetylferrocene unknown earlier were obtained by interaction of the dioxime of 1,1'-diacetylferrocene with acyl chlorides in the presence of pyridine (ratio of reagents 1:2:2) in the medium of absolute diethyl ether. As a result the ferrocene-containing esters of the functionally substituted carboxylic acids with yields 78-85% were synthesized.



R = Cl<sub>2</sub>C=CCl, Cl<sub>2</sub>C=CClCH<sub>2</sub>, 2,4-Cl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>(CHBr)<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C(H)=C(C≡N), 3-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 3,5-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>,



One of the promising trends of the synthesis of the new ferrocene-containing biologically active compounds is the use of an ester compounds as the fastening construction element for the installation of different functional and bioactive groups. On the basis of aliphatic, cycloaliphatic, skeleton polycyclic, aromatic, condensed aromatic sintons and fragments of the structures both of natural and synthetic origin it is possible to obtain the wide spectrum of the ferrocene-containing compounds, which serves as the clear example of molecular design. Sufficiently high chemical resistance of ester group to the hydrolysis, the alcoholysis and the ammonolysis at the neutral values of pH, and also to the action of biological media, makes it possible to consider as the its most promising and convenient tool in the field of the organic synthesis of the ferrocene-containing compounds.

The esters of the dioxime of 1,1'-diacetylferrocene appeared high fungicidal activity, completely inhibiting an increase in the mycelium of the strains of fungi *Alternaria alternate*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*, *Penicillium lividum* with the concentration 100 µg/ml.

### Literature:

1. Staveren D.R., Metzler-Nolte N. Chem. Rev. 2004. Vol. 104. N 12. P. 5931.
2. Snegur L.V., Simenel A.A., Nekrasov Yu.S., Morozova E.A., Starikova Z.A., Peregudova S.M., Kuzmenko Yu.V., Babin V.N., Ostrovskaya L.A., Bluchterova N.V., Fomina M.M. J. Organomet. Chem. 2004, Vol. 689. N 15. P. 2473.
3. Zora M., Gormen M. J. Organomet. Chem. 2007. Vol. 692. N 22. P. 5026.



## КІЛЬКІСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ $\beta(1-3)$ -ГЛЮКАНІВ В ГРИБАХ *LANTINUS EDODES*

Донченко Г. В., Сіпонов С. Б.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна  
e-mail: ssb@ukr.net

На сьогоднішній день широкого застосування в медичній практиці набули препарати, біологічно-активні речовини яких виділені з рослинної сировини. Дуже привабливим з цієї точки зору для біотехнології є використання грибів, які в достатній кількості містять широкий спектр біологічно активних речовин, а сучасні технології їх вирощування з використанням дешевої сировини, контролем біологічного процесу і можливістю багатопільового використання є економічно доцільним. Серед грибів, що застосовуються в медицині широко культивуються *Pleurotus ostreatus*, *Hericium erinaeum*, *Ganoderma lucidum* та найпоширенішим з них є *Lentinus edodes*, який має імуностимулюючі властивості, виявився дуже дієвим при хронічному ревматизмі, злоякісних пухлинах, ВІЛ-інфекції і т. і..

Відомо, що препарати одержані з *Lentinus edodes* є основною складовою частиною протипухлинних препаратів "Лентінан" та К 8-2.

Метою нашого дослідження є підбір методу одержання грибного екстракту для підвищення вмісту фармакологічних речовин імуностимулюючої дії  $\beta(1-3)$  глюканів, оскільки визначення вмісту цих речовин є критерієм ефективності технологічного процесу, в подальшій роботі це було основним показником.

Відомо, що у вищих грибів  $\beta(1-3)$ -глюкани пов'язані ковалентним зв'язком з полісахаридами (хітином). Тому для виділення  $\beta(1-3)$ -глюканів з порошку плодових тіл або міцелію гриба ми використовували як послідовно лужно-кислотний гідроліз з утворенням мономерів глюкози та коротких олігоглюканів, так і ферментативне розщеплення хітин-глюканового комплексу з утворенням мономерів коротких ( $\beta(1-3)$ -глюканів) олігоглюканів. Спектрофотометричне визначення  $\beta(1-3)$ -глюканів у зразках, отриманих обома шляхами розщеплення, проводили антроновим методом. Було визначено оптимальні умови проведення експериментів. Доведено, що виділення  $\beta(1-3)$ -глюканів із хітин-глюконового комплексу шляхом ферментативного гідролізу з використанням зималіази – ферменту, який розщеплює (1-3) $\beta$ -глюкозидні зв'язки, а не (1-6) $\beta$  та (1-4) $\beta$ , є більш ефективним та значно підвищував чутливість та специфічність методу.

За допомогою розробленого нами експрес-методу було визначено вміст (1-3) $\beta$ -глюканів у 20 зразках плодових тіл та міцелію гриба *Lentinus edodes* по схемі: деформовані плодові тіла, міцелій, старі шапки, старі ніжки, нові ніжки, нові плодові тіла. Найбільший вміст (1-3) $\beta$ -глюканів було знайдено в міцелії та нових ніжках гриба.

Одночасно були проведені порівняльні дослідження вмісту (1-3) $\beta$ -глюканів у наданих зразках ще 6 біологічно споріднених грибів: *Hericium erinaceus* АГ, *Hypsizigus marmoreus* 511, *Grifola frondosa* 923, *Auricularia auricula* 975, *Pleurotus ostreatus* 716(B), та *Pleurotus ostreatus* 716(AM/2). Лише другий з них *Hypsizigus marmoreus* 511 наближався по вмісту (1-3) $\beta$ -глюканів до їх рівня у плодових тілах гриба *Lentinus edodes*.



## QUANTATIVE INVESTIGATION OF THE $\beta(1-3)$ GLUCANES CONTENT IN *LANTINUS EDODES*

Donchenko G.V., Silonov S.B.

A.V. Paladin institute of biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine.

e-mail: ssb@ukr.net

There are many preparations containing biologically active substances, which are very popular in medicine practice nowadays. The usage of mushrooms is a very attractive approach of the biotechnological point of view. The mushrooms are containing a wide spectrum of biological active substances and there are modern technologies of the mushrooms growing with the usage of inexpensive herbal raw material. It's also possible to control biological process and to provide multi-target mushroom usage. Among the mushrooms, which are used in medicine, *Pleurotus ostreatus*, *Hericium erinaeum*, *Ganoderma lucidum* are widely cultivated. The most popular is *Lentinus Edodes*, which possesses immunostimulating properties. It's very helpful for the treatment of chronic rheumatism, malignant tumor, HIV-infections etc.

It's well known that preparations from *Lentinus Edodes* are the components of the anti-tumor drugs such as "Lentinian" and K 8-2.

The aim of our investigation is a compilation of the method to obtain mushrooms by extracting with the increasing contain of pharmacological substances with immunostimulating action,  $\beta(1-3)$  glucanes. The definition of the contain of these substances is a criterion for the technological process efficiency.

It's known that  $\beta(1-3)$  glucanes are linked by the covalent bound with polysaccharides of the chitin in the mushrooms. So to purify  $\beta(1-3)$  glucanes from the powder of the mushroom body (cap, stipe), on the mycelium we used both: the base-acidic hydrolysis with the formation of glucose monomers and short oligoglucanes and the enzyme splitting of the chitin-glucane complex with the formation of short oligoglycanes ( $\beta(1-3)$  glucanes) in the samples using antrone method. The optimal experimental conditions were defined. We have found that  $\beta(1-3)$  glucane purification from chitin-glucane complex with the use enzymatic hydrolysis enzyme zimaliase, which hydrolyses  $\beta(1-3)$  glycoside bonds instead of  $\beta(1-4)$  or  $\beta(1-6)$  is more efficient and it essentially increased the sensitivity add specificity of the method.

We have elaborated the express-method to define the content  $\beta(1-3)$  glucanes in 20 samples of mushroom bodies and mycelium of the lentinus edodes according to the following scheme: deformed mushroom bodies, mycelium, old caps, old stipe, new stipe, and new mushroom bodies. The biggest contain of  $\beta(1-3)$  glucanes was found in mycelium, and in new mushroom stipe. At the same time we carried out the comparative investigations of the  $\beta(1-3)$  glucane contain the samples of other six mushrooms affined: *Hericium erinaceus* AG, *Hypsizigus marmoreus* 511, *Grifola frondosa* 923, *Auricularia auricula* 975, *Pleurotus ostreatus* 716(B), and *Pleurotus ostreatus* 716(AM/2). Only second of them *Hypsizigus marmoreus* 511 had the content of  $\beta(1-3)$  glucanes comparative with that one in Lentinus edodes.



## ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ЗЕЛеной МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАРОТИНОИДОВ

Ефремова Н.<sup>1</sup>, Рудик В.<sup>2</sup>, Бульмага В.<sup>1</sup>, Кирияк Т.<sup>2</sup>, Зосим Л.<sup>1</sup>, Еленчук Д.<sup>2</sup>, Бивол Ч.<sup>1</sup>,  
 Батыр Л.<sup>2</sup>, Олан О.<sup>2</sup>, Поповски Л.<sup>1</sup>, Гуля А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Молдавский Государственный Университет, Кишинев, Молдова  
 e-mail: efremova.nadejda@gmail.com

<sup>2</sup>Институт Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова

В последнее время, возрос интерес исследователей к зеленой микроводоросли *Dunaliella salina*, являющейся перспективным биотехнологическим объектом [1]. Биомасса дуналиеллы используется для получения целого ряда биоактивных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, таких как липиды (полиненасыщенные жирные кислоты), каротиноиды ( $\beta$ -каротин, зеаксантин, лютеин), витамины ( $\alpha$ -токоферол) и др. Известно, что каротиноиды преимущественно предотвращают образование пероксид радикалов и форм синглетного молекулярного кислорода, а также подавляют процессы перекисного окисления липидов [2]. Антиоксидантные свойства, помимо  $\beta$ -каротина, присущи и другим каротиноидам - лютеину и зеаксантину, присутствующим в биомассе дуналиеллы [3]. Ранее сотрудниками лаборатории «Фикобиотехнология» (Молдавский Государственный Университет) было установлено, что некоторые комплексные соединения Cr(III), Fe(III) и Co(II) способствуют увеличению продуктивности дуналиеллы и синтеза каротиноидов в биомассе [1].

**Цель исследования:** получение биомассы зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* с повышенным содержанием каротиноидов.

**Объект исследования:** зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* CNM-AV-01, хранящаяся в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии АН РМ. Дуналиелла культивировалась на питательной среде Ben – Amotz [4]. В качестве регуляторов роста и стимуляторов синтеза каротиноидов были использованы координационные соединения Zn(II) с органическими кислотами и имидазолом, внесенные в питательную среду концентрациях 0,1 – 30 мг/л. Определение содержания каротиноидов осуществлялось по методу Dere [5].

Так, согласно результатам исследования, комплексы цинка с дикарбоксильными кислотами и имидазолом могут быть использованы в качестве стимуляторов синтеза каротиноидов в биомассе дуналиеллы. Для всех исследуемых соединений цинка с органическими кислотами и имидазолом оптимальной явилась концентрация 10 мг/л. Наибольший эффект на биосинтез каротиноидов оказал комплекс Zn с адипиновой кислотой и имидазолом, способствующий увеличению содержания каротиноидов в вышеуказанной оптимальной концентрации на 55 % по сравнению с контролем. Положительный эффект, оказываемый комплексными соединениями цинка на содержание каротиноидов, может быть обусловлен тем, что цинк является кофактором некоторых важных ферментов цепи биосинтеза каротиноидов. Так, в состав энзима ДМАПФ – изомеразы, катализирующего одну из основных реакций изопреноидного пути - превращения ИППФ в ДМАПФ, входят ионы  $Zn^{2+}$ . Другой важный фермент, участвующий в реакции синтеза геранил геранилпирофосфата - фарнезилтрансфераза также содержит в активном центре ионы  $Zn^{2+}$  [6].

Биомасса зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* с повышенным содержанием каротиноидов может быть рекомендована для получения пищевых биодобавок с дальнейшим применением для лечения и профилактики онкологических, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний. Преимущества пищевых биодобавок на основе биомассы дуналиеллы с повышенным содержанием каротиноидов (в частности 9 - цис изомеров  $\beta$  - каротина) состоят в том, что они являются более эффективными и обладают большим спектром антиоксидантного воздействия, чем биодобавки на основе искусственно синтезированного  $\beta$  - каротина.

### Литература:

1. Rudic, V. Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale și realizări practice. Editura Elena - VI, Chișinău, 2007, 364 p.
2. Sies, H., Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. American journal of clinical nutrition, 1995, vol. 62, no. 6, p. 1315 - 1321.
3. Garcia-González, M., Moreno, J., Manzano, J. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology, 2005, vol. 115, no. 12, p. 81 – 90
4. Ben-Amotz, A, Avron, M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Trends in Biotechnology, 1990, vol. 8, no. 1, p. 121 - 126.
5. Dere, Ș., Güneş, T., SIVACI, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. Tr. J. of Botany, 1998, vol. 22, p. 13 - 17.
6. Sousa, S., Fernandes, P., Ramos, M. Farnesyltransferase - new insights into the zinc-coordination sphere paradigm: evidence for a carboxylate-shift mechanism. Biophys. J., 2005, vol. 88, no. 1, p. 483 - 494.



**THE OBTAINING OF GREEN MICROALGAE *DUNALIELLA SALINA* BIOMASS  
WITH HIGH CONTENT OF CAROTENOIDS**

Efremova N.<sup>1</sup>, Rudic V.<sup>2</sup>, Bilimaga V.<sup>1</sup>, Chiriac T.<sup>2</sup>, Zosim L.<sup>1</sup>, Elenciuc D.<sup>2</sup>, Bivol C.<sup>1</sup>, Batir L.<sup>2</sup>,  
Olan O.<sup>2</sup>, Popovschi L.<sup>1</sup>, Gulea A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The State University of Moldova, Chishinau, Moldova  
efremova.nadejda@gmail.com

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Chishinau, Moldova

In recent years, the green microalgae *Dunaliella salina*, an important biotechnological object, is in the area of great interest of researchers [1]. *Dunaliella* biomass is used for the obtaining of numerous bioactive substances with antioxidant properties, such as: lipids (unsaturated fatty acids), carotenoids ( $\beta$ - carotene, zeaxanthine, luteine), vitamins ( $\alpha$  - tocopherol) et. al. It is known that carotenoids preponderantly prevent the formation of peroxy radicals and forms of singlet molecular oxygen, as well as suppress the processes of peroxidical oxidation of lipids [2]. Besides of  $\beta$ - carotene other forms of carotenoid from *dunaliella* biomass – zeaxanthine and luteine have the antioxidant properties too [3]. Recently, the positive effect of some coordination compounds of Cr(III), Fe(III) and Co(II) on *Dunaliella salina* productivity and carotenoidgenesis was established by collaborators of research laboratory „Phycobiotechnology” [1].

**The aim of investigation:** the obtaining of *Dunaliella salina* biomass with high carotenoids content.

**The object of study:** green microalgae *Dunaliella salina* CNM–AV-01, deposited in the National Collection of Non-Pathogen Microorganisms of Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM. *Dunaliella* was cultivate don the nutritive medium Ben – Amotz [4]. The coordination compounds of Zn(II) with organic acids and imidazole as ligands, supplemented to the nutritive medium in the concentrations of 0,1-30 mg/L, have been used as stimulators of carotenoidgenesis. The carotenoids content was determined by the method of Dere [5].

According to the results of investigation, the coordination compounds of Zn(II) with organic acids and imidazole can be used as stimulators of carotenoidgenesis in the *dunaliella* biomass. The optimal concentration has been established (10 mg/L). The complex of Zn with adipic acid and imidazole has had the maximal effect on the carotenoids content (an increasing by 55 % compared to the control). This positive effect can be caused by the presence of zinc in the active center of several important enzymes of carotenoids biosynthesis. Such, ions of  $Zn^{2+}$  are included in the composition of enzyme DMAPP-isomerase catalysing one of the essential reaction of izoprenoid way – the conversion of IPPP to DMAPP. Another important enzyme – farnesyltransferase taking part in the reaction of synthesis of geranyl geranylpyrophosphate contain in the active center ions of zinc also. [6].

The biomass of *Dunaliella salina* with high content of carotenoids can be recommended for the obtaining of bioadditives with the following utilization in treatment and profilaxy of cancer, infectious and cardio-vascular diseases. The advantage of these bioadditives is in the presence of 9- cis isomers of  $\beta$  – carotene.

**References:**

1. Rudic, V. Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale și realizări practice. Editura Elena - VI, Chișinău, 2007, 364 p.
2. Sies, H., Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. American journal of clinical nutrition, 1995, vol. 62, no. 6, p. 1315 - 1321.
3. García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology, 2005, vol. 115, no. 12, p. 81 – 90
4. Ben-Amotz, A, Avron, M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Trends in Biotechnology, 1990, vol. 8, no. 1, p. 121 - 126.
5. Dere, Ș., Güneş, T., SIVACI, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. Tr. J. of Botany, 1998, vol. 22, p. 13 - 17.
6. Sousa, S., Fernandes, P., Ramos, M. Farnesyltransferase - new insights into the zinc-coordination sphere paradigm: evidence for a carboxylate-shift mechanism. Biophys. J., 2005, vol. 88, no. 1, p. 483 - 494.



## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ В КРЫМСКОМ РЕГИОНЕ БЕЗОТХОДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ СЫРЬЯ МОРСКОГО ГЕНЕЗА

Еремеев В.Н., Рябушко В.И., Ерохин В.Е.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина  
e-mail: rabushko2006@yandex.ru

В морской среде обитает свыше 80% известных науке видов растительных и животных. В течение прошедшего десятилетия из морских организмов выделено свыше 5000 новых органических соединений. Из них более 230 веществ обладают значительной биологической активностью. Разнообразие химических веществ в морской среде объясняется экстремальной борьбой организмов за пространство и ресурсы. Существует гипотеза, что прикрепленные морские организмы (губки, кораллы, оболочники, водоросли и др.) обладают разнообразными химическими соединениями, "вторичными метаболитами", которые используются в конкурентной борьбе за существование.

Одноклеточные водоросли и микроорганизмы являются наиболее перспективным и рентабельным источником сырья для биотехнологий получения БАВ. Однако они не обеспечивают производство всего спектра необходимых веществ. Поэтому для этих целей могут быть использованы массовые виды макрофитов, трав, моллюсков и рыб, обитающих в украинском секторе азово-черноморского бассейна. К наиболее перспективным основным сырьевым источникам отнесены следующие виды:

Макрофиты: багрянки *Phyllophora nervosa* (агароид, йод, активированный уголь), *Cystoseira barbata* (альгинат, БАД);

Морская трава: *Zostera marina* (зостеран, целлюлоза, этиловый спирт);

Моллюски: мидия *Mytilus galloprovincialis* Lam. (гидролизаты, БАД, питательные среды);

Моллюски: рапана *Rapana venosa* (гидролизаты, БАД);

Рыбы: акула катран *Squalus acanthias* (катранол), килька *Sprattus sprattus* (гидролизаты, питательные среды), хамса *Engraulis encrasicolus ponticus* (омега-3, омега-6 жирные кислоты).

Для производства БАВ необходима устойчивая сырьевая база, однако не все организмы можно вырастить в культуре. Кроме того, при культивировании организмов некоторые специфические биологически активные вещества могут утрачивать свою первоначальную активность. Поэтому, в каждом конкретном случае необходимо решать вопрос о дополнительных исследованиях и выборе рентабельных биотехнологий.

В Украине отсутствует современная экспериментально-производственная и аналитическая база для исследований в области морских био- и нанотехнологий, хотя в мире наблюдается бум вложений в nanoотрасли, которые позволят целенаправленно моделировать и синтезировать необходимые биологически активные вещества. Поэтому в исследованиях ИнБЮМ практикуется широкая кооперация с различными научными и производственными организациями, как в Украине, так и за ее пределами. Основное внимание уделяется разработке новых способов и технологий получения БАВ из морских организмов с целью создания лекарственных и ветеринарных препаратов иммуномодулирующего действия, предметов медицинского назначения, продуктов функционального питания лечебно-профилактического действия и питательных сред для промыслово-перспективных штаммов микроорганизмов. Получены патенты Украины на способы получения гидролизата из моллюсков, культивирования одноклеточных водорослей, получения питательной основы микробиологических сред и водорастворимой бактерицидной композиции, содержащей наночастицы серебра и др.



## ЖИДКОФАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ТОЛУОЛА ОЗОНОМ – КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Галстян С.Г., Тюпало Н.Ф., Галстян Т.М.*

Институт химических технологий Восточнoукраинского национального университета им. В. Даля, Рубежное, Украина  
e-mail: tov@iht.lg.ua

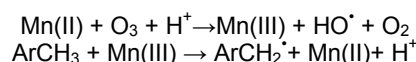
Продукты окисления толуола – бензиловый спирт и бензальдегид широко применяются в органическом синтезе биологически активных веществ. В качестве окислителей толуола в жидкофазных процессах используются высоковалентные соединения хрома и марганца. Процессы характеризуются низкой селективностью и образованием значительного количества токсичных отходов. Перспективным направлением решения этих проблем является использование озона, экологически чистого окислителя.

Озонирование метилбензолов в уксусной кислоте в присутствии каталитических добавок солей металлов переменной степени окисления является перспективным методом получения соответствующих бензойных кислот. Выделить в этих условиях в качестве целевых продуктов ароматические спирты и альдегиды не удается в силу их способности к дальнейшему окислению. В данной работе была изучена возможность торможения процесса окисления на стадии образования соответствующего ароматического спирта и альдегида. Для этого были исследованы окислительные превращения толуола в присутствии уксусного ангидрида, который, являясь сильным ацилирующим агентом, взаимодействует с промежуточными продуктами реакции, ароматическими спиртом и альдегидом, с образованием более устойчивых к окислению ацетатных и ацилальных производных. В отсутствие катализатора окисление осуществляется, главным образом, по двойным связям ароматического кольца с образованием продуктов пероксидного характера. С целью сохранения ароматической структуры и проведения преимущественного окисления по метильной группе предложена методика озонирования в среде уксусного ангидрида в присутствии ацетата марганца (II), бромида калия и серной кислоты. Найдено, что глубина окисления зависит от природы катализатора. В присутствии ацетата марганца (II) селективность окисления по метильной группе при температуре 5°C достигает 90%, среди продуктов реакции идентифицировано бензилацетат (42%), бензилидендиацетат (18%) и бензальдегид (30%). После исчерпывающего окисления толуола в системе накапливается бензойная кислота. В условиях катализа марганецбромидным катализатором окисление останавливается на более глубоких стадиях преимущественно с образованием бензилидендиацетата (71,2%) и бензальдегида (9,8%), также в оксидате обнаружен бензилацетат (9,0%). Суммарная селективность по метильной группе составляет 90%.

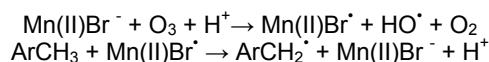
Торможение окисления на стадии образования бензинового спирта и бензальдегида обуславливается переходом гидроксильных и карбоксильных групп в момент их образования в более стойкие к действию озона ацетатные и ацилальные группы: константы скорости реакции озона с бензиловым спиртом и бензальдегидом составляют 3,25 и 2,27 л/(моль·с), а с их ацилированными производными – 0,31 и 0,29 л/(моль·с) соответственно.

Изучена кинетика процесса. Показано, что в условиях катализа накопление продуктов реакции проходит с индукционным периодом, продолжительность которого по времени совпадает со временем перехода марганца (II) в марганец (III). Если катализатор вводится в систему уже в окисленной форме, индукционный период не наблюдается, окисление начинается сразу с максимальной скоростью. Поступление озона в систему необходимо вести непрерывно. Если подача его прекращается, окисление толуола и накопление продуктов реакции сначала замедляется, а потом и совсем останавливается, марганец (III) в это время переходит в марганец (II).

Рассмотренная схема возможных реакций, в соответствии с которой толуол, очевидно, вовлекается в окисления с участием марганца:



В условиях катализа марганецбромидным катализатором включение толуола в окисление протекает по аналогичной схеме:







## ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Федорова Г.А., Теркина И.А., Парфенова В.В.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия  
e-mail: fgalina@mail.ru

Из воды, донных осадков и губок озера Байкал выделено 275 штаммов микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью. Для изучения химического состава биологически активных соединений, продуцируемых байкальскими микроорганизмами, в данной работе исследовали 4 бактериальных штамма, выделенные из байкальских губок – *Lubomirskia baicalensis* (1Lb-06, 7Lb-06 и 15Lb-06) и *Baicalospongia bacillifera* (28Bb-06). Исследуемые культуры были способны значительно подавлять рост условно-патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*. Культуральную жидкость экстрагировали этилацетатом и концентрировали в вакууме для получения сухого остатка. Суммарный микробный экстракт также показал высокую антимикробную активность по отношению к данным тест-культурам.

Для исследования микробного экстракта использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией (ВЭЖХ-УФ). Хроматографические исследования были выполнены на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» с колонкой  $\varnothing$  2x75 мм, упакованной сорбентом Silasorb SPH C-18 с одновременной многоволновой ультрафиолетовой детекцией. Упаренный досуха бактериальный экстракт перерастворяли в 60% водном метаноле (10 мг/мл). Для общей характеристики бактериального экстракта записывали обзорную хроматограмму в градиенте от 2 до 100% метанола в воде. Для идентификации соединений, обладающих антимикробной активностью, бактериальный экстракт был разделен на 12 фракций. Каждая из фракций была выделена в полупрепаративном режиме и исследована на антимикробную активность в отношении *E. faecium*. Результат учитывали по величине диаметра зоны подавления роста вокруг лунки, измеренной в миллиметрах.

Компоненты бактериального экстракта, обладающие антибактериальной активностью, были выделены в виде индивидуальных соединений методом полупрепаративной хроматографии.

Каждое из выделенных соединений охарактеризовали УФ-спектром и массой. По результатам ЖХ-МС предложены молекулярные и структурные формулы.

Масс-спектрометрический анализ активных соединений проводили на ЖХ-МС, оборудованном электрораспылительным источником ионизации и времяпролетным масс-анализатором (TOF) (ESI-o-TOF) «Agilent 1200». Спектр получали в режиме съемки положительных ионов. При проведении хромато-масс-спектрометрического анализа в качестве подвижных фаз использовали: А - 0.25% HCOOH в воде, В - 0.25% HCOOH в ацетонитриле.

Получены первоначальные результаты по химическому составу соединений микробных экстрактов. Показано, что исследуемые штаммы способны продуцировать сразу несколько антибиотических веществ. Вероятно, именно с этим связан широкий спектр антимикробной активности тестируемых микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ - Байкал № 05-05-97271 и междисциплинарного проекта СО РАН № 96.



**APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY TO STUDY  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MICROORGANISMS OF LAKE BAIKAL**

*Fedorova G.A., Terkina I.A., Parfenova V.V.*

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia  
e-mail: fgalina@mail.ru

Two hundred seventy five bacterial strains possessing antagonistic activity have been isolated from water, sediments and sponges of Lake Baikal. To study chemical composition of biologically active compounds produced by the baikalian microorganisms four bacterial strains isolated from baikalian sponges *Lubomirskaja baicalensis* (1Lb-06, 7Lb-06, 15Lb-06) and *Baicalospongia bacillifera* (28Bb-06) have been investigated in the work. These strains were able to suppress the growth of opportunistic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis* significantly. Culture broths were extracted with ethyl acetate and concentrated using vacuum to get solid residue. Crude microbial extracts also showed a high antimicrobial activity towards the test organisms.

To study the microbial extracts a method of high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) has been used. Chromatographic investigations were performed using microcolumn liquid chromatography with the column  $\varnothing$  2x75 mm packed with sorbent Silasorb SPH C-18 with synchronous multiwave UV-detection. The bacterial extract evaporated up to dry condition was dissolved in 60% methanol in water (10 mg/ml). To get the total characteristic of the bacterial extracts density gradient survey chromatograms from 2 to 100% of methanol in water have been recorded. To identify the compounds having antimicrobial activity bacterial extracts were divided into 12 fractions. Each fraction was selected in semi-preparative condition and studied on antimicrobial activity towards *E. faecium*. The results were considered according the diameter of the zone of growth inhibition around test hole.

The components of bacterial extracts possessing antibacterial activity were isolated as individual compounds with the method of semi-preparative chromatography.

UV-spectrum and weight of each isolated compounds have been characterized. According HPLC-MS data molecular and structural formulas have been suggested.

Mass spectrometric analysis of active compounds has been carried out using HPLC-MS equipped with electro-spray source of ionization and time-of-flight mass-analyzer (TOF) (ESI-o-TOF) «Agilent 1200». Spectrum was obtained in regime of survey of positive ions. During chromatography-mass spectrometric analyzes 0.25% HCOOH in water and 0.25% HCOOH in acetonitrile were used as mobile phase.

The primary data of chemical composition of compounds in microbial extracts have been obtained. It was showed that these bacterial strains were able to produce several antibacterial compounds at once. Probably, the wide spectrum of antimicrobial activity of tested bacteria was connected exactly with this fact.

*The work was supported by grant of RFBR-Baikal № 05-05-97271 and by Interdisciplinary project SB RAS № 96.*



## НОВІ БІОАКТИВНІ ПОЛІАКРИЛАМІДНИ ГЕЛІ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ ІМПЛАНТАЦІЙНІ МАТЕРІАЛИ

*Галатенко Н.А., Рожнова Р.А.*

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, Київ, Україна  
e-mail: politoks@merlin.net.ua

Завдяки високому вмісту води, біосумісності та консистенції, яка близька до консистенції м'якої тканини, гідрогелі природного і синтетичного походження привертають увагу клініцистів в зв'язку з їх потенційним застосуванням як імплантаційного матеріалу при проведенні відновлювальних оперативних втручань.

Одним з негативних факторів при застосуванні гідрогелів на основі біополімерів є їх здатність до швидкого хімічного та ферментативного гідролізу, який супроводжується погіршенням властивостей, здатністю до клітинної адгезії (у випадку колагену), що може викликати коагуляцію крові та мінералізацію тканин. Тому, в останні роки все більше своє використання знаходять гідрогелі на основі модифікованих біополімерів або синтетичні гідрогелі з високою біосумісністю, до яких належать поліакриламідні гелі (ПААГ).

Модифікація ПААГ біологічно-активними сполуками дозволить отримати нові біологічно активні імплантаційні матеріали, що функціонують за принципом зворотного зв'язку й здатні забезпечувати тривалу рівномірну подачу біологічно активної речовини в активній формі в орган-мішень.

Мета представленої роботи полягала в створенні нового удосконаленого біосумісного поліакриламідного гелю із стабільною структурою до впливу оточуючого середовища організму та розробці на його основі біологічно активного полімерного матеріалу пролонгованої дії, який містить відомий протитуберкульозний лікарський препарат ізоніазид.

Біосумісний зшитий поліакриламідний гель одержували шляхом вільної радикальної полімеризації акриламіду та N,N'-метилен-біс-акриламіду в натрій фосфатному буферному розчині (рН 8,0–9,5) в присутності окислювальної відновлювальної ініціюючої системи. Для надання поліакриламідному гелю в'язкопружних властивостей була проведена його хімічна модифікація оліго-N-вінілпіролідом (ПВП). Вміст ПВП варіювали в межах від 0,3 до 1 % від вмісту акриламіду. Модифікація ПААГ оліго-N-вінілпіролідом дозволила отримати новий поліакриламідний гідрогель, який здатен утримувати зшиту воду в полімерній системі за рахунок збільшення молекулярної ваги полімерного носія та запобігти фрагментації гідрогелю при його подальшій імплантації.

Спектрофотометрично досліджено процеси сорбції та десорбції отриманих гідрогелевих систем відносно протитуберкульозного препарату ізоніазиду. Питому сорбцію ізоніазиду - кількість ізоніазиду, сорбованого в процесі набрякання 1 г кожного зразка – розраховували виходячи з питомого поглиненого об'єму (мл/г) при набряканні зразків гідрогелю в буферному середовищі з 0,01 % концентрацією ізоніазиду.

При витримуванні набухлих полімерів у фізіологічному розчині при 37 °С відбувається десорбція ізоніазиду в розчин. Встановлено, що збільшення вмісту ПВП в складі гідрогелю сприяє збільшенню вивільнення ізоніазиду протягом 9 діб. Для зразка, що містить максимальну кількість ПВП (1 %), вихід ізоніазиду має більш пролонгований характер (18 діб) при цьому загальна кількість препарату, що вийшов зменшується. Таким чином, варіюванням вмісту оліго-N-вінілпіролідону в складі ПАА, зміною рН буферного розчину, як середовища сорбції, можна регулювати вміст лікарської речовини в ПААГ, час та кількість її вивільнення.

Біосумісність біологічно активного матеріалу з ізоніазидом вивчали експрес методом токсикологічної оцінки культури тканин та за гістологічною методикою при імплантації експериментальним тваринам. Встановлено, що на ранніх етапах (3-7 діб культивування) ріст клітинних елементів гнітвся за рахунок вивільнення ізоніазиду. На 10 добу спостереження істотної зміни росту та розвитку клітинних елементів не спостерігалось. Проведені дослідження дозволили зробити висновок про відсутність гістотоксичного впливу зразків гідрогелевих матеріалів на культивовані клітини.

Проведене порівняльне вивчення сполучнотканинних реакцій на імплантацію зразків поліакриламідного гелю тривіального складу (ПААГ), поліакриламідного гелю, модифікованого ПВП (ПААГ-ПВП) та ПААГ-ПВП з ізоніазидом. Встановлено, що наявність ПВП в складі гідрогелю послаблює ступінь реакції організму на імплантат і сприяє більш швидкій нормалізації тканинних структур навколо зразка. Біологічно активна дія пролонгованої форми ізоніазиду полягала в нормалізації кровоносного русла та інгібуванні процесів судино утворення в сполучнотканинній капсулі, яка оточує імплантований матеріал.

Отримані результати відкривають перспективу подальших досліджень зазначених гідрогелевих матеріалів як систем направленої і контрольованої вивільнення лікарських препаратів.



## THE NEW BIOACTIVE POLYACRYLAMIDE GELS AS PERSPECTIVE IMPLANTATION MATERIALS

*Galatenko N.A., Rozhnova R.A.*

Institute of Macromolecular Chemistry of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: politoks@merlin.net.ua

Due to high water content, biocompatibility and consistency, that is close to the consistency of soft tissues, natural and synthetic hydrogels origin attract the attention of clinicians in relation to their potential use as implantation material at surgical interventions.

One of the negative factors in the application of hydrogels on base of biopolymers is their ability to rapid chemical and enzymatic hydrolysis, that is accompanied by a deterioration of properties, the ability of cell adhesion (in the case of collagen), which can cause blood coagulation and tissue mineralization. Therefore, in recent years, increasing its use hydrogels on base of modified biopolymers or synthetic hydrogels with high biocompatibility, including polyacrylamide gel (PAAG).

Modification of PAAG by biologically active compounds will provide new biologically active implantation materials that operate on the principle of feedback and can even forward to long delivery of biologically active substances in the active form in the target organ.

The purpose of the presented work is creating new advanced biocompatible polyacrylamide gel with a stable structure to the effects of organism environment and development on its based of biologically active polymer material of prolonged action, which has known anti-tuberculous drug isoniazid.

Biocompatible polyacrylamide gel were synthesized by free radical polymerization acrylamid and N,N'-bis-methylen-bis-acrylamid in sodium phosphate buffer (pH 8,0-9,5) in the presence of oxidative recovery initiating system. To provide the viscoelastic properties of polyacrylamide gel was its chemical modification by oligo-N-vinylpyrrolidone (PVP). PVP content varied between 0.3 to 1% of the content acrylamid. Modification PAAG by oligo-N-vinylpyrrolidone allowed to get a new polyacrylamide hydrogels, which could hold cross-linked water into polymer system by increasing the molecular weight of polymeric carrier and prevent the fragmentation of hydrogels with its subsequent implantation. The processes of sorption and desorption obtained hydrogel systems against anti-tuberculous drug isoniazid were investigated by spectrophotometrically.

Specific sorption isoniazid - isoniazid number, retained in the swelling of 1 g of each sample - calculated based on the specific volume absorbed (ml/g) in the samples swelling hydrogels in the buffer medium with 0.01 % concentration of isoniazid.

With aging swelled polymers in physiological saline at 37 °C is desorption isoniazid in solution. It was established that increasing the content of PVP in the hydrogel promotes increasing release of isoniazid for 9 days. For a sample that contains the maximum number of PVP (1%), isoniazid output has more prolonged nature (18 days) while the total number of drugs out decreases. Thus, the content of drug substances in PAAG, time and number of its release can regulate by the variation of content oligo-N-vinylpyrrolidone in the PAA, the change of pH buffer solution, as the sorption medium

Biocompatibility biologically active material with isoniazid was studied by rapid toxicological evaluation of tissue culture and histological methods for implantation in experimental animals. Established that at early stages (3-7 days of cultivation) the growth of cellular elements inhibits by the release of isoniazid. At the 10 day observation of substantial changes in growth and development of cellular elements is not observed. Our studies allow concluding that the lack of histotoxic influence of hydrogel materials samples on cultured cells.

The comparative study of connective-tissue reactions on implantation samples polyacrylamide gel trivial structure (PAAG), polyacrylamide gel modified PVP (PAAG-PVP) and PAAG-PVP with isoniazid was carrying out. It was established that the presence of PVP in the hydrogel structure weakens the body's reaction to the implant and promotes a more rapid normalization of tissue structures around the sample. Biologically active action of prolonged form of isoniazid was normalization of blood circulation and inhibition of vessel formation in connective-tissue capsule, which surrounds the implanted material. The results open the perspective for further research of these hydrogel materials as drug delivery systems.



## ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ТА СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАКТИВ СЕЛЕЗІНКИ ТА ШКІРИ

*Гальченко С.Є., Салієнко І.А., Шиндер А.В., Дюбко Т.С.*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

В даний час не викликає сумніву, що пептидна регуляція відіграє важливу роль як в підтриманні гомеостазу організму в нормі, так і при різноманітних патологічних станах. Встановлено також, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят стимулюють репаративні процеси при патологіях відповідних органів. Така біологічна дія екстрактів пов'язується з наявністю в них регуляторних пептидів. Тому дослідження пептидного складу екстрактів має важливе значення для розуміння механізму їх дії та для стандартизації біологічних препаратів на основі екстрактів тканин.

Метою роботи було встановити тканинспецифічність складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів та склад екстрактів шкіри в залежності від її фізіологічного стану.

Екстракти фрагментів шкіри та селезінки отримували з кріоконсервованих фрагментів шляхом їх інкубації в фізіологічному розчині. Термолабільні білки видаляли. Екстракти шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) та селезінки свиней (ЕСС) з концентрацією пептидів 100 мкг/мл уводили в черевну порожнину по 1 мл 1 раз на добу. Екстракти нативної та травмованої шкіри отримували інкубуванням фрагментів шкіри в фізіологічному розчині протягом 60 хв. Для визначення молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах використовували вискоефективну гель-проникаючу хроматографію. Спектрофлуориметричні вимірювання проводили на спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse. Перед нанесенням травм шкіру епілізували в ділянці стегна. Три паралельні різані рани завглибшки 2 мм, завдовжки 10 мм наносили з інтервалом 5 мм. Термічні травми наносили мідним аплікатором діаметром 10 мм з температурою 100 і -196°C, експозиція 35 і 60 с відповідно. Опромінення ультрафіолетом проводили еритемною лампою з відстані 10 см на протязі 10 хв.

Встановлено, що молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах залежить як від біологічного матеріалу, з якого одержано екстракт, так і від віку тварин. На хроматограмі екстракту селезінки свиней реєструється 4 піки. На хроматограмі шкіри поросят реєструється 5 піків, а на хроматограмі екстракту шкіри свиней – 7.

Спектри флуоресценції екстрактів селезінки та шкіри свиней і поросят відрізняються між собою за формою та інтенсивністю, що свідчить про різний амінокислотний склад пептидів. Спектри флуоресценції тканинних екстрактів знаходяться в області 290–450 нм. При збудженні світлом з довжиною хвилі 280 нм максимум спектрів флуоресценції знаходиться в області 340–354 нм, що може свідчити про наявність в екстрактах доступних розчиннику залишків триптофану. При збудженні світлом з довжиною хвилі 296 нм в екстрактах селезінки вклад флуоресценції триптофанів виявився найменшим.

Відмінності, які спостерігаються в спектрах флуоресценції тканинних екстрактів підтверджують дані, що до їх складу входять пептиди та небілкові компоненти, які відрізняються по кількісному співвідношенні та амінокислотному складу.

Синхронні спектри флуоресценції представляють собою суперпозицію спектрів флуоресценції, зареєстрованих при різних величинах зсуву монохроматорів збудження і флуоресценції, і, таким чином, можуть бути використані для якісного аналізу екстрактів. Це дозволяє, не проводячи визначення окремих компонентів екстракту, його ідентифікувати. При цьому порівняння синхронних спектрів флуоресценції екстрактів, які в ряді випадків дозволяють виділити складові з багатокомпонентних сумішей, дають можливість виявити не тільки розбіжності в складі екстрактів, що досліджуються, але й отримати їх індивідуальні спектральні топограми, які являють собою, по суті, спектральні характеристики відповідних екстрактів. Одержані дані підтверджують можливість ідентифікувати екстракти по топограмах їх синхронних спектрів, і такий підхід може бути використаний при стандартизації препаратів, біологічна дія яких заснована на наявності в них регуляторних пептидів.

Ми також дослідили, як уведення екстракту шкіри або селезінки в черевну порожнину впливає на спектр пептидів нормальної шкіри. На хроматограмі нативної шкіри шурів реєструється пік, що відповідає пептидам з м.м. більшою за 10000, і два піки, що відповідають пептидам з м.м. 1438 і 1087. На третю добу уведення екстрактів кількість піків на хроматограмах значно збільшується. Але якщо на 7-у добу уведення ЕШНП кількість піків зменшується до 3-х, то при уведенні ЕСС вона збільшується на один пік. Це може бути пов'язано з тим, що дія ЕШНП тканинспецифічна, а дія ЕСС опосередковується завдяки нормалізації кількості і функціональної активності лімфоцитів, які приймають активну участь в регуляції регенерації.

Загальним для всіх видів травм, але відсутній на хроматограмі нативної шкіри, є пік, який відповідає речовинам пептидної природи з м.м. 8800. Але кількість цих пептидів у відсотковому відношенні при різних травмах різна. Можна припустити, що саме ці речовини регулюють неспецифічну відповідь шкіри на травму незалежно від виду пошкодження. Найбільша кількість піків спостерігається на хроматограмах екстрактів шкіри після холодової травми та ультрафіолетового опіку, а найменша - при опіковій травмі. Такий характер молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах може свідчити про різні механізми та ступінь пошкодження тканинних структур, а отже і про різні механізми специфічної відповіді на травму, які проявляються в продукції необхідних в кожному випадку пептидів для регуляції протікання процесів запалення та регенерації.



## CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROFLUORIMETRIC STUDIES OF SPLEEN AND SKIN EXTRACTS

*Galchenko S.E., Salienko I.A., Shinder A.V., Dyubko T.S.*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Nowadays beyond the question is the fact of important role of peptide regulation in maintaining organism's homeostasis both in the norm and under different pathological states as well. The extracts of cryopreserved fragments of pig and piglet's organs were revealed to stimulate the reparative processes under corresponding organs' pathologies. This biological effect of extracts is associated to the presence of regulatory peptides in them. Therefore of importance is studying the composition of peptide extracts to understand their effect mechanisms and to standardize the tissue extract-based biological preparations

The research aim was to establish the tissue-specificity of extract composition of organs' cryopreserved fragments and skin extracts' composition depending on its physiological state.

Skin and spleen fragment extracts were derived from cryopreserved fragments by their incubation in physiological solution. The thermolabile proteins were removed. The extracts of newborn piglets' skin (ENPS) and those of pig spleen (EPS) with 100 µg/ml peptide concentration were injected into abdominal cavity by 1ml once per day. Extracts of native and traumatized skin were procured by skin fragments' incubation in physiological solution within 60 min. In order to determine molecular-mass distribution of substances of peptide origin in the extracts we used highly-efficient gel-penetrating chromatography. Spectrofluorimetric measurements were realized with Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. Skin was epilated in femur site before traumatizing. Three parallel incised wounds of 2-mm depth and 10-mm length were made with 5 mm interval. Thermic traumas were made with copper applicator of 10 mm diameter with 100 and -196°C temperature, 35 and 60 sec exposures, correspondingly. Ultraviolet radiation was applied with sunlamp at 10-cm distance for 10 min.

Molecular-mass peptide distribution in extracts was established to be dependent on both biological material, from which the extract was procured and on animal age as well. Four peaks were recorded in chromatogram of pig spleen extract. Five and seven peaks were recorded in chromatograms of piglets' skin and pig's skin extracts, correspondingly.

Fluorescence spectra of spleen and skin extracts of pigs and piglets differ by the form and intensity, that testifies to a different aminoacid peptide composition. Fluorescence spectra of tissue extracts are within 290-450 nm range. During light excitation with 280 nm wavelength the maximum of fluorescence spectra is within 340-354 nm range, that may testify to the presence in extracts of triptophane residuals, accessible for solvent. During light excitation with 296 nm wavelength the contribution of triptophane fluorescence occurred to be the least in spleen extracts.

The differences, observed in fluorescence spectra of tissue extracts confirm these data about peptides and non-protein components, differing by quantitative ratio and aminoacid composition, as a part of their composition.

Synchronous fluorescence spectra represent the superposition of fluorescence spectra, recorded at different shift values of excitation and fluorescence monochromators and thereby may be used for qualitative analysis of extracts. It enables its identification without determining some of extract components. At the same time the comparison of synchronous fluorescence spectra of the extracts, enabling in some cases to isolate the components from multicomponent mixtures, makes it possible to reveal not only the differences in studied extract composition, but obtain their individual spectral topograms, intrinsically representing the spectral characteristics of corresponding extracts. The data obtained confirm the possibility to identify the extracts by their synchronous spectra topograms and this approach may be used to standardize the preparations, biological effect of which is based on the presence of regulatory peptides in them.

We have also studied the way how skin or spleen extract's introduction into abdominal cavity affects the normal skin peptides. One peak, corresponding to peptides with molecular weight higher than 10,000 and two ones, corresponding to those with 1438 and 1087, are recorded in rat native skin chromatogram. To the 3<sup>rd</sup> day of extract introduction there is an increase of peak number in chromatograms. However if to the 7<sup>th</sup> day of ENPS introduction the peak number reduces to 3, it augments by 1 under EPS. This may be associated to the fact, that the ENPS effect is tissue-specific, and the EPS one is mediated due to normalization of number and functional activity of lymphocytes, which take an active part in regeneration regulation.

The peak, corresponding to the substances of peptide origin with 8800 mw is the common for all types of trauma, but absent in native skin's chromatogram. However the number of these peptides in percentage ratio under various traumas is different. We may assume that namely these substances regulate a non-specific skin response on trauma independently on trauma type. The highest number of peaks is observed in skin extract's chromatograms after cold trauma and ultraviolet burn, and the lowest one at burn trauma. This character of molecular-mass distribution of peptide-originated substances in extracts may testify to different mechanisms and extent of damages in tissue structures, and consequently to various mechanisms of specific response to trauma, which manifest in producing peptides, necessary in each case to regulate the inflammatory and regenerative process proceeding.



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ В ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЯХ – ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА МЕТОДОМ ОФ ВЭЖХ

*Георгиевский Г.В., Куликов А.Ю., Мазур И.А.*

Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств,  
Запорожский Государственный Медицинский Университет, Запорожье, Украина  
e-mail: krakogen@mail.ru

В настоящее время обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) является самым распространенным методом, который используется в фармацевтическом анализе для контроля качества лекарственных средств и субстанций.

Одним из основных показателей контроля качества лекарственных субстанций являются показатели родственные или сопутствующие примеси. Данный показатель важен как при контроле качества субстанции при производстве (контроль содержания остаточных количеств исходных веществ, полупродуктов синтеза и вторичных продуктов синтеза), так и при исследовании стабильности субстанции в процессе хранения (продукты разложения).

Широкий интерес вызывают органические соединения - производные 1,2,4-триазола, многие из которых обладают тем или иным физиологически-активным действием и могут быть использованы как лекарственные субстанции для производства фармацевтических препаратов.

Одними из представителей таких органических соединений являются тиотриазолин (морфолиниевая соль 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты) и кардиотрил (1-(β-фенилэтил)-4-амино-(п-диметиламинобензальдегид)-1,2,4-триазолия бромид).

Тиотриазолин – высокоэффективный антиоксидантный, противовирусный, противовоспалительный препарат, стимулирующий процессы регенерации в миокарде, печени и других органах.

Кардиотрил проявляет противоишемическое, вазодилататорное, мембраностабилизирующее и фибринолитическое действие. Препараты созданы коллективом автором под руководством профессора Мазура Ивана Антоновича.

Для контроля чистоты вышеуказанных субстанций был использован метод ОФ ВЭЖХ в режимах изократического и градиентного элюирования. Используя колонки, заполненные сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами, нами были разработаны и валидированы методики контроля содержания примесей в субстанциях тиотриазолина и кардиотрила.

Валидация ВЭЖХ методик определения примесей проводилась согласно требованиям [1-3]: методика должна обеспечивать отделение всех примесей от определяемого вещества. Для этого использовались как стандартные образцы индивидуальных веществ-примесей, так и другой подход – принудительное получение примесей из исследуемой субстанции путем различных способов ее деструкции: нагревание (50-60 °С), облучение жестким УФ-светом, кислотный (0,1 М раствор HCl) или щелочной (0,1 М раствор NaOH) гидролиз, окисление субстанции (3% раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). При анализе полученной смеси основное вещество должно хорошо отделяться от возможных продуктов его разложения.

Полученные результаты были применены при разработке готовых лекарственных форм и включены в нормативно-аналитическую документацию.

### **Литература:**

1. International Conference of Harmonization, Q2A: Text on validation of analytical procedures. (1995) US FDA Federal Register, V. 60, March
2. International Conference of Harmonization, Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. (1997) US FDA Federal Register, V. 62, May
3. Державна Фармакопея України. Перше видання. – Харків.: «PIPEГ», 2001.- 531 с



**SYNTHESIS OF 2-(2,5-DICHLOROPHENYL)-2,3-DIHYDRO-3-HYDROPEROXY-4,5-DIMETHYLISOTHIAZOLE 1,1-DIOXIDE AND ITS OXIDATION ABILITY**

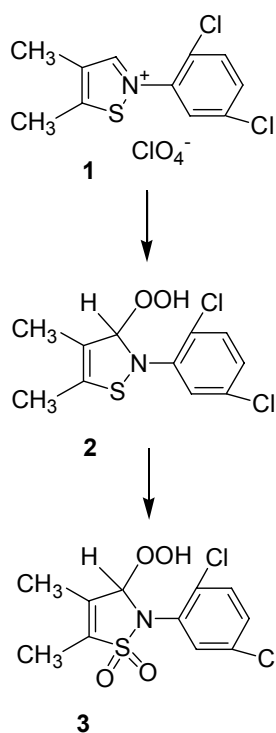
Makota<sup>a</sup> O., Wolf<sup>b</sup> J., Trach<sup>a</sup> Yu., Schulze<sup>b</sup> B.

<sup>a</sup> Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine,  
e-mail: makotaoksana@yahoo.com

<sup>b</sup>Institute of Organic Chemistry, Leipzig University, Leipzig, Germany

A large number of biologically active and important compounds, in particular "sulpha" antibiotics, contain sulphonamide moiety. Therefore, during many years a great interest has been focused on sulfonamides especially to their cyclic variants (sultams). Sultams were identified as useful heterocycles for medicinal chemistry, veterinary therapeutics and chemical methodology. They show biological activities such as antibacterial, peptiomimetic, anticonvulsant and sedative-hypnotic activities. They were identified as inhibitors of cysteine proteases and human leukocyte elastase. Sultams can serve as chiral auxiliaries in several asymmetric processes such as Diels-Alder reactions, alkylations, dihydroxylation and as oxidants in oxidation of heteroatoms (N, S, P) and additionally can be used in enantioselective catalysis. Among these compounds  $\alpha$ -hydroperoxy sultams attract especial attention as a new class of hydroperoxides.

The main aim of this work is the synthesis of  $\alpha$ -hydroperoxy sultam, 2-(2,5-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-dimethylisothiazole 1,1-dioxide and its investigation as oxidant in the interaction with cyclooctene catalyzed by molybdenum boride MoB as a effective catalysts for the hydroperoxide oxidation of unsaturated compounds.



**Scheme 1**

This indicates that 2-(2,5-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-dimethylisothiazole 1,1-dioxide **3** exhibits the oxidation ability in the interaction with cyclooctene catalyzed by molybdenum boride MoB.

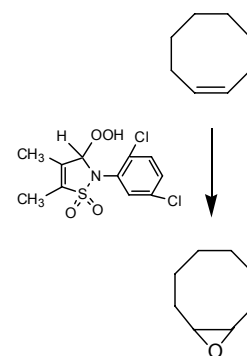
The work was supported by the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) and by the Graduiertenkolleg 378 "Mechanistische und Anwendungsaspekte nichtkonventioneller Oxidationsreaktionen".

Our approach to 2-(2,5-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-dimethylisothiazole 1,1-dioxide started from isothiazolium salt **1** which was prepared for the first time by intramolecular cyclocondensation of  $\beta$ -thiocyanatovinyl aldehyde and the suitably substituted aniline in the presence of perchloric acid in acetic acid. The oxidation of the 4,5-dimethylisothiazolium salt **1** with 30%  $H_2O_2$  in glacial acetic acid at room temperature gave stable 2-(2,5-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-dimethylisothiazole 1,1-dioxide **3** in moderate-to-good yield (60%). The mechanism of the oxidation is shown in Scheme 1.

The interaction of **3** with cyclooctene catalyzed by MoB was carried out in a thermostated glass reactor fitted with a reflux condenser and a magnetic stirrer under an argon atmosphere at temperature 23°C.

The reactor was loaded with 0.005 g of catalyst, 0.3 ml of cyclooctene, 3.5 ml chloroform as solvent and 0.01 mol  $l^{-1}$  of **3**.

It was established that under the reaction condition the interaction of **3** with cyclooctene in the presence of MoB proceeded with formation of 1,2-epoxycyclooctane as is shown in Scheme 2. The yield of 1,2-epoxycyclooctane was equal 27% after 4 hours of reaction. Additionally, it was shown that in the absence of catalyst in the reaction system 1,2-epoxycyclooctane was not formed under the reaction conditions.



**Scheme 2**



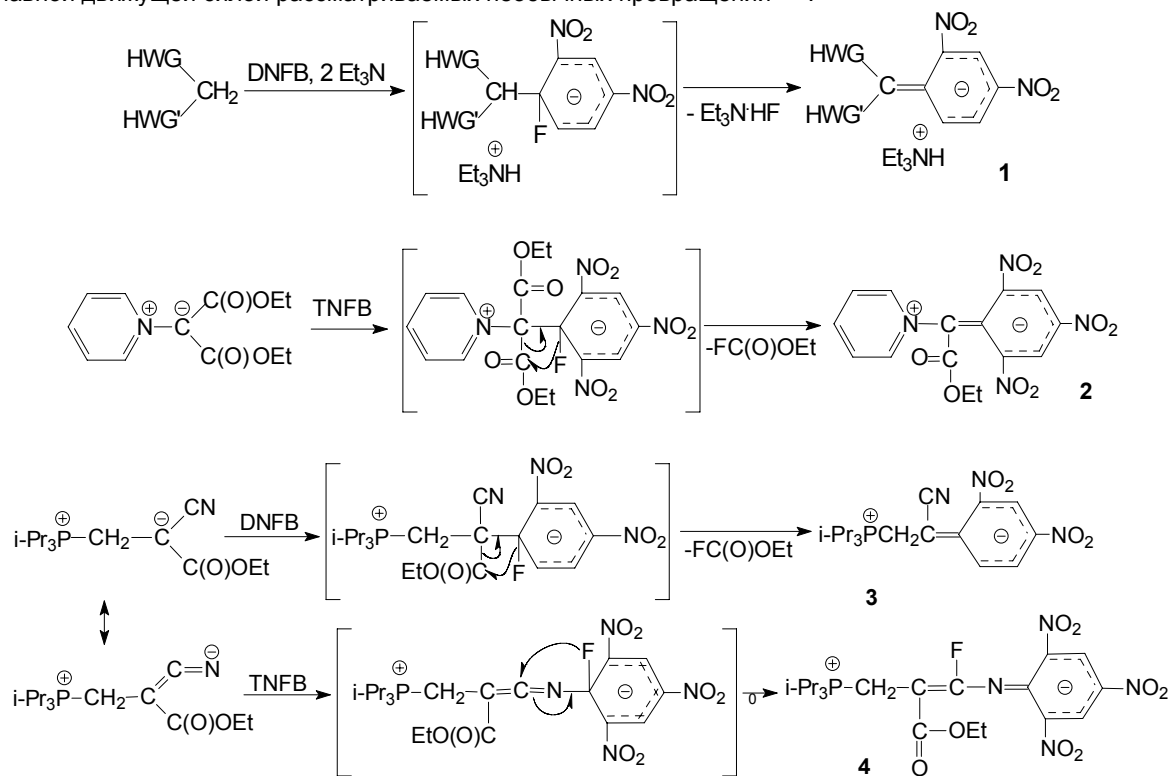


**БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫЕ ОТРИЦАТЕЛЬНО-ЗАРЯЖЕННЫЕ ПОЛИЕНЫ – ПРОДУКТЫ РЕАКЦИЙ С-НУКЛЕОФИЛОВ С ПОЛИНИТРОФТОРБЕНЗОЛАМИ**

Гололобов Ю.Г.

Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук,  
Москва, Российская федерация  
e-mail: Yugol@ineos.ac.ru

Стабильные соли органических оснований и сопряженные цвиттер-ионы – соединения, содержащие отрицательно-заряженные фрагменты, как, например, **1** и **2-4** до наших публикаций оставались, не известны. В то же время синтез глубокоокрашенных, стабильных органических солей **1** и цвиттер-ионов **2-4** с высокосопряженным, отрицательно-заряженным анионным фрагментом представляет определенный интерес не только с теоретической точки зрения, но и как биологически-активные соединения широкого спектра действия. Нами обнаружены новые типы реакций нуклеофильного ароматического замещения атома фтора в 2,4-динитрофтор- (DNFB) и 2,4,6-тринитрофторбензоле (TNFB), которые приводят не к ароматическим производным, как обычно в реакциях нуклеофильного ароматического замещения, а к отрицательно заряженным соединениям с системой сопряженных связей - гептатриенам **1-3** и азаоктатетраенам **4**. Образование системы сопряженных связей в соединениях **1-4** является, очевидно, главной движущей силой рассматриваемых необычных превращений<sup>1-3</sup>.



**Литература:**

1. Yu.G.Gololobov et al., Heteroatom Chem., 2007, **18**, 108-115.
2. Yu.G.Gololobov et al., Heteroatom Chem., 2007, **18**, 421-424.
3. Yu.G.Gololobov et al., Mendeleev Communications, 2007, **17**, 232-233.

Работа поддержана Грантом РФФИ (Проект № 03-08-00196)

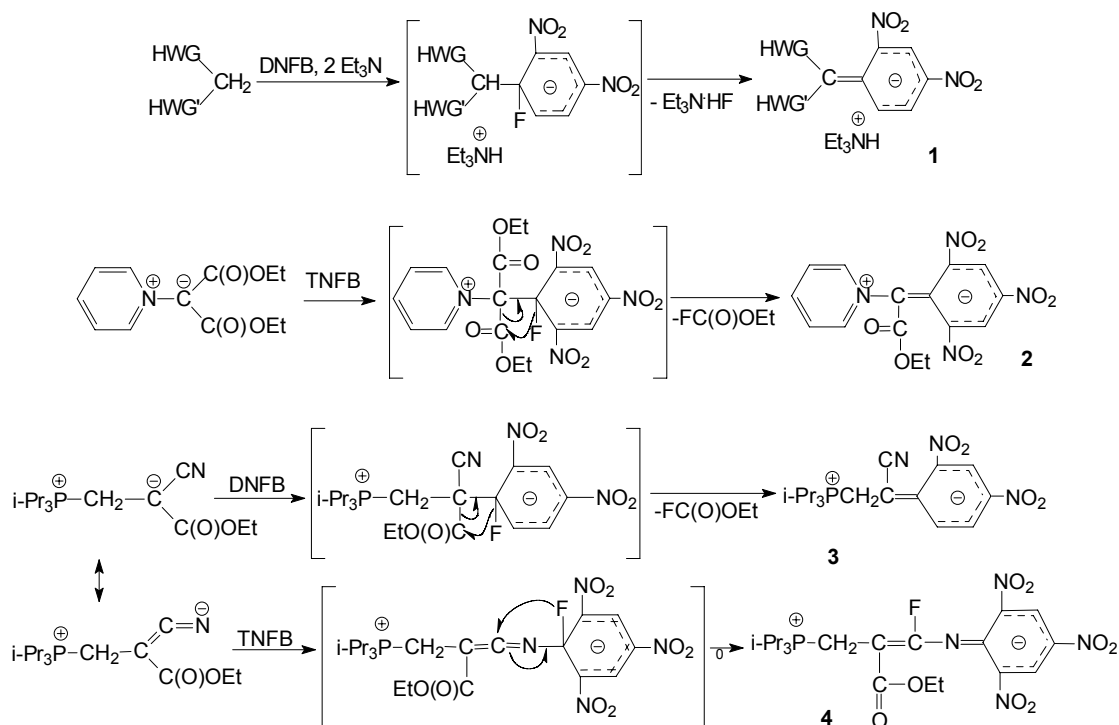


**BIOLOGICAL ACTIVE NEGATIVELY CHARGED POLYENES – RESULT OF REACTIONS OF C-NUCLEOPHILES WITH POLYNITROFLUOROBENZENES**

Gololobov Y. G.

A.N.Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds, Russian Academy of Science, Moscow, Russia  
e-Mail: Yugol@ineos.ac.ru

Stable salts or zwitterion conjugates, i.e., compounds containing negatively-charged moieties as, for example, **1** and **2-4** have not been described till yet. The development of new methods to synthesize highly conjugated, deeply colored stable organic salts **1**, pyridinio heptatrienide **2**, phosphonio heptatrienide **3** and azaoctatetraene **4** zwitterions may be of interest as biology active compounds. We report new reactions of carbanions with 2,4-dinitro- (DNFB) and 2,4,6-trinitrofluorobenzenes (TNFB) leading to new stable salts **1** with the system of conjugated bonds and N- and P-containing zwitterions with heptatriene **2**, **3** and azaoctatetraene **4** moieties. The formation of the conjugated bond systems in **1-4** is, apparently, the main driving force of these unusual transformations which result in polyenes **1-4**, containing negatively-charged moieties rather than aromatic compounds [1-3].



**References:**

1. Yu.G.Gololobov et al., Heteroatom Chem., 2007, **18**, 108-115.
2. Yu.G.Gololobov et al., Heteroatom Chem., 2007, **18**, 421-424.
3. Yu.G.Gololobov et al., Mendeleev Communications, 2007, **17**, 232-233.

This work was financially supported by RFBR (Project № 03-08-00196)

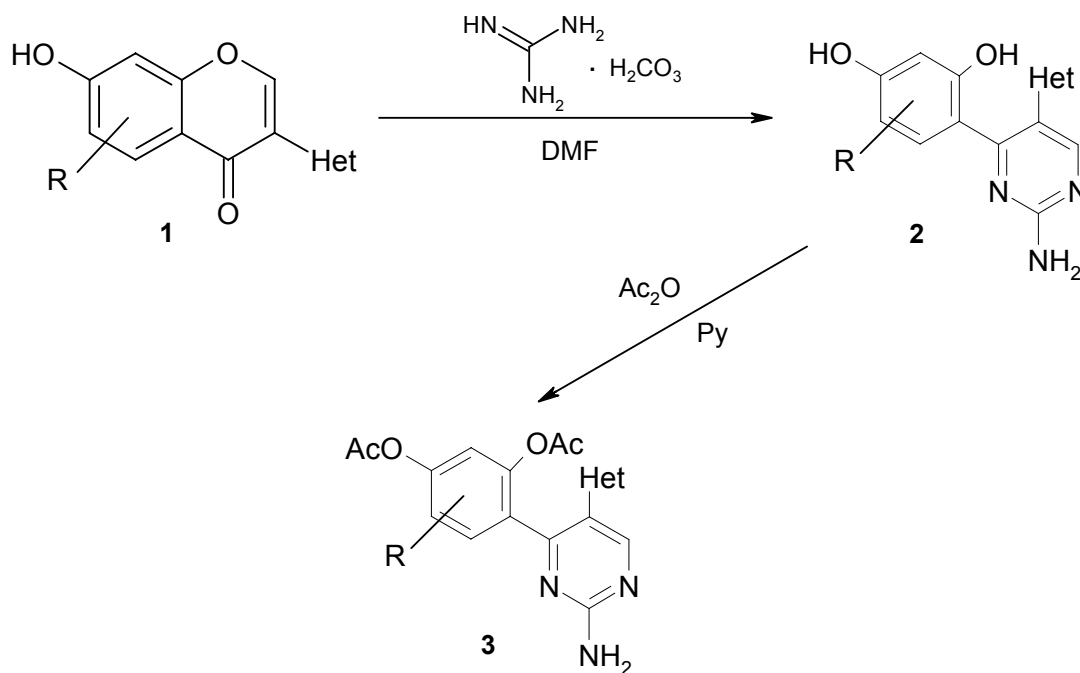


## ПИРИМИДИНЫ НА ОСНОВЕ 3-АЗАГЕТАРИЛХРОМОНОВ

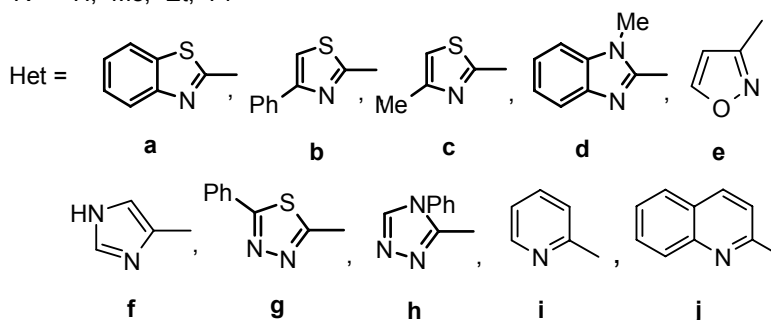
Горбуленко Н.В., Хиля В.П.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина  
e-mail: shablykina@univ.kiev.ua

Известно, что хромоны являются перспективными синтонами для синтеза биологически активных пиримидинов. Новые 2-аминопиримидины **2** были получены с выходом 75-90% в результате реакции рециклизации 7-гидрокси-3-азагетарилхромонов **1** под действием гуанидина. Скорость рециклизации существенно зависит от природы азагетероцикла в положении 3 исходного хромона. Было найдено, что ацилирование 2-аминопиримидинов **2** уксусным ангидридом в пиридине приводит к пиримидинам **3**. В случае соединения **3f** ацилирование проходит также и по NH-группе имидазольного кольца.



R = H, Me, Et, Pr



Структура синтезированных соединений подтверждена данными ЯМР  $^1\text{H}$ , спектроскопии и элементного анализа.



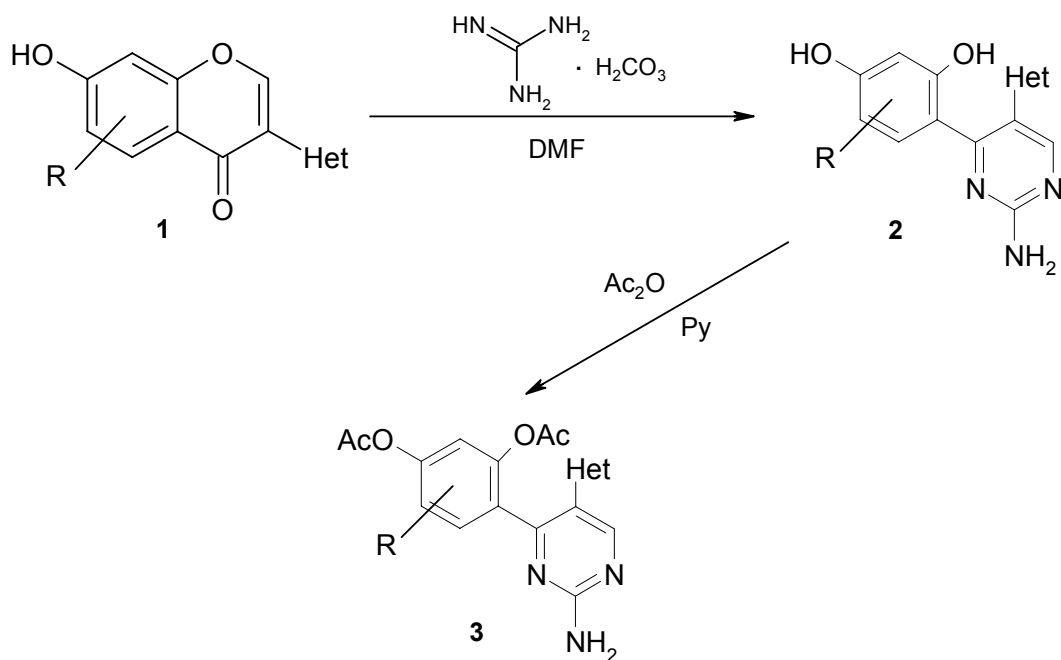
PYRIMIDINES BASED ON 3-AZAHETARYLCHROMONES

Gorbulyenko N.V., Khilya V.P.

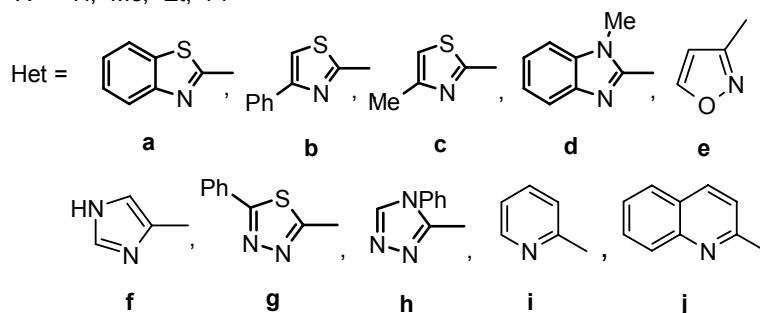
Department of Chemistry, Kyiv Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine

e-mail: shablykina@univ.kiev.ua

The interest in chromones as substrates for the synthesis of biologically active pyrimidines led us to study the reactions of 7-hydroxy-3-azahetarylchromones **1** with guanidine. The recyclization occurred in 75-90% yields with the formation of new 2-aminopyrimidines **2**. The rate of recyclization depends considerably on the nature of the azaheterocycles at position 3 of the starting chromones. We also found that acylation of 2-aminopyrimidines **2** with anhydrous acetic anhydride in pyridine leads to pyrimidines **3**. In the case of compound **3f** the acylation occurs also at NH-group of imidazole nucleus.



R = H, Me, Et, Pr



The structure of all synthesized compounds was proved by the data of NMR <sup>1</sup>H spectroscopy and elemental analysis.



**ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОАКТИВНО-МЕЧЕННЫХ АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ АРАХИДОНОВОЙ  
КИСЛОТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ N-КОНЦЕВЫМ И  
КАТАЛИТИЧЕСКИМ C-КОНЦЕВЫМ ДОМЕНАМИ 12/15-ЛИПОКСИГЕНАЗ**

Гроза<sup>1</sup> Н. В., Иванов<sup>1,2</sup> И. В., Мягкова<sup>1</sup> Г. И., Кюн<sup>2</sup> Х.

<sup>1</sup>Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

e-mail: miagkova@mail.ru

<sup>2</sup> Институт биохимии, университетская клиника Шарите, университет им. Гумбольдта,  
Берлин, Германия

Липоксигеназы (LOXs) представляют собой семейство ферментов перекисного окисления липидов и катализируют диоксигенацию полиненасыщенных жирных кислот до соответствующих гидропероксипроизводных. LOXs растений и млекопитающих состоят из единых полипептидных цепей, собранных в двухдоменную структуру. Большой C-концевой домен считается каталитической субъединицей, так как он содержит каталитически активное негемовое железо и субстрат-связывающий карман. Детальное исследование рентгеновской структуры фермента показало, что в целом структуры обоих доменов довольно стабильны, однако N-концевой бета-домен способен двигаться как самостоятельная единица относительно каталитической субъединицы. В соответствии с новыми данными экспериментов по рентгеновскому рассеянию, 12/15-LOX демонстрирует высокую степень структурной изменчивости, причем наблюдается движение двух доменов относительно друг друга.

Кроличья ретикулоцитарная 15-липоксигеназа способна окислять биомембраны и липопротеины без предварительного действия ферментов расщепления липидов. Эта реакция требует эффективного связывания фермента с мембраной, и N-концевой домен может участвовать в данном процессе. Для изучения влияния N-концевого домена кроличьей 12/15-LOX на мембранное связывание и каталитическую активность были применены природный фермент и его точечные мутанты в области бета-домена. Полученные результаты показали, что N-концевой домен не так важен для окисления жирных кислот, но содержит аминокислотные детерминанты, необходимые для мембранного связывания. Более того, белок с мутантным N-концевым доменом подвергается более быстрой пероксид-индуцированной суицидальной инактивации, чем фермент дикого типа.

Был разработан метод полного химического синтеза 18-азидо- и 19-азидо-(5Z,8Z,11Z,14Z)-эйкозатетраеновых кислот и их [5,6,8,9,11,12,14,15,<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]-аналогов через соответствующие тозилаты. Данный синтетический подход позволяет получать радиоактивно-меченные производные арахидоновой кислоты в рамках общей синтетической схемы. Применяя серию радиоактивно-меченных липоксигеназных субстратов, несущих фотореактивную азидогруппу (азидо-ETE), в качестве аффинных зондов, мы наблюдали строгое мечение пептидных фрагментов, принадлежащих N-концевому бета-домену. Эти результаты показывают, что и взаимодействие фермент/субстрат, фермент/продукт, и пероксид-зависимая суицидальная инактивация LOXs регулируются при помощи бета-домена.

*Исследование частично поддержано грантом № 2.1.1/2889 целевой ведомственной программы «Развитие научного потенциала высшей школы».*



**APPLICATION OF RADIOACTIVELY LABELLED ARACHIDONIC ACID AZIDODERIVATIVES TO INVESTIGATE INTERACTION BETWEEN N-TERMINAL AND CATALYTIC C-TERMINAL DOMAINS OF 12/15-LIPOXYGENASES**

*Groza Natalya V.<sup>1</sup>, IvanovIgor V.<sup>1,2</sup>, Myagkova Galina I.<sup>1</sup>, Kuhn Hartmut<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russian Federation  
e-mail: miagkova@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Lipoxygenases (LOXs) form a heterogeneous family of lipid-peroxidizing enzymes that catalyze the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids to their corresponding hydroperoxy derivatives. Plant and mammalian LOXs constitute single polypeptide chains that are folded into a two-domain structure. The large C-terminal domain may be considered as catalytic subunit because it contains the catalytically active non-heme iron and the substrate-binding cavity. Detailed evaluation of the corresponding X-ray coordinates suggested that the overall structures of the two domains are rather stable but that the N-terminal beta-barrel domain may move as stable unit relative to the catalytic subunit. According to recent X-ray scattering data the rabbit 12/15-LOX exhibits a high degree of structural flexibility and movement of the two domains relative to each other has been suggested to occur.

The rabbit reticulocyte-type 15-lipoxygenase is capable of oxygenating biomembranes and lipoproteins without the preceding action of ester lipid cleaving enzymes. This reaction requires an efficient membrane binding, and the N-terminal domain of the enzyme may be implicated in this process. To study the significance of the N-terminal domain of the rabbit 12/15-LOX for the membrane binding and catalytic activity, the native enzyme and its beta-barrel truncation mutant were tested. The results obtained indicate that the N-terminal domain is not essential for fatty acid oxygenation but contains sequence determinants for membrane binding. Furthermore, the N-terminal truncation mutant undergoes more rapid peroxide induced suicidal inactivation when compared with the wild-type enzyme.

Total synthesis of (5Z,8Z,11Z,14Z)-18- and 19-azido-eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acids and their [5,6,8,9,11,12,14,15,<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]-analogues via corresponding *p*-toluenesulphonates was developed. This synthetic approach allows the preparation of radioactively labelled arachidonic acid derivatives following a common synthetic route. When we applied a set of radioactively labelled lipoxygenase substrates carrying a photo-reactive azido group (azido-ETE) as affinity probes we observed strong labelling of peptides originating from the N-terminal beta-barrel domain. These data suggest that both enzyme/substrate or enzyme/product interaction and peroxide dependent suicidal inactivation of LOX appears to be regulated by the beta-barrel domain.

*The research was supported in part by the grant № 2.1.1/2889 of special programm «Development of scientific potential of high education».*



## КОМПЛЕКСНЫЙ ТЕРМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ШАМПИНЬОНОВ И КОРНЕЙ ХРЕНА ВЫСУШЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ МИКРОВОЛНОВОЙ ОБРАБОТКИ

Гуля Аурелиан, Быркэ Мария, Лупашко Андрей\*, Цапков Виктор, Исак-Гуцул Татьяна, Андроник Олеся\*,  
Котовая Алена

Молдавский государственный университет, Кишинев, Республика Молдова  
e-mail: mbirca@gmail.com

\*Технический университет Молдовы, Кишинев, Республика Молдова

Биологически активные компоненты пищи включают широкий круг химических соединений различной структуры, физико-химических и биологических свойств. Наибольшее количество биологически активных соединений найдено в растительной пище. Биологически активные вещества играют важную роль в профилактике основных хронических заболеваний и поддержании здоровья, хотя и не являются эссенциальными пищевыми веществами.

В медицинской практике применяют препараты лука, чеснока, хрена, и др. растений, содержащих фитонциды. Фитосоединения - это биологически активные природные органические соединения, встречающиеся в растительных продуктах. В растениях эти вещества выполняют защитные функции от инфекционных агентов, придают цвет, аромат, вкус. Пищевые источники фитосоединений - овощи, фрукты, бобовые, зерновые продукты, орехи, семена, грибы, приправы и специи.

Чтобы иметь возможность употреблять круглый год овощи и фрукты без потери их пищевых и органолептических свойств – их высушивают. Сушка или обезвоживание является самым здоровым и эффективным способом консервации растительных продуктов с длительным сроком хранения. Постоянный рост спроса на эти продукты требует новых методов сушки, которые бы обеспечивали высокое качество конечного продукта.

С этой целью образцы шампиньонов и корней хрена были подвергнуты сушке при различных режимах микроволнового излучения. Для изучения свойств высушенных продуктов был проведен комплексный термический анализ (дифференциальная термогравиметрия, термография и дифференциальный термический анализ) процесса термической деактивации вышеназванных образцов. Полученные результаты показали, что их термолит при различных режимах осуществляется в три или четыре этапа, первым из которых является дегидратация в интервале температур 70-100°C и сопровождается потерей массы 3-6 % (масса воды оставшейся в образцах после микроволновой обработки уменьшается в 15-30 раз). Методом Хоровица – Мецгера – Топора [1,2] определены кинетические параметры (порядок реакции, энергия активации, предэкспоненциальный множитель, константа скорости и энтропия процесса), описывающие дегидратацию продуктов, высушенных в различных условиях. Судя по полученным данным, можно констатировать, что значения порядков реакции дегидратации изменяется  $t$  в пределах 0,5 – 2, что подтверждает сложность протекающего процесса и его осуществление в несколько элементарных этапов. Значения энергии активации изменяются в пределах 20 - 80 кДж/моль в зависимости от режима сушки и являются близкими для обоих типов использованных образцов. Как для высушенных грибов, так и для корней хрена выявлена зависимость энергии активации от температуры. На кривых зависимости  $E_a = f(t)$  наблюдается точка минимума при  $t = 70-80^\circ\text{C}$ . С ростом времени обработки проб и температуры до  $80^\circ\text{C}$  происходит уменьшение  $E_a$ , что связано с выделением так называемой „свободной воды” из системы, а последующее увеличение энергии активации обусловлено ростом затрат на частичное испарение „связанной воды”. Обнаружена обратно пропорциональная зависимость  $E_a$  дегидратации от времени экспозиции проб, оптимальные условия получения продукта с наибольшим сроком хранения получены при температуре обработки 70 – 80 °C.

### Литература:

1. Розовский А. Я., Кинетика топохимических реакций, М., 1974.
2. Каретников Г.С. Практикум по физической химии. М. 1986. 496 с.

*Исследование проводилось при финансовой поддержке Национального Проекта 08.802.04.03А.*



## COMPLEX THERMAL ANALYSIS OF SHAMPINION SAMPLES AND DEHYDRATED HORSE RADISH ROOTS BY THE TREATMENT WITH HIGH FREQUENCY CURRENTS

*Gulea Aurelian, Bîrcă Maria, Lupasco Andrei<sup>\*</sup>, Tsapkov Victor, Isac-Gutsul Tatiana, Andronic Olesea<sup>\*</sup>, Cotovaia Aliona*

State University of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova  
e-mail: mbirca@gmail.com

<sup>\*</sup>Technical University of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova

Biological active food components comprise a wide range of chemical compounds displaying different structures and physico-chemical properties. The most part of biological active compounds is found in vegetal food. The biological active substances play a vital role in the prophylactic of the fundamental chronic diseases and health maintenance, though they are not essential food compounds.

The commonly used medicinal practice vegetables, that contain fitanid, are onion, garlic, horseradish and so on. Fitocompounds are biological active natural organic compounds which are a component part of vegetal products. In plants these substances act as protection agents against infections as well are responsible of color, flavor, and taste. Fitocompounds food sources are vegetables, fruits, beans, cereal products, walnuts, seeds, mushrooms, and spice.

Drying or dehydration is the most healthy and effective way for a long-term conservation of plant and animal products without altering the nutritional and organoleptic qualities. Vegetables and fruits are dehydrated to be consumed all year round. Permanent increase of the market demand of these products requires developing of new methods of drying, which would ensure a high quality of the final product.

Samples of mushrooms (champignons) and horseradish roots were treated with over-current frequency for this purpose. The properties of the material subjected to drying have been studied by means of complex thermal analysis (thermogravimetry, differential thermogravimetry, thermography and differential thermal analysis). It has been established that the thermolysis of samples occurs in three or four stages. The first stage-dehydration - takes place with a mass loss from 3 up to 6% in the temperature range 70-100°C (the mass of remaining water is diminishing by 15-30 times).

By means of Horowitz-Metzger-Topor [1-2] method the characteristics of kinetic parameters (reaction order, activation energy, velocity constant and process entropy) that describe the stage of dehydration of plant products dried in different conditions, has been calculated.

The investigation results demonstrated that the reaction order values of the dehydration stage are included in 0.5-2.0 range, indicating the complexity of the processes: e.g. occurring in several separate stages. The value of activation energy varies in 20-80 kJ/mol domain depending on drying conditions and are close both for mushrooms and horseradish roots samples.

The dependence activation energy - temperature has been determined for mushrooms and horseradish roots samples. A minimum value at  $t = 70-80^{\circ}\text{C}$  on the  $E_a = f(t)$  dependence curve has been recorded. As the treatment time increase and temperature reaches the value of  $80^{\circ}\text{C}$ , a decrease of activation energy has been observed. This fact was explained by the elimination of the "non-bonded water" from the system. The follow-on increase of the activation energy was put down to the increase of the energy required for the "bonded water" elimination.

An inverse dependence of activation energy from sample treatment time has been determined. The optimal temperature for getting products with longest storing period was found to be  $t = 70-80^{\circ}\text{C}$ .

### References:

1. Розовский А. Я. Кинетика топомических реакций, М., 1974.
2. Каретников Г.С. Практикум по физической химии. М. 1986. 496 с.

*This research was supported by National Project 08.802.04.03A.*





## ТЕРМОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АЗАНГУЛЯРНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТИВНЫХ МЕТОДОВ В ФАРМАКОХИМИИ

Гулякевич<sup>1</sup> О.В., Курман<sup>2</sup> П.В., Михальчук<sup>1</sup> А.Л., Чернова<sup>2</sup> Т.А.

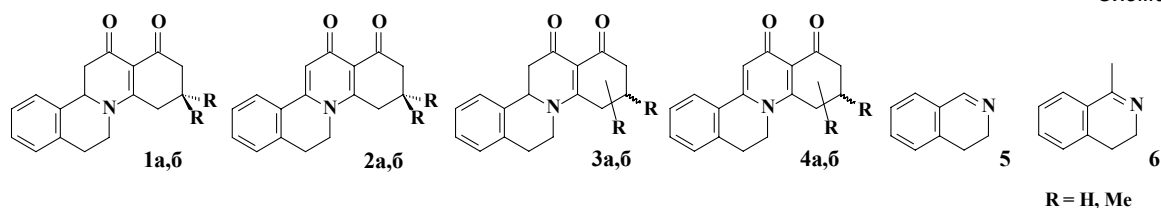
<sup>1</sup> ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь  
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by

<sup>2</sup> ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь  
e-mail: pharmcenter@it.org.by

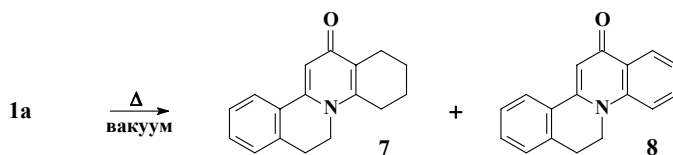
Органические вещества, как правило, термолабильны и, в отдельных случаях, при нагревании претерпевают различного рода превращения — декарбосилируются, дегидрируются, циклодегидрируются, изомеризуются. Такие превращения относят к термолитическим и используют в лабораторной практике и промышленном производстве. Однако, в большинстве случаев, сталкиваясь с подобными явлениями, исследователи ограничиваются лишь констатацией факта разложения вещества при нагревании, например [1].

Разложение при плавлении характерно азангулярным гетероциклам ряда циклано[5,6]пиридо[2,1-а]изохинолина [1,2], проявляющим иммуномодулирующие свойства и представляющим интерес в разработках фармакологических агентов коррекции иммунитета человека и животных [3]. Исследуя свойства этих соединений, представлялось важным выяснить природу происходящих при нагревании процессов и попытаться использовать их в препаративных целях.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование расплавов изохино[2,1-а]хинолин-1,13-дионов **1a, б** показало, что эти вещества дегидрируются, изомеризуются и расщепляются с образованием производных **2a, б**, **3a, б**, **4a, б**, **5**, **6** (Схема 1), представляющих интерес в поиске новых фармакологических агентов.



Используя данные по термолизу изохино[2,1-а]хинолин-1,13-дионов в приложении к изохино[2,1-а]хинолин-1,13-диону **1a**, реализован препаративный метод его окислительно-восстановительного диспропорционирования приводящий к известному производному **7** (40...47%) [4] и недоступному ранее производному **8** (37...46%). Этот процесс (Схема 2) имеет радикальную природу и в отсутствие растворителей, воздуха, влаги осуществляется целенаправленно. Иницирующим актом процесса является гомолиз бензильного протона, а последующие превращения ведут к восстановлению половины молекул в производное **7** и ароматизации другой половины в производное **8**.



Этот результат объясняет термолабильность изохино[2,1-а]хинолин-1,13-дионов и демонстрируют возможность ее использования в синтезе новых биологически активных соединений.

### Литература:

1. Ахрем А.А., Моисеенков А.М., Криворучко В.А., Лахвич Ф.А., Поселенов А.И. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1972. (9). 2078.
2. Михальчук А.Л., Гулякевич О.В., Рубинов Д.Б., Ахрем А.А. // *ХГС.* 1993 (3). 374.
3. Конопля Н.А., Гулякевич О. В., Михальчук А. Л., Кузьмицкий Б.Б. // *Весці АН Беларусі, сер. хім. навук* 1994. (3). 91.
4. Gulyakevich O.V., Kurman P.V., Mikhal'chuk A.L. *Nitrogen-Containing Heterocycles: The Chemistry and Biological Activity of Synthetic and Natural Compounds.* Ed. by V.G. Kartsev – Moscow: ICSPF, 2006. 2. 306.



THERMOLYTIC TRANSFORMATIONS OF AZANGULAR HETEROCYCLES  
DESINE OF PREPARATIVE METHODS IN PHARMACOCHEMISTRY

Gulyakevich<sup>1</sup> O.V., Kurman<sup>2</sup> P.V., Mikhal'chuk<sup>1</sup> A.L., Chernova<sup>2</sup> T.A.

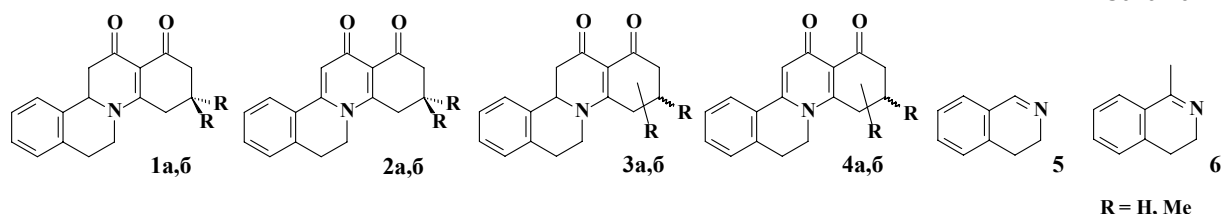
<sup>1</sup> PSI «Institute of bioorganic chemistry NAS of Belarus», Minsk, Belarus  
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by

<sup>2</sup> PI «SPC «Institute of pharmacology and biochemistry NAS of Belarus»», Minsk, Belarus  
e-mail: pharmcenter@it.org.by

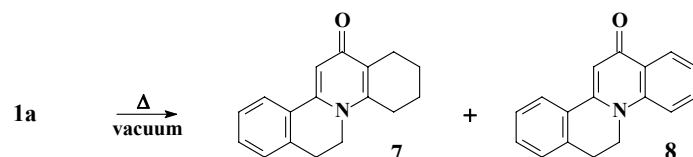
As a rule, organic substances are thermo labile and, on occasion, at heating a various sort of transformation - decarboxylating, dehydrating, cyclodehydrating, isomerizing undergo. Such transformations are carried to thermolytic and are used in laboratory practice and industrial production. However, in most cases, facing the similar phenomena, researchers are limited only to ascertaining of the fact of decomposition of substance at heating, for example [1].

Decomposition at fusion is characteristic to azangular heterocycles of the cyclano[5,6]pyrido[2,1-a]isoquinoline series [1,2], which are showing immunomodulatory properties and interest in workings out of pharmacological agents of the man and animals immunity correction [3]. Investigating properties of these substances, it was represented important to find out the nature of processes occurring at heating and to try to use them in the preparative purposes.

Chromatography-mass spectrometry research melts of the isoquino[2,1-a]quinolin-1,13-dione **1a**, would show, that these substances dehydrate, isomerizes and are break up with formation of derivatives **2a**, **3a**, **4a**, **5**, **6** (Scheme 1), new pharmacological agents of interest in search.



Using the data on thermolysis isoquino[2,1-a]quinolin-1,13-diones in the appendix to isoquino[2,1-a]quinolin-1,13-dione **1a**, it was realized preparative method of oxidation-reduction disproportionation leading to known derivative **7** (40...47 %) [4] and inaccessible earlier derivative **8** (37...46 %). This process (Scheme 2) has the radical nature and for lack of solvents, air, moisture is carried out purposefully. The initiating act of process is homolysis of benzyl proton, and the subsequent transformations conduct to reduction of half of molecules in derivative **7** and aromatization of other half of molecules in derivative **8**.



This result explains thermolability of isoquino[2,1-a]quinolin-1,13-diones and show possibility of its use in synthesis of new bioactive compounds

**References:**

1. Akhrem A.A., Moiseenkov A.M., Krivoruchko V.A., Lakhvich F.A., Poselenov A.I. // Izv. AN USSR. Ser. khim. 1972. (9). 2078 (rus.).
2. Mikhal'chuk A.L., Gulyakevich O.V., Rubinov D.B., Akhrem A.A. // Khim. Heterocycl.Comp. 1993 (3). 374 (rus.).
3. Konoplya N.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L., Kuz'mitskiy B.B. // Vesty AN Belarus, Ser. khim. sci. 1994. (3). 91 (rus.).
4. Gulyakevich O.V., Kurman P.V., Mikhal'chuk A.L. Nitrogen-Containing Heterocycles: The Chemistry and Biological Activity of Synthetic and Natural Compounds. Ed. by V.G. Kartsev – Moscow: ICSPF, 2006. 2. 306.



## ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТОРФА

*Инишева Л.И., Малиновская Л.А, Голубина О.А.*

Томский государственный педагогический университет, Томск, Россия  
e-mail: inisheva@mail.ru

Актуальной проблемой является разработка и применение биологически активных веществ, не содержащих антибиотиков и анаболических гормонов. В качестве таких препаратов перспективны препараты из торфа, в составе которых присутствует широкий спектр биологически активных веществ, в том числе аминокислоты и другие карбоновые кислоты. В работах многих ученых показано, что высокомолекулярные вещества (ВМВ) проявляют мембранотропное действие, способность усиливать активность обменных процессов в организме, повышать его сопротивляемость к неблагоприятным факторам внешней среды. Предпочтение отдается тем БАВ, которые не способны накапливаться в организме, не загрязняют окружающую среду при выведении из него, а сами метаболизируются, оказывая положительное влияние на формирование биологической продукции.

Весьма перспективным направлением использования высокоактивных веществ торфа является применение их в медицине в качестве транспортных систем для направленной доставки различных лекарственных препаратов к органам мишеням. В настоящее время на мировом рынке фармацевтических технологий наблюдается повышенный спрос на лекарственные формы нового поколения, разработанные на принципе целевой доставки. Используемые для этих целей высокомолекулярные соединения на основе поливинилпирролидона и декстранов или липосом по эффективности не сравнимы. Предварительно проведенные эксперименты показали, что влияние ВМВ заключается в перестройке метаболических процессов – как результата перехода гомеостаза живого организма на новый уровень, соответствующий более высокой ее иммунологической способности.

Препараты на основе торфа и входящие в его состав вещества обладают высокой биологической активностью по отношению к растительному, животному и человеческому организмам, и являются весьма перспективным природным сырьевым источником БАВ. Также известно, что степень биологической активности препаратов на основе торфа в первую очередь зависит от его типа и вида, поэтому весьма важным является правильный выбор необходимой сырьевой базы.

Целью наших исследований было выявить наиболее перспективную сырьевую базу для получения ВМВ с высокой биологической активностью. Объектом исследования послужили торфа Западно-Сибирского региона.

Ранее проведенные исследования фракционно-группового состава органического вещества торфов Западной Сибири, позволили выделить древесный торф низинного типа, характеризующийся как богатый высокомолекулярными веществами природного происхождения, биохимически стабильных и устойчивых, благодаря чему его можно рекомендовать для производства БАВ. Биологическую активность определяли по запатентованному способу. Разрабатываемый нами технологический процесс получения ВМВ позволяет получить группу высокомолекулярных веществ в нативном виде, представляющую наибольший интерес для целей медицины.

Проведенные исследования особенно актуальны, так как на сегодняшний день существует проблема поиска и разработки новых лекарственных средств на основе природного сырья, отличающихся низкой токсичностью и ограниченным спектром побочных явлений, а торф в этом отношении – относительно дешёвая и практически неограниченная сырьевая база для производства лекарственных средств.

Как новый способ определения биологической активности ВМВ представляет интерес воздействие ВМВ на обратимую агрегацию эритроцитов (ОАЭ) крови. Ранее были проведены исследования по определению показателей ОАЭ в микрообъемах крови в целях изучения антиагрегатных свойств лекарственных средств. В результате чего был предложен метод оценки ОАЭ, позволяющий количественно оценивать влияние различных препаратов на показатели агрегации и дезагрегации. В связи с этим, проведена работа по исследованию влияния ВМВ на показатели ОАЭ с целью использования данного метода как способа определения их биологической активности. Было получено, что ВМВ из разных видов торфа имеют различия в биологической активности в зависимости от особенностей их химического состава. ВМВ низинного древесно-травяного вида торфа отличаются наибольшим содержанием азота, развитием алифатических структур в строении молекулы, а также более высоким содержанием кислородсодержащих групп и парамагнитных центров. Этими свойствами возможно и объясняется более высокая биологическая активность по сравнению с другими торфами. В результате проведенных исследований выявлен вид торфа, характеризующийся благоприятными свойствами ВМВ и определена его биологическая активность.



## **EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OUT OF PEAT**

*Inisheva L.I., Malinovskaya L.A., Golubina O.A.*

Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia  
e-mail: inisheva@mail.ru

The importance of the problem is in development and using of biologically active substances (BAS) which don't contain antibiotics and anabolic hormones. Peat preparations are perspective as such preparations. There is a wide spectrum of biologically active substances, including amino acids and other carboxylic acids, in them. In many scientists' works it is showed that high-molecular substances (HMS) display membrane-tropic action, capability to intensify activity of exchange processes in organism, to increase its resistibility to unfavorable factors of environment. Those BAS are preferable which are not capable to accumulate in organism, don't pollute environment being removed from it, and metabolize themselves influencing positively upon formation of organic production.

Very perspective trend of highly active peat matters usage is their adaptation in medicine as a transport system for different drugs delivery to target organs. On the world pharmaceutical market, nowadays, it is observed a keen demand for dosage forms of a new generation which are developed on the basis of target delivery. Used for these purposes high-molecular compounds on the basis of polyvinylpyrrolidone and dextran or liposome are incomparable in efficiency. Premade experiments showed that HMS influence a lot upon homeostasis of a living organism. Reconstruction of metabolic processes takes place in a living organism and it acquires higher immunological capabilities.

Preparations on peat basis and belonging to it matters have high biological activity in respect of plant, animal and human organisms, and are highly perspective natural rough source of BAS. It is known also that the degree of biological activity of preparation based on peat depends, first of all, on its type and kind, therefore it is of great importance to choose necessary source of raw materials correctly.

The aim of our investigation is to discover more perspective source of raw materials for extraction of HMS with high biological activity. The object of investigation is peats from West-Siberian region.

Earlier made researches of fractionally group composition of peat organic matter from West-Siberian region revealed valley wood peat. The latter is characterized as enriched with high-molecular substances of natural origin, biochemically stable and steady. Owing to all aforesaid, valley wood peat can be recommended for BAS production. Biological activity was defined with the help of patented method. Engineering process of HMS extraction, worked out by us, allows us to have the group of high-molecular substances in native form and it is of the greatest interest for medical aims.

Made researches are especially of current importance as there is a problem, nowadays, of search and development of new drugs on the basis of natural raw materials. These drugs contain less toxicity and limited spectrum of side effects. Peat, in this regard, is relatively cheap and practically unlimited source of raw materials for remedies production.

As a new method of determination of biological activity of HMS, HMS impact on reversible aggregation of erythrocytes (RAE) of blood is very interesting. Earlier there were made researches on studying of RAE indices in blood microvolume in an effort to study antiaggregant peculiarities of remedies. As a result there was offered an estimation method of RAE which allows to estimate quantitatively an impact of various preparations on indices of aggregation and disaggregation. In this connection, research of HMS impact on RAE indices was made. The aim is to use this method for their biological activity test. It was found out that HMS out of different types of peat have difference in biological activity depending on peculiarities of their chemical composition. HMS of eutrophic wood-herbal peat reveal the largest content of nitrogen, development of aliphatic structures in the molecular composition, and also high concentration of oxygen-containing groups and paramagnetic centers. These peculiarities may explain high biological activity in comparing with other peats. As a result of made researches, there was revealed a type of peat, which is characterized favorable properties of HMS, and it was defined its biological activity.



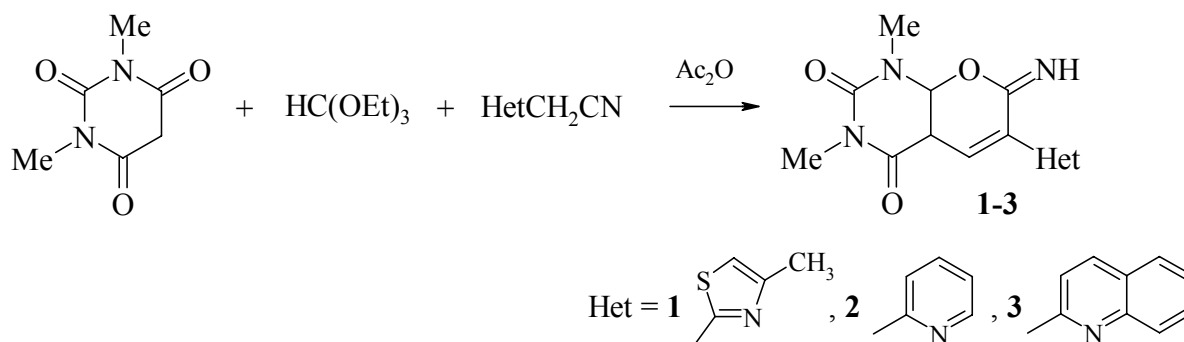
### 6-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРАНОПИРИМИДИНОНЫ

Ищенко В.В., Тишкоевский Р.Б., Шаблыкина О.В., Хиля В.П.

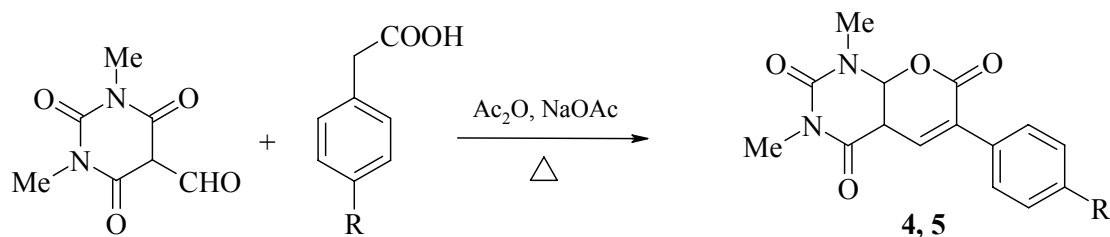
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина  
e-mail: shablykina@mail.univ.kiev.ua

В природе  $\alpha$ -пироновый цикл мы находим в различных по своему строению кумаринах и изокумаринах. Большинство из этих соединений, как и их синтетические аналоги, обладают ценными лекарственными свойствами. В большей мере это относится к пиримидинам и оксипиримидинам – структурным фрагментам нуклеиновых кислот. В то же время известно очень мало веществ, содержащих пироновый и пиримидиновый (или оксипиримидиновый) циклы.

Нами был получен ряд 7-имино-1,3-диметил-1,4а,7,8а-тетрагидро-2H-пирано[2,3-d]пиримидин-2,4(3H)-дионов с гетероциклическим заместителем в 6-ом положении путем конденсации 1,3-диметилбарбитуровой кислоты, ортоэтилформиата и гетарилацетонитрила в укусном ангидриде (сначала 1,3-диметилбарбитуровая кислота формилируется по 5-ому положению, затем полученный альдегид взаимодействует с активным ацетонитрилом):



1,3-Диметил-4а,8а-дигидро-2H-пирано[2,3-d]пиримидин-2,4,7(1H,3H)-трионы с ароматическим заместителем в 6-ом положении были получены конденсацией 5-формил-1,3-диметилбарбитуровой кислоты с арилуксусными кислотами в присутствии ацетата натрия, поскольку гидролиз иминогруппы до кетогруппы сопровождается раскрытием гетероциклической системы.



R = **4** H, **5** NO<sub>2</sub>



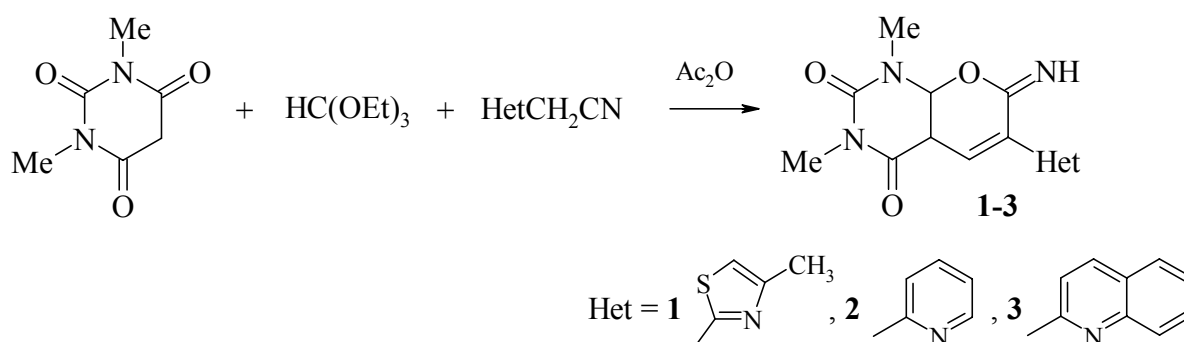
### 6-SUBSTITUTED PYRANOPYRIMIDINDIONES

*Ishchenko V.V., Tyshkivskyy R.B., Shablykina O.V., Khilya V.P.*

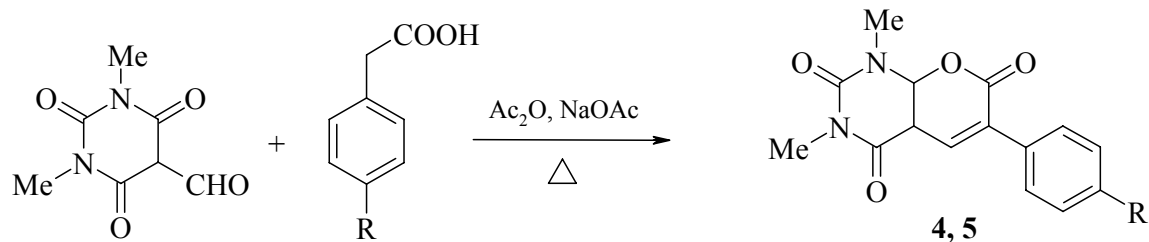
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: shablykina@mail.univ.kiev.ua

$\alpha$ -Pyrone system could be found in different natural coumarins and isocoumarins. A lot of such compounds, as well as their synthetic analogs, demonstrate extraordinary medical properties. Most of all its concerning to pyrimidines and oxypyrimidines as a structure fragment of nucleic acids. However there are only few compounds with pyrone and pyrimidines (or oxypyrimidines) cycles in one molecule.

We have synthesized 7-imino-1,3-dimethyl-1,4a,7,8a-tetrahydro-2H-pyrano[2,3-d]pyrimidine-2,4(3H)-diones with heterocyclic substituents in position 6 by condensation of 1,3-dimethylbarbituric acid, triethylorthoformate and heteroacetonitrile in acetic anhydride (firstly, a formulation of 1,3-dimethylbarbituric acid in position 5 took place, and then obtaining aldehyde reacted with an active acetonitrile):



1,3-Dimethyl-4a,8a-dihydro-2H-pyrano[2,3-d]pyrimidine-2,4,7(1H,3H)-trione with aromatic substituents in position 6 were obtained by condensation of 1,3-dimethyl-5-formylbarbituric acid and arylacetic acids with sodium acetate catalyse because it was not possible to hydrolyze imino-group up to keto-group without heterocyclic system destruction.



R = **4** H, **5** NO<sub>2</sub>



**СИНТЕТИЧНІ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДІВ НА ОСНОВІ  
4-(*p*-ТОЛІЛСУЛЬФОНІЛ)-5-ТРИФТОРОМЕТИЛ-1,2,3-ТРИАЗОЛУ**

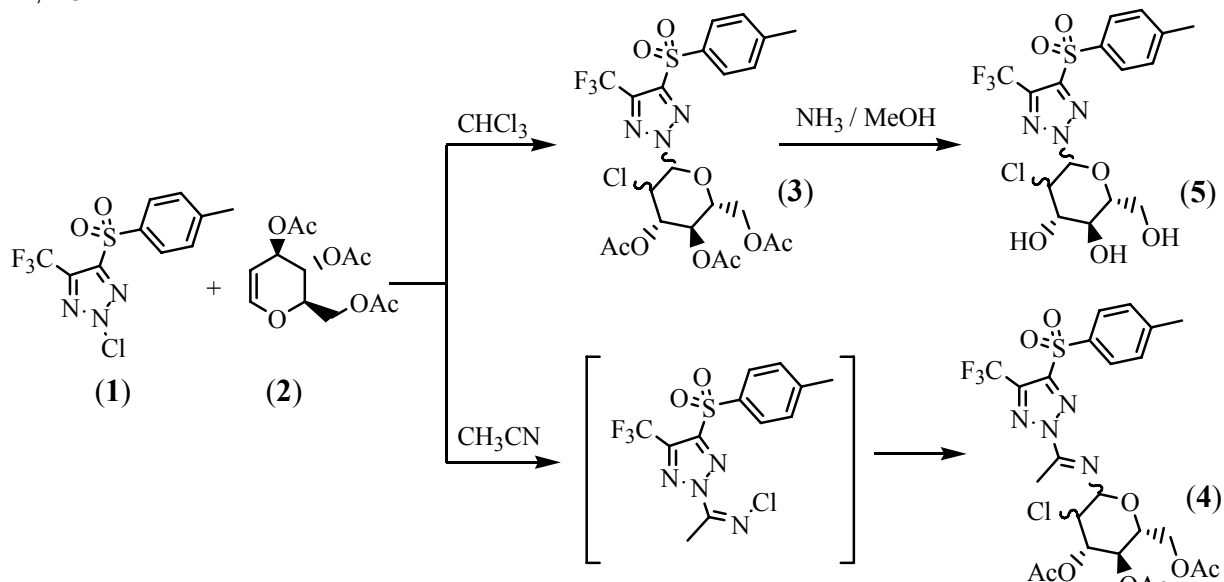
Канищев О.С.<sup>1</sup>, Шермолович Ю.Г.<sup>1</sup>, Загородня С.Д.<sup>2</sup>, Баранова Г.В.<sup>2</sup>, Нестерова Н.В.<sup>2</sup>

1. Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна  
e-mail sherm@ioch.kiev.ua sashakan@gmail.com

2. Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ, Україна

Синтетичні аналоги природних нуклеозидів – біологічно-активні речовини з широким спектром активності, зокрема противірусної та протипухлинної. Однак, аналоги нуклеозидів, що містять фторовмісні триазоли в якості нуклеїнової основи, були до цього часу невідомі.

З метою отримання нових аналогів нуклеозидів на основі 4-(*p*-толїлсульфоніл)-5-трифторометил-1,2,3-триазолу нами була проведена реакція приєднання *N*-Cl триазолу (1) [1,2] до подвійного зв'язку 3,4,6-три-*O*-ацетил-*D*-глікалю (2), в результаті якої, в залежності від використаного розчинника, утворюються продукти приєднання (3) і (4) у вигляді суміші діастереомерів у різному співвідношенні. Гідроліз ацетильних груп суміші діастереомерів (3) приводить до утворення суміші діастереомерів (5) з вільними гідроксильними групами. Будову продуктів приєднання (3-5) підтверджено спектроскопією ЯМР на ядрах <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C.



Попередні дослідження біологічної активності сполук (3-5), проведені в Інституті мікробіології і вірусології НАНУ, виявили ефективність сполук (4-5) проти вірусу Епштейна-Барр (EBV; вірус герпесу людини 4-го типу). Експериментально визначений індекс селективності для сполук (4) і (5) перевищив аналогічний показник для ацикловіру, який використовувався в якості референс препарату.

Отримані результати свідчать про перспективність проведення подальших досліджень у даному напрямку.

Сполука	(3)	(4)	(5)	Ацикловір
Цитотоксичність (CD <sub>50</sub> )	255 мкг/мл	800 мкг/мл	650 мкг/мл	5000 мкг/мл
Пригнічення вірусу EBV (ED <sub>50</sub> )	85 мкг/мл	10 мкг/мл	10 мкг/мл	220 мкг/мл
Індекс селективності (IS)	3	80	65	23

**Література:**

1. В.М. Тимошенко, Я.В. Николин, А.Н. Чернега, Э.Б. Русанов, Ю.Г. Шермолович. ХГС, 518 (2001).
2. Ю.П. Бандера, А.С. Канищев, В.М. Тимошенко, С.А. Бут, А.М. Нестеренко, Ю.Г. Шермолович. ХГС, 1342 (2007).



SYNTHETIC NUCLEOSIDE ANALOGS BASED  
ON 4-(*p*-TOLYLSULFONYL)-5-TRIFLUOROMETHYL-1,2,3-TRIAZOLE

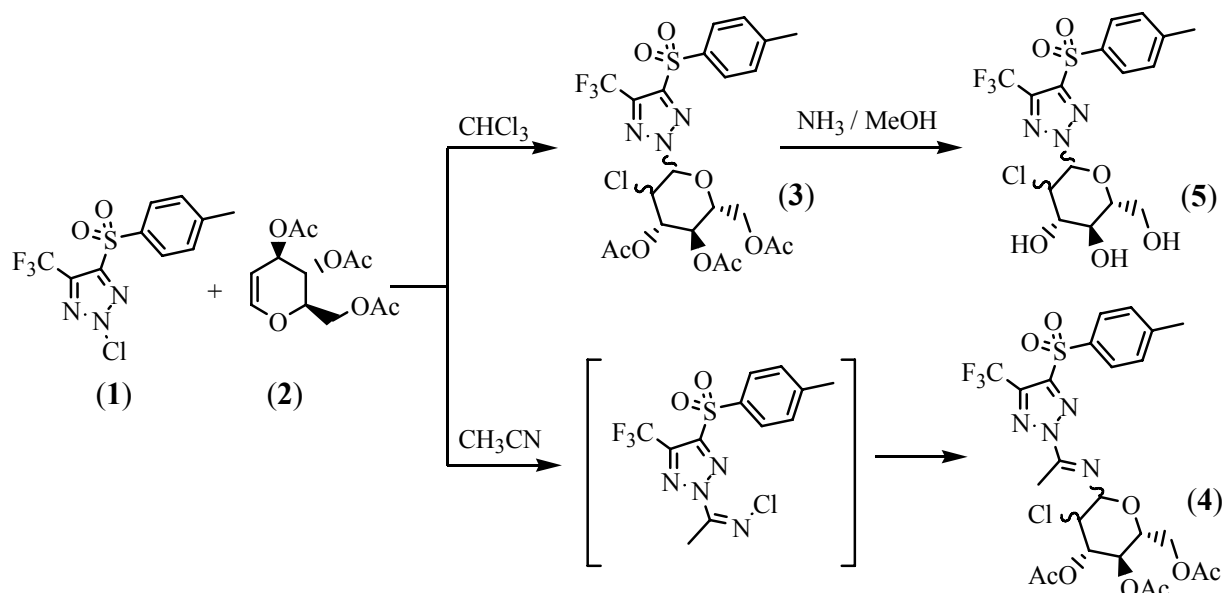
Kanishchev O.S.<sup>1</sup>, Shermolovich Yu.G.<sup>1</sup>, Zagorodnya S.D.<sup>2</sup>, Baranova G.V.<sup>2</sup>, Nesterova N.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine;  
e-mail sherm@ioch.kiev.ua, sashakan@gmail.com

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Synthetic analogs of nature nucleosides – possess broad spectrum of biological activity, including antiviral and antitumor activity. Until now there is no data about nucleoside analogs containing fluorinated triazole as a nucleobase.

In order to obtain new nucleoside analogs based on 4-(*p*-tolylsulfonyl)-5-trifluoromethyl-1,2,3-triazole we have applied an addition reaction of *N*-Cl triazole (1) [1,2] to a double bond of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-*D*-glucal (2). Depending on solvent used, there were obtained addition products (3) and (4) as a diastereomeric mixtures with a different ratio of isomers. Hydrolysis of acetyl groups of diastereomeric mixture (3) give diastereomeric mixture (5) with free hydroxygroups. Structure of the addition products (3-5) was confirmed by <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C NMR.



Preliminary study on biological activity of the compounds (3-5), carried out in Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, showed efficiency of the compounds (4-5) against Epstein-Barr virus (EBV; Human herpesvirus 4). Experimentally determined index of selectivity for the compounds (4) i (5) exceeded analogous characteristic for aciclovir, which was used as a reference drug.

Obtained results allowed us to conclude about necessity for the further research in this area.

Compound	(3)	(4)	(5)	Aciclovir
Cytotoxicity (CD <sub>50</sub> )	255 µg/ml	800 µg/ml	650 µg/ml	5000 µg/ml
EBV suppression (ED <sub>50</sub> )	85 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	220 µg/ml
Index of selectivity (IS)	3	80	65	23

**References:**

- V.M. Timoshenko, Ya.V. Nikolin, A.N. Chernega, E.B. Rusanov, Yu.G. Shermolovich. Chem. Heterocycl. Compd. (Engl.Transl.), **37**, 470-476 (2001).
- Yu.P. Bandera, O.S. Kanishchev, V.M. Timoshenko, S.A. Buth, A.M. Nesterenko, Yu.G. Shermolovich. Chem. Heterocycl. Compd. (Engl.Transl.), **43**, 1138-1147 (2007).





## СИНТЕЗ И ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ТИЕТАН-ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА. СПЕКТРЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ И ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Каюмова<sup>1</sup> Р. Р., Клен<sup>1</sup> Е. Э., Мещерякова<sup>1</sup> С. А., Халиуллин<sup>1</sup> Ф. А., Мамыкин<sup>2</sup> А. В.,  
Остахов<sup>2</sup> С. С., Казаков<sup>2</sup> В. П.

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

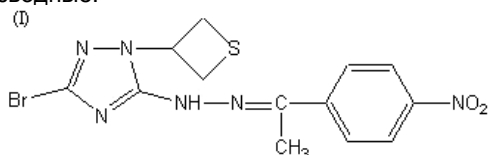
<sup>2</sup> УРАН Институт органической химии УНЦ РАН, Уфа, Россия

e-mail: kazakov@anrb.ru

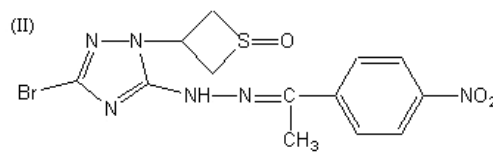
Производные 1,2,4-триазола проявляют разнообразную биологическую активность и поэтому часто применяются в медицинской практике для лечения грибковых (флуконазол), вирусных инфекций (рибавирин), а также опухолевых заболеваний (анастрозол, летрозол).

Поиск биологически активных веществ среди новых производных 1,2,4-триазола и изучение их физико-химических свойств продолжается. В докладе представлены результаты исследования новых производных 1,2,4-триазола, отличающихся между собой степенью окисления серы в 4-х членном цикле с помощью флуоресцентного анализа, который обладает высокой чувствительностью, что позволяет обнаружить и количественно определить эти вещества, содержащиеся в очень небольших количествах, в том числе и в биологических жидкостях. Синтезированы новые тиетан-производных 1,2,4-триазола:

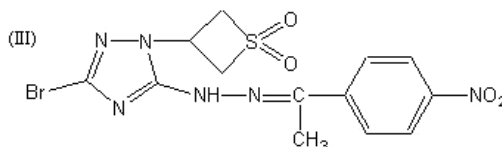
Исследуемые соединения получены алкилированием 3,5-дибромтриазола в водной среде эквимолекулярным количеством эпитиохлоргидрина в присутствии эквимолекулярного количества щелочи при температуре 50-55 °С. В результате реакции происходит тиран-тиетановая перегруппировка, и образуется 3,5-дибром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазол. При окислении его в среде ледяной уксусной кислоты с двукратным мольным избытком 37%-ного раствора перекиси водорода получали 1-оксотиетанил-, а при кипячении с 10-кратным избытком перекиси водорода – 1,1-диоксотиетанил-производные. Далее, на полученные производные в среде н-бутанола действуют в течение одного часа пятикратным мольным избытком гидразин-гидрата и конденсацией с ароматическими альдегидами и кетонами при кипячении 0,5-8 часов в среде этанола или изопропанола, и выделяют с 28-100 %-ным выходом искомые илиденовые производные.



3-бром-5-(3-нитроэтилиден)-гидразино-(1-тиетанил-3)-1,2,4-триазол



3-бром-5-(3-нитроэтилиден)-гидразино-(1-оксотиетанил-3)-1,2,4-триазол



3-бром-5-(3-нитроэтилиден)-гидразино-(1,1-диоксотиетанил-3)-1,2,4-триазол

Структура соединений установлена методами ЯМР – спектроскопии <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H. Исследована их фотолюминесценция. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. Квантовый выход исследованных соединений определяли относительно стандарта – D- триптофана (Trp) по известной методике.

В спектре возбуждения флуоресценции триазолов ( $\lambda_{Fl} = 650$  нм) наблюдаются две полосы - в ультрафиолетовой (288-300 нм) и видимой области спектра (436-552 нм). Найдено, что для всех исследованных соединений при возбуждении в коротковолновую полосу (270 нм) наблюдается флуоресценция в “синей” области, а при  $\lambda_{ex} = 520$  нм в “красной” области спектра. Обнаруженная зависимость спектрального состава флуоресценции от длины волны возбуждающего света, вероятно, может быть объяснена излучательными переходами с  $S_1$  (флуоресценция в синей области спектра) и триплетного уровней (фосфоресценция в красной области спектра) на основной  $S_0$  – уровень триазола. В пользу отнесения длинноволновой флуоресценции к излучательному  $T_1 \rightarrow S_0$  переходу свидетельствует влияние тяжелого атома, инициирующее синглет-триплетную конверсию – фосфоресценция наблюдается только в бромированных производных триазола.

Наибольшим квантовым выходом флуоресценции обладает соединение I ( $\phi = 1.5 \cdot 10^{-5}$ ). В то же время, по сравнению с I, квантовый выход фотолюминесценции соединения II почти на 2 порядка ниже ( $\phi = 0,03 \cdot 10^{-5}$ ). Такое резкое уменьшение  $\phi$  флуоресценции, вероятно вызвано увеличением безызлучательных потерь энергии возбуждения на колебания связей заместителя в положении 3 триазольного цикла. Окисление сульфоксидного фрагмента II до сульфонового (соединение III) приводит, вопреки ожиданиям, не к дальнейшему уменьшению выхода флуоресценции, а к его росту до  $\phi = 0,1 \cdot 10^{-5}$ .

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ № 08-03-00147-а и 08-03-99008-р\_офи, ОХНМ РАН (№ 1-ОХ)



**SYNTHESIS AND PHOTOLUMINESCENCE OF 1,2,4-TRIAZOL-THIETHANE DERIVATIVES.  
EXCITATION AND FLUORESCENCE SPECTRA**

*Kayumova<sup>2</sup> R.R., Klen<sup>1</sup> E. E., Meshherakova<sup>1</sup> S. A., Haliullin<sup>1</sup> F. A., Mamykin<sup>2</sup> A. V.,  
Ostakhov<sup>2</sup> S. S., Kazakov<sup>2</sup> V. P..*

<sup>1</sup>Bashkirian State Medical University, Ufa, Russia

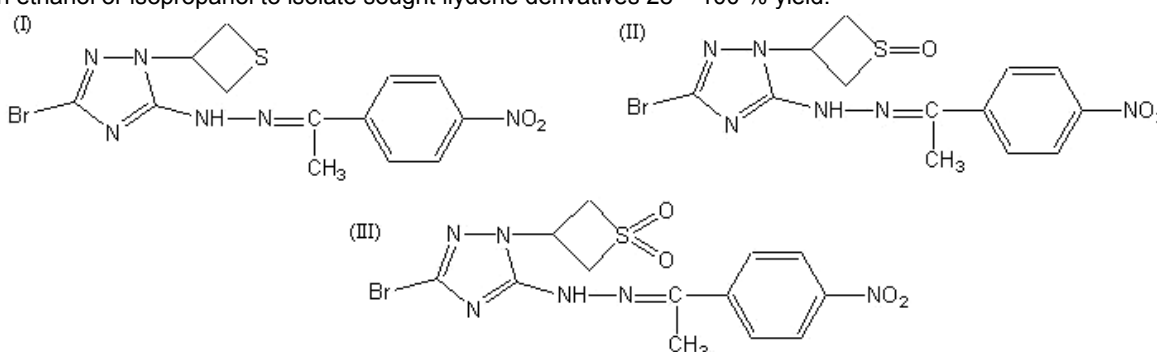
<sup>2</sup>Institute of organic chemistry, Ufa Sci. Center of the RAS, Ufa, Russia

kazakov@anrb.ru

The 1,2,4-triazole –derivatives show a various biological activity and by this reason are frequently used in medicine to treat for fungous (fluconazol), viral infectious (rybovyrine), as well as for humoral diseases (anastorazol, letrozol).

The search for biologically active compounds among novel 1,2,4-triazol derivatives and the investigation of their physico-chemical properties is under study. Here the results of the study of novel 1,2,4-triazol derivatives are present, which differ by the degree of sulfur oxidation in a 4-membered cycle. The study were carried out using a fluorescence analysis, which made it possible to reveal and determine quantitatively these compounds, which are contained in very small amounts including biological liquids. Novel 1,2,4-triazol thietan derivatives are synthesized.

The compounds studied were produced via the alkylation of 3,5-dibrom triazol in water with the equimolar amount of epithiochlorhydrine in the presence of equimolar amount of alkali at 50-55 °C. The reaction results in the thirane – thietane rearrangement to form 3,5-dibrom-1-(thietanyl)-1,2,4-triazol. The oxidation of the latter in acetic acid with two – fold excess of 37% hydrogen peroxide solution leads to 1-oxothietanyl, and boilin with 10-fold excess of hydrogen peroxide gives 1,1-dioxothietanyl derivatives. Then, these derivatives were treated with 5-fold hydrazine hydrate in n-butanol for 1h, condensed with aromatic aldehydes and ketones at boiling for 0,5 – 8h in ethanol or isopropanol to isolate sought llydene derivatives 28 – 100 % yield.



The structure of compounds was elucidated using <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy methods. Their photoluminescence was studied. Dimethyl sulfoxide was a solvent. The quantum yield of compounds studied was determined relatively to a standart - D-tryptofane (Trp) according to a known method.

In the spectrum of triazol fluorescence exitation ( $\lambda_{fl} = 650$  nm) two bands – in ultraviolet (288-300 nm) and visible region (436-552 nm) are observed. It was found, that for all of the compounds studied at the excitation into a short wave band (270 nm) fluorescence in a «blue» and at  $\lambda_{ex}=520$  nm in «red» region of the spectrum is observed. The revealed spectral dependence of fluorescence on the wave length of exciting light, probably, may be explained by the irradiative transitions from S<sub>1</sub> (fluorescence in a «blue» region) and triplet levels (phosphorescence «red» region) on the basic S<sub>0</sub>-level of triazol. The effect of a heavy atom initiating the singlet-triplet conversion witnesses the benefit of the assignment of long wave fluorescence to irradiative T<sub>1</sub>→S<sub>0</sub> transition. Fluorescence is observed only in bromated triazole derivatives.

Compound I ( $\varphi=1.5 \cdot 10^{-5}$ ) has the highest quantum yield. At the same time, the quantum yield of compound II is lower by two order ( $\varphi=0.03 \cdot 10^{-5}$ ) in comparison with I. This sharp reduction of  $\varphi$  fluorescence, probably, is caused by the increase of the non-irradiative loss of excitation energy for the oscillation of substituent bonds in 3-position of a triazol cycle.

In despite of expectation, the oxidation of sulfoxide fragment II to sulfone one (compound III) leads to no subsequent decrease of the fluorescence yield, but to its increase up to  $\varphi=0.1 \cdot 10^{-5}$ .

*This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (№ 08-03-00147-a, 08-03-99008-r\_off)*



## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУХИХ КОНЦЕНТРАТОВ ОВАРИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

*Харенко Е.Н., Сытова М.В., Дмитриева Е.А.*

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбной промышленности и океанографии», Москва, Россия  
e-mail: harenko@vniro.ru

Питание современного человека существенно отличается от формулы сбалансированного питания и является дефицитным по уровню потребления белков животного происхождения, витаминов, макро- и микронутриентов, многих органических соединений природного происхождения, способствующих повышению качества жизни и укреплению здоровья, снижению риска развития многих заболеваний, обеспечению защитно-адапционных возможностей организма. Одной из основных задач, определенных концепцией оптимального питания, является создание безопасных, высококачественных и полноценных пищевых продуктов, при этом особое внимание уделяется разработке продуктов лечебно-профилактической направленности. Успешное решение проблемы создания таких продуктов позволит внедрить в питание населения биологически активные добавки (БАД) к пище (про- и пребиотики, минорные компоненты и другие БАВ природного происхождения) в качестве носителей активных свойств [Тутельян, 2003].

Поиск новых сырьевых ресурсов в рыбохозяйственном комплексе России для производства пищевых, лечебно-профилактических и других продуктов, разработка технологий переработки этого сырья – ключевая позиция на современном этапе.

В последнее время широко практикуется прижизненное получение икры осетровых рыб, при котором побочным продуктом является овариальная жидкость, составляющая от 10 до 40% от массы получаемой икры-сырца, и с учетом развития осетроводства, ее объемы на перспективу могут достигнуть 16 тонн в год.

В связи с тем, что овариальная жидкость является частью воспроизводственной системы осетровых рыб, она, возможно, обладает биохимической спецификой, обусловленной различными факторами, в том числе и биотического характера. Овариальная жидкость (ОЖ) может представлять определенный интерес как сырье для получения биологически активных веществ (БАВ), таких как витамины, макро- и микроэлементы, а также для получения белковых или аминокислотных препаратов для пищевого использования.

Овариальная жидкость представляет собой прозрачную, густую жидкость от серого до серо-розового цвета, по своей консистенции являющейся золом. Нами установлено, что содержание белка в ОЖ ленского осетра составляет 21,5-41,4% (в пересчете на сухое вещество), в котором 44% незаменимых аминокислот [Сытова, Харенко, 2007].

Очищенные от примесей образцы овариальной жидкости подвергали высушиванию. Распылительную сушку осуществляли при температуре сушильного агента на входе плюс 260°C, на выходе плюс 105°C. Однако, было отмечено, что при данной температуре происходит частичная коагуляция белковой части сырья, поэтому через 1,5 часа работы она была понижена на входе до плюс 40°C, на выходе до плюс 85°C. Количество подаваемого на распыление сырья составляло 2 л/ч, производительность вентилятора и скорость воздуха в сушильной камере были постоянны и составляли 9,2 м<sup>3</sup>/мин и 0,25 м/с, соответственно. Окружная скорость распылителя составляла 110 м/с.

Лиофильная сушка проводилась в аппарате Consol 12. Овариальную жидкость замораживали до температуры минус 35-40 °С. За счет процесса возгонки водяной пар из льда, находящегося в продукте, откачивался из рабочей камеры низковакуумным насосом (200 амт), с последующей конденсацией на низкотемпературном конденсоре. Продолжительность сушки при минус 35°C составляла 24 часа, досушка (при температуре +30°C) - 5 часов. Контроль температуры конденсора и давления в колбах осуществляли при помощи цифровых индикаторов, вынесенных на переднюю панель сушилки.

Концентрат ОЖ после распылительной сушки представлял собой сыпучий тонкодисперсный порошок серовато-бежевого цвета с размером частиц несколько десятков микрон, по консистенции напоминающий муку. Лиофилизат ОЖ является также порошком, но имеет хлопьевидную структуру. Порошки практически не имели «рыбного» запаха, не требовали дальнейшего размельчения и хорошо растворялись в воде и физрастворе. Мягкая форма дегидратации минимизирует разрушение клеток, что позволяет сохранить овариальной жидкости свои исходные качества, как в готовом продукте, так и в процессе регидратации.

Содержание белка в концентратах ОЖ после лиофильной (36,97% на сухое вещество) и распылительной (41,96% на сухое вещество) сушки отличается незначительно. Выявлено присутствие 19 аминокислот, из них 8 незаменимых (триптофан не определяли). При этом сумма незаменимых аминокислот составляет не менее 40% и их отношение к сумме заменимых кислот не менее 0,8; что практически сравнимо с данным, полученным в белках икры осетровых рыб IV и V стадий зрелости [Копыленко, 2004]. В отличие от икры осетровых рыб в концентратах ОЖ практически нет жира (до 0,1%). Нами получены предварительные данные по витаминно-минеральному составу концентратов ОЖ, которые свидетельствуют о высоком содержании витаминов группы В и калия.

Проведенные исследования позволяют рекомендовать сухие концентраты ОЖ в качестве источников белка животного происхождения, обогащенных природными витаминами группы В и калия.

**STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVENESS OF DRY CONCENTRATED OVARIAN LIQUID  
OBTAINED FROM STURGEONS***Kharenko E.N., Sytova M.V., Dmitrieva E.A.*VNIRO, Moscow, Russia  
e-mail: harenko@vniro.ru

The present day human nutrition differs considerably from the formula of balanced food habits, and is deficient in consumption of animal protein, vitamins, macro- and micronutrients, many natural organic compounds which contribute to improving quality of life and health, lowering the risk of development of many diseases, and providing for defensive and adaptive potential of the organism. One of the major objectives for the optimum nutrition concept is to develop safe and nutritious products of good quality, with special emphasis on medicines or preventive substances. Successful generation of such products will enable us to introduce biologically active additives into human food as carriers of active properties (pro- and prebiotics, minor elements, and other natural biologically active substances) [Tutelian, 2003].

At present the key commitment is to search for new raw resources within the Russian fishing industry for the production of food, medicines, and other substances, and to develop appropriate processing techniques.

The common practice applied recently is to obtain roe from live sturgeons; a by-product in the process is ovarian liquid making up 10-40% of the weight of roe obtained. Sturgeon enhancement perspectives make it possible to expect the annual volume of this liquid reaching 16 tons.

The ovarian liquid is a part of sturgeons' reproductive system, and is probably biochemically specific, as determined by various factors including the biotic ones. The ovarian liquid may be of some interest as a raw material for biologically active substances such as vitamins, macro- and microelements, as well as for protein or aminoacid preparation for human consumption.

The ovarian liquid (OL) is transparent and thick, colored from grey to greyish/pinkish; it is a colloid solution by its consistency. We have found out that the protein content in the OL from the Lena sturgeon is 21.5-41.4% (converted into dry matter), with essential aminoacids making up 44% [Sytova, Kharenko, 2007].

OL samples were purified from admixtures and dried. The spray drying was done at the inlet temperature of the drying agent of +260°C (outlet +105°C). It was noticed, however, that under this temperature a part of the protein content coagulates. Therefore, the inlet temperature was lowered to +40°C (outlet +85°C) after 1,5 hours of operation. The amount of raw material delivered for spray was 2 l/hr; the capacity of fan and air velocity in the drying chamber were constant (9.2 m<sup>3</sup>/min and 0.25 m/sec respectively). The circumferential velocity of the spray was 110 m/sec.

Sublimation drying was made in Consol 12. OL was frozen to -35...-40°C. Due to sublimation, the ice in the product evaporated, and was pumped out of the working chamber with a low vacuum pump (200 atm) followed by condensation with a low temperature condenser. The drying time under -35°C was 24 hours; additional drying under +35°C was five hours. The condenser temperature and pressure in flusks were controlled using digital indicators shown on the drier's front panel.

Following spray drying, the OL looked like a thinly dispersed dry greyish-biege powder, the flour-like particles being of several mkm. Lyophilizate of OL is a powder too, but it has a flaky structure. The powders practically did not have any fish smell, did not need further grinding, and could easily be dissolved in water and physiological solution. The soft form of dehydration minimizes the destruction of cells which saves the initial properties of OL, both in the final product and in the process of dehydration.

The content of protein in OL concentrates after sublimation (36.97% dry matter) and spray drying (41.96% dry matter) differs insignificantly. We found the presence of 19 aminoacids including 8 essential ones; tryptophane was not examined. Besides, the sum of essential aminoacids amounts to at least 40%, while their ratio to the sum of non-essential aminoacids was at least 0.8; this virtually agrees with the data obtained from IV and V maturity stage [Kopylenko, 2004] sturgeon roe proteins. Unlike the sturgeon roe, the OL concentrates practically lack fat (up to 0.1%). We obtained tentative data on the vitamin and mineral composition of OL concentrates which is indicative of a large content of vitamins B and potassium.

The study made enables us to recommend dry OL concentrates as sources of animal protein enriched with natural vitamins B and potassium.



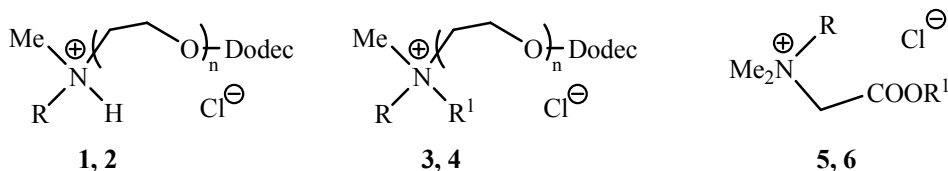
## СИНТЕЗ И БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРИДРАТОВ ТРЕТИЧНЫХ АМИНОВ И ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

Харламов<sup>а</sup> А.В., Чердынцева<sup>б</sup> Т.А., Вендило<sup>а</sup> А.Г., Бондаренко<sup>а</sup> Н.А.

<sup>а</sup> Государственный научно-исследовательский институт химических реактивов и особо чистых химических веществ, Москва, Россия

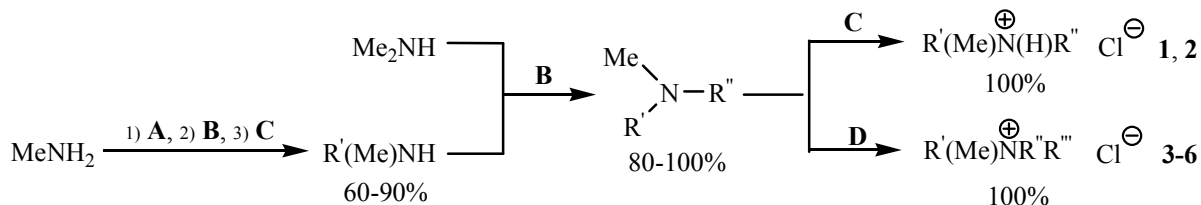
<sup>б</sup> Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) получили широкое распространение в производстве дезинфицирующих средств благодаря их бактерицидной активности по отношению к ряду патогенных микроорганизмов. Микробиологические исследования показывают, что циркулирующие в окружающей среде микроорганизмы способны формировать устойчивость не только к антибиотикам, но и к дезинфицирующим средствам. В связи с этим большое значение приобретает поиск новых соединений. С целью изучения влияния строения ЧАС, а также характера заместителей и их расположения в молекуле на бактерицидную активность был синтезирован ряд хлоридратов третичных аминов (**1**, **2**) и четвертичных аммониевых солей (**3-6**) симметричной и несимметричной структуры.



$n = 0 - 2$ ; **1**, **3**:  $R = \text{Me}$ ; **2**, **4**:  $R = \text{Bu}$ ;  $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{COO}^-$  ;  
**5**:  $R, R^1 = \text{Dodec}, \text{CH}_2\text{Ph}$ ; **6**:  $R, R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}, \text{Dodec}$ .

Разработан технологичный метод последовательного превращения метил- и диметиламина соответственно в симметричные и несимметричные хлоридраты третичных аминов и ЧАС (схема). Все стадии процесса проведены в межфазных системах (органическая фаза - водная фаза), что позволяет использовать водные растворы щелочи и аминов. Для синтеза несимметричных вторичных аминов разработан удобный метод с использованием защитной  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})$ -группы в условиях межфазного катализа (выход на исходный первичный амин составляет 60-90%).



**A**:  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{H}$ ,  $\text{CCl}_4$ , aq.  $\text{NaOH}$ ; **B**:  $\text{R}''\text{Hal}$ , aq.  $\text{NaOH}$ ; **C**: aq.  $\text{HCl}$ ; **D**:  $\text{R}'''\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$

Изучение бактерицидного действия синтезированных соединений по отношению к культурам *St. aureus*, *E.coli* и *Ps.aeruginosa*, показало, что по своей активности они не уступают таковой широко применяемого катамина АВ (**3**,  $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $n=0$ ). Среди них соединения **3** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $n=1$ ) и **5**, проявляющие максимальную активность по отношению к кишечной палочке, а также соединения **3** и **4** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n = 0$  и  $1$  соответственно), обладающие наибольшей активностью по отношению к *Ps.aeruginosa*, значительно превосходят по эффективности катамин АВ. При этом соединения с несимметричной структурой в той или иной степени превосходят по активности их симметричные аналоги.

Хлоридраты третичных аминов **1**, **2** проявляют такой же биоцидный эффект по отношению к кишечной и синегнойной палочкам, что и большинство изученных ЧАС, однако их эффективность по отношению к стафилококку золотистому заметно ниже.

Из двух алкоксикарбонилметильных производных ЧАС **5** и **6**, молекулы которых различаются расположением бензильного и высшего алкильного заместителя, более активным является соединение со связью N-Alk. Соединения с бетаиновой структурой обладают наименьшей активностью по отношению ко всем изученным культурам.



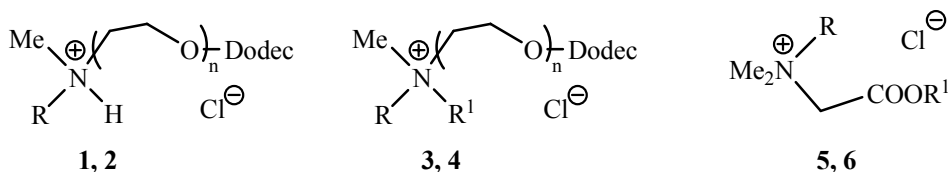
## SYNTHESIS AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF SOME TERTIARY AMINES HYDROCHLORIDES AND QUATERNARY AMMONIUM SALTS

Kharlamov<sup>a</sup> A.V., Cherdintseva<sup>b</sup> T.A., Vendilo<sup>a</sup> A.G., Bondarenko<sup>a</sup> N. A..

<sup>a</sup> State Research Institute of Chemical Reagents and High Purity Substances, Moscow, Russian Federation

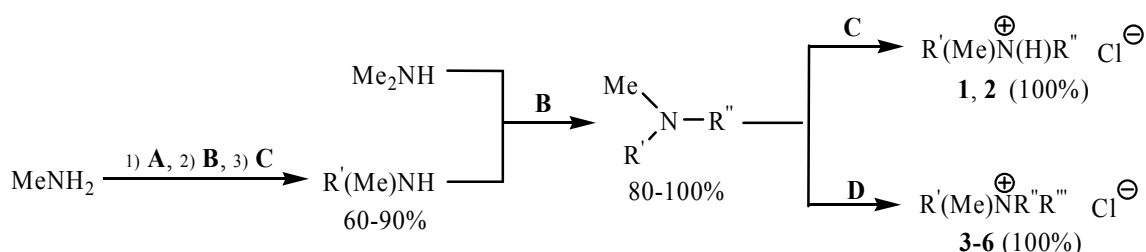
<sup>b</sup> Moscow State University, Moscow, Russian Federation

The antibacterial activity of quaternary ammonium compounds (QAC) against most common pathogens determines their wide application. But the microorganisms of environment are capable to acquire disinfectant resistance. Thus, the search for the new effective ammonium compounds draws much attention. A number of symmetrical and asymmetrical tertiary amines hydrochlorides (**1**, **2**) and quaternary ammonium salts (**3-6**) were synthesized and the effect of compound structure on the antibacterial activity was studied.



$n = 0 - 2$ ; **1**, **3**:  $R = \text{Me}$ ; **2**, **4**:  $R = \text{Bu}$ ;  $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{COO}^-$  ;  
**5**:  $R, R^1 = \text{Dodec}$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ; **6**:  $R, R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{Dodec}$ .

A simple technological method of successive conversion of methyl- and dimethylamine in the corresponding symmetrical and asymmetrical amines hydrochlorides and quaternary ammonium compounds has been developed (scheme). All procedure stages were carried out under phase transfer condition in liquid-liquid system allowed the use of an aqueous base and amines. Furthermore a convenient method has been developed for the transformation of primary amines into asymmetrical secondary amines using protecting  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})-$  group in a high yields (60-90%).



**A**:  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{H}$ ,  $\text{CCl}_4$ , aq.  $\text{NaOH}$ ; **B**:  $\text{R}'\text{Hal}$ , aq.  $\text{NaOH}$ ; **C**: aq.  $\text{HCl}$ ; **D**:  $\text{R}'''\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$

All synthesized compounds, except for betains **3** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{COO}^-$ ,  $n=0-2$ ), were effective against *St.aureus*, *E.coli* and *Ps.aeruginosa* like as the famous katamin AB (**3**,  $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $n=0$ ). Bactericidal effect of compounds **3** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $n=1$ ) and **5** with the highest activity against *E.coli* and compounds **3** и **4** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n=0$  and **1** correspondingly) with the highest activity against *Ps.aeruginosa* considerably exceeds that of katamin AB. Bactericidal activity of asymmetrical QAC in a varying degree is higher than their symmetrical analogs.

Hydrochlorides **1**, **2** are effective against *E.coli* and *Ps.aeruginosa*, like as majority QAC, but not against *St.aureus*. Alkoxy carbonylmethyl derivative **5** containing N-Dodec group is more effective than its analog **6** with N- $\text{CH}_2\text{Ph}$  bond.

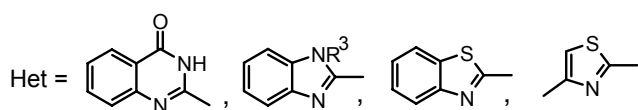
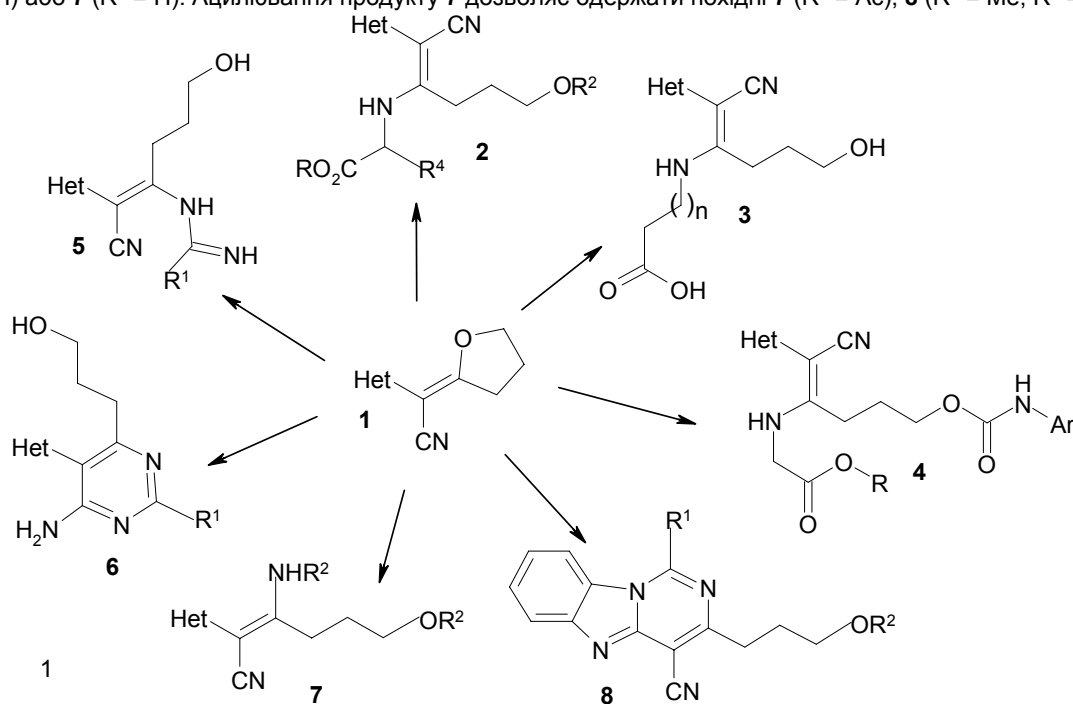


**РЕАКЦІЇ 2-ГЕТАРИЛ-2-(ТЕТРАГІДРО-2-ФУРАНІЛІДЕН)АЦЕТОНИТРИЛІВ З АМІНОКИСЛОТАМИ І 1,3-БІНУКЛЕОФІЛАМИ**

Хиля О.В., Мілохов Д.С., Воловенко Ю.М.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: olgakh@univ.kiev.ua

2-Гетарил-2-(тетрагідро-2-фураніліден)ацетонітрили – поліфункціональні сполуки. Знайдено, що в результаті взаємодії 2-гетарил-2-(тетрагідро-2-фураніліден)ацетонітрилів **1** з  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -амінокислотами або їх естерами утворюються 3-(*R*-аміно)-2-гетарил-6-гідрокси-2-гексаннітрили **2**, **3**, **4**. Реакції бінуклеофілів (амідинів) з ацетонітрилом **1** приводять до утворення продуктів рециклізації **6** та **8** ( $R^1 = \text{NH}_2$ ,  $R^2 = \text{H}$ ) або **7** ( $R^2 = \text{H}$ ). Ацилювання продукту **7** дозволяє одержати похідні **7** ( $R^2 = \text{Ac}$ ), **8** ( $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 = \text{Ac}$ ).



$R = \text{H, Me, Et, Bn}$ ;  $n = 1, 2, 4$ ;  $R^1 = \text{Alk, NH}_2, \text{NHAik, Ar}$ ;  $R^2 = \text{H, Ac}$ ;  $R^3 = \text{H, Me}$ ;

$R^4 = \text{H, CH}_2\text{OH, Bn, } i\text{-Bu, }$

Структура синтезованих сполук підтверджена даними ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ІЧ спектроскопії, РСД.  
Деякі синтезовані сполуки проявляють антивірусну активність (Дослідження антивірусної активності проведени в науковій групі Ляхова С.А. (Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України).

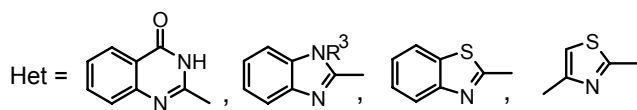
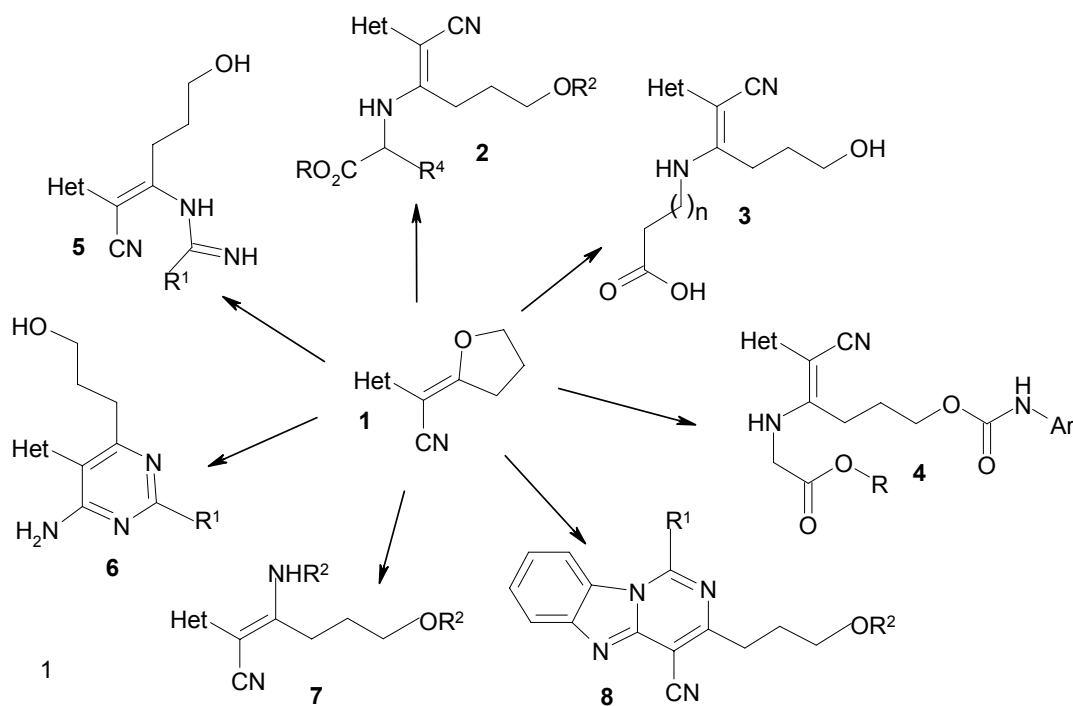


REACTIONS OF 2-HETARYL-2-(TETRAHYDRO-2-FURANYLIDEN)ACETONITRILES  
WITH AMINO ACIDS AND 1,3-BINUCLEOFILES

Khilya Olga V., Milokhov Demyd S., Volovenko Yulian M.

Department of Chemistry, Kyiv Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine  
e-mail: olgakh@univ.kiev.ua

2-Hetaryl-2-(tetrahydro-2-furanyliden)acetonitriles **1** are the polyfunctional compounds. It was found that reactions 2-hetaryl-2-(tetrahydro-2-furanyliden)acetonitriles **1** with  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -amino acids or their esters leads to 3-(R-amino)-2-hetaryl-6-hydroxy-2-hexanenitriles **2**, **3**, **4**. The reactions of binucleophiles (amidines) with acetonitriles **1** leads to products of recyclization **6** and **8** ( $R^1 = \text{NH}_2$ ,  $R^2 = \text{H}$ ) or **7** ( $R^2 = \text{H}$ ). The acylation of the products **7** leads to compound **7** ( $R^2 = \text{Ac}$ ), **8** ( $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 = \text{Ac}$ ).



$R = \text{H, Me, Et, Bn}$ ;  $n = 1, 2, 4$ ;  $R^1 = \text{Alk, NH}_2, \text{NHAlk, Ar}$ ;  $R^2 = \text{H, Ac}$ ;  $R^3 = \text{H, Me}$ ;

$R^4 = \text{H, CH}_2\text{OH, Bn, } i\text{-Bu}$ ,

The structure of compounds was proved by the data of NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , IR spectroscopy, X-ray structural analysis. Some synthesized compounds shows antiviral activity (Tests of antiviral activity were lead in Ljahov S.A.'s scientific group (A.V.Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine)).





## DUNALIELLA SALINA CNM-AV-02 – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Кирияк Т.В., Яцко Ю.А., Садовник Д. К., Рудик В.Ф.*

Институт Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова  
e-mail: iulia\_jatsko@yahoo.com, microbiotech@yahoo.com

*Dunaliella salina* является зеленой одноклеточной галофильной микроводорослью. Растет при высокой солености, благодаря чему редко заражается другими культурами. В странах с теплым климатом выращивается в открытых водоемах. *Dunaliella* может быть предложена в качестве модели в исследованиях галоадаптации не только у водорослей, но и у высших растений. Дуналиела продуцирует большое количество ценных биологически активных веществ, таких как  $\beta$ -каротин, жирные полиненасыщенные кислоты (незаменимые для человека и животных) и липиды. Солевой стресс усиливает скорость протекания основных физиологических процессов у водоросли – фотосинтеза, фотодыхания, и вызывает изменения в липидном составе.

Мы предлагаем технологии направленного синтеза жирных кислот у *Dunaliella salina*, и их дальнейшее использование в различных отраслях.

В качестве методов повышения выхода липидов предложено использование координационных соединений некоторых металлов, регулирование температуры и освещенности.

Результаты исследований:

1. Солевой шок, индуцируемый во время культивирования зеленой микроводоросли *Dunaliella salina*, является стимулятором липидогенеза, но снижает продуктивность микроводоросли.
2. Добавление NaCl в среду культивирования в середине log-фазы повышает абсолютный выход липидов.
3. Индуцируемый гиперосмотический стресс не влияет на липидный спектр и соотношение фосфолипидных фракций в *Dunaliella salina*.
4. Координационные соединения Fe(III) с аланином и валином являются стимуляторами липидогенеза у *Dunaliella salina* CNM-AV-02.
5. Координационные соединения Fe(III)-ala приводят к значительным изменениям в липидном составе, увеличивая количество нейтральных липидов и гликолипидов, и увеличивают содержание фосфатидилглицерола во фракции полярных липидов.
6. Соединения Fe(III)-ala и Fe(III)-val увеличивают абсолютное количество липидов в биомассе на 30%.



### **DUNALIELLA SALINA CNM-AV-02 – SOURCE OF BIOLOGIC ACTIVE COMPOUNDS**

*Kiriac Tatiana, Iatco Iulia, Sadovnic Daniela, Rudic Valery,*

Institute of Microbiology and Biotechnology of Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Moldova  
e-mail: iulia\_jatsko@yahoo.com, microbioteh@yahoo.com

*Dunaliella salina* is a green unicellular halophilic microalga. It can be a model for haloadaptation studies, not only for algae, but for high plants too. *Dunaliella* produces a high amount of valuable biologic active compounds, as  $\beta$  – carotene, polyunsaturated fatty acids (essential for animals and people), and lipids. Salt stress increases the basic physiologic functions in alga – photosynthesis and photorespiration, and changes in lipids composition.

It grows on high salt concentrations, due this it is very rare contaminated with other cultures. And in countries with warm climate *Dunaliella* is grown in open ponds.

We propose the technologies of fatty acids direct synthesis in *Dunaliella salina*, and their prospective using in different industries – in pharmacy, zootechny, medicine est.

As methods for lipids quantity increasing are proposed some metals coordinating compounds, temperature and irradiation regulating.

Obtained results:

1. Saline shock induced during the cultivation of green algae *Dunaliella salina* – CNM - AV-02 is the lipid genesis factor and decreases the productivity.
2. NaCl introducing in cultivation medium in the middle of log phases increases the absolute quantity of lipids in biomass
3. Inducted hyper osmotic stress doesn't affect on lipid spectrum and phospholipids fractional ratio in *Dunaliella*.
4. Fe(III) coordinative compounds with alanine and valine are lipid genesis stimulators on *Dunaliella salina* CNM-AV-02.
5. Fe(III)-ala induces insignificant changes in lipid ratio by the increasing of neutral lipids and glicolipids, and the phosphatidylglycerol maintenance increasing in polar lipid fraction.
6. Fe(III)-ala and Fe(III)-val coordinative compounds increase the lipids absolute quantity in biomass by 30%.



## ВЛИЯНИЕ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЛИПОГЕНЕЗ АКТИНОМИЦЕТОВ

<sup>1</sup>Кисель М.А., Попова Н.И., Бурцева С.А., Постолакий О.М., <sup>1</sup>Шарко О.Л.

<sup>1</sup>Институт Биоорганической химии НАН Белоруссии, Минск, Беларусь

e-mail: kisel@iboch.bas-net.by

Институт Микробиологии и Биотехнологии АН Молдовы, Кишинев, Молдова

e-mail: oleseap@yahoo.com

В последнее время особую актуальность приобретают исследования регуляции микробного липогенеза с использованием эффекторов с уникальными биорегуляторными свойствами на базе амидов жирных кислот. Теоретической основой этих исследований является модулирующее действие амидов жирных кислот на липогенную активность клеток, на ферменты липидного метаболизма, вызывающие конверсионные модификации липидных соединений. Эти исследования позволяют в сравнительном аспекте выяснить универсальность явления индуцированной олеогенности культур [1-4].

Целью исследований являлось изучение возможности регулирования синтеза липидов у актиномицетов с помощью эффекторов на основе амидов жирных кислот.

Объектами исследований являлись два штамма стрептомицетов: *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 (исходная культура) и полученный после  $\gamma$ -облучения *S.canosus* CNMN-Ас-03 [5]. Глубинное культивирование проводили на синтетической среде Дюлоне с ацетатом Na. В качестве индукторов липогенеза были использованы амиды жирных кислот: № 5 – 11-(3,5 ди-трет-бутил-2 гидроксифенилкарбамоил-ундециловая кислота); № 17 – лауроилэтаноламид; № 20 – N-стеароил-5-аминолевулиновая кислота в концентрациях  $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-4}$  М, синтезированные в Институте Биоорганической химии НАНБ.

Установлено, что из всех исследуемых амидов вещество №20 наиболее благоприятно действует на накопление биомассы обеими культурами: чем выше концентрация этого соединения, тем выше уровень биомассы. Количество ее у *S.canosus* CNMN-Ас-02 возрастает с увеличением концентрации и достигает 5,31 г/л (119,8% к контролю).

По данным проведенных экспериментов выявлено, что, как правило, в биомассе исследуемых штаммов происходит увеличение количества синтезируемых липидов.

Замечено, что культура *S.canosus* CNMN-Ас-03 отличается более высоким содержанием липидов в биомассе по сравнению с исходной культурой *S.canosus* CNMN-Ас-02. Наиболее существенное увеличение содержания липидов в биомассе этого штамма отмечается в случае добавления в среду амида № 20 и достигает 22,94% (контроль 6,93%).

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что исследуемые амиды жирных кислот являются эффективными эндогенными липидными биорегуляторами, оказывающими существенное влияние на рост стрептомицетов, накопление биомассы и липидов и их фракционный состав.

Экспериментально доказано, что культура *S.canosus* CNMN-Ас-03, полученная после  $\gamma$ -облучения, более подвержена воздействию экзогенных амидов жирных кислот.

Таким образом, исследуемые амиды жирных кислот существенно влияют на количественный состав липидных фракций. Некоторые из них в определенных концентрациях индуцируют биосинтез отдельных фракций, другие вызывают ингибирование их биосинтеза.

### Литература

1. Iain M.K. Ghmuschchi F., Yu B.L. et al. Fatty acid amides: scooting modebassed discovery of tight-binding competitive inhibitors of secreted phospholipaze A<sub>2</sub>, J. Med. Chem., 1992, 35, Nr. 19, p. 3584-3586
2. Андреюк Г.М., Кисель М.А., Литвиненко Н.М., Влияние амидов жирных кислот на катализируемый фосфолипазой А<sub>2</sub> гидролиз фосфатидилхолина в мицеллах, Укр. Биохим. Журн., 1997, т.69, №1, с. 32-36
3. Безуглов В.В., Грецькая Н.М., Блаженова А.В., Андрианова Е.Л., Акимов М.Г. и др. Арахидоноиламинокислоты и арахидоноиламинопептиды: синтез и свойства, Биоорг. химия, 2006, т.32, № 3, с. 258-267
4. Патент 006768, Евразийское патентное ведомство, МПК А61К 31/44, А61Р 1/18, А61Р 29/00. Ингибитор фосфолипазы А<sub>2</sub> / Федорук А.М., иель М.А., Петров П.Т., Федулов А.С., (РБ); Заявл. 07.06.2004, Оpubл. 28.04.2006; Бюл. № N EAB 20602
5. Бурцева С. А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения). Автореф. дисс. док. хаб. биол. наук., Кишинев, 2002, 35 с.



## EFFECT OF FATTY ACID AMIDES ON LIPOGENESIS OF ACTINOMYCETES

<sup>1</sup>Kiseli M.A., Popova N.I., Boortseva S.A., Postolaky O.M., <sup>1</sup>Sharko O.L.

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic chemistry of Byelorussian NAS, Minsk, Belorussia

e-mail: kisel@iboch.bas-net.by

Institute of Microbiology and Biotechnology of Moldavian Academy of Science, Chisinau, Moldova

e-mail: oleseap@yahoo.com

In recent studies the regulation of microbial lipogenesis, with the effectors on the basis of fatty acid amides, has acquired special actuality. The theoretical basis of these studies is the modulating effect of fatty acid amides in lipogenesis activity of cells and enzymes of lipid metabolism [1-4]

The aim of investigations was studying of possibility to regulate the synthesis of lipids from actinomycetes using effectors on the basis of fatty acid amides.

The objects of study were two strains of streptomycetes: *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 (initial strain) and obtained after  $\gamma$ -irradiation *S.canosus* CNMN-Ac-03 [5]. As inductor of lipogenesis were used amides of fatty acids: № 5 - 11 - (3,5 di-tert-butyl-2-hydroxifenilcarbamoil undecylic acid); № 17 - lauroiletanolamid; № 20 - N-stearoil-5-aminolevulinic acid in concentrations  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M, synthesized at the Institute of Bioorganic Chemistry, NASB.

It was found that the substance № 20 actively stimulates the accumulation of biomass of the investigated strains: the higher concentration of the compound has led to higher accumulations of biomass. The quantity of biomass at *S.canosus* CNMN-Ac-02 increases with increasing of concentration and reaches 5.31 g / l (119.8% of control).

Experiments have shown that, in the biomass of the investigated strains the quantity of synthesized lipids has increased.

Was observed that strain *S.canosus* CNMN-Ac-03 has a higher content of lipids in biomass compared to the initial strain *S.canosus* CNMN-Ac-02. The most significant increase in lipid content in the biomass of this strain was observed in the variant with adding on medium substance № 20 and reached 22.94% in biomass (control 6.93%).

Thus, it was shown that the investigated amides of fatty acids are effective endogenous lipid bioregulators with significant influence on the growth of the streptomycetes, on accumulation of biomass and on synthesis of lipids.

### References

1. Iain M.K. Ghmuschchi F., Yu B.L. et al. Fatty acid amides: scooting modebassed discovery of tight-binding competitive inhibitors of secreted phospholipaze A<sub>2</sub>, J. Med. Chem., 1992, 35, Nr. 19, p. 3584-3586
2. Андреюк Г.М., Кисель М.А., Литвиненко Н.М., Влияние амидов жирных кислот на катализируемый фосфолипазой А<sub>2</sub> гидролиз фосфатидилхолина в мицеллах, Укр. Биохим. Журн., 1997, т.69, №1, с. 32-36
3. Безуглов В.В., Грецькая Н.М., Блаженова А.В., Андрианова Е.Л., Акимов М.Г. и др. Арахидоноиламинокислоты и арахидоноиламинопептиды: синтез и свойства, Биоорг. химия, 2006, т.32, № 3, с. 258-267
4. Патент 006768, Евразийское патентное ведомство, МПК А61К 31/44, А61Р 1/18, А61Р 29/00. Ингибитор фосфолипазы А<sub>2</sub> / Федорук А.М., иель М.А., Петров П.Т., Федулов А.С., (РБ); Заявл. 07.06.2004, Опубл. 28.04.2006; Бюл. № N EAB 20602
5. Бурцева С. А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения). Автореф. дисс. док. хаб. биол. наук., Кишинев, 2002, 35 с.



## ОСАДОЧНЫЕ ДРОЖЖИ ВИНОДЕЛИЯ – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Киселица О.А., Топалэ Л.И., Усатый А.С., Киселица Н.Н., Молодой Е.В.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АН Молдовы, Кишинёв, Молдова  
e-mail: chiselita@mail.ru

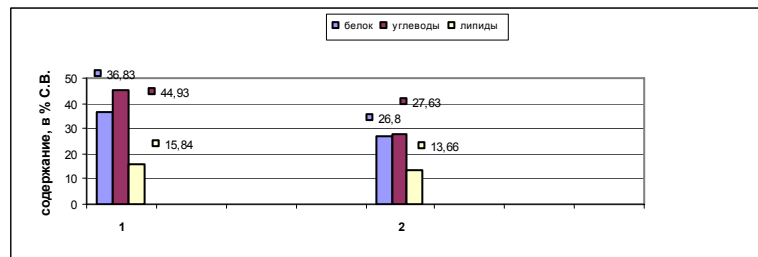
Виноделие является одной из самых важных и развитых отраслей Республики Молдова. Так как дрожжевые осадки составляют 5-12% от объёма производимого вина, ежегодно на винодельческих предприятиях Молдовы накапливается до 12-13 тысяч тон таких осадков, поэтому становится очевидной необходимость их утилизации [3].

На основе микробных биологически активных веществ разрабатываются разного рода пищевые и кормовые добавки [1,2,4]. Благодаря повышенному интересу к этой теме, задача поиска и выявления новых источников таких веществ была и остаётся весьма актуальной.

Осадочные дрожжи виноделия, которые после отгона остаточного этанола выбрасываются, могут служить источником биологически активных веществ таких как белки, незаменимые аминокислоты, витамины, липиды богатые фосфолипидами, ненасыщенными жирными кислотами, эргостеролом (провитамин D) и углеводы. Определение биохимического состава биомассы микроорганизма является первостепенной задачей в процессе разработки различных экологически безвредных продуктов.

Целью исследований было определение биохимического состава осадочных дрожжей виноделия для последующего получения различных пищевых и кормовых добавок. В опытах использовали биомассу дрожжей, полученную при производстве белого (Chardonnay) и красного (Cabernet) вина.

Исследования показали, что биохимический состав биомассы осадочных дрожжей варьирует в широких пределах, в зависимости от их происхождения. Биомасса содержит в % С.В.: белка 26,80-36,83%, липидов 13,66-15,84%, углеводов 27,63-44,93%. Рис.1



Примечания: 1-осадочные дрожжи красного вина; 2-осадочные дрожжи белого вина  
**Рис 1.** Биохимический состав осадочных дрожжей виноделия

Следует отметить что белки содержат большое количество незаменимых (в % от суммы аминокислот): 39,78% (красные), 41,53% (белые) и иммунноактивных аминокислот. Дрожжи содержат существенное количество глицина, валина, лейцина, лизина и серина. Липиды исследованных дрожжей, также отличаются ценным составом: ненасыщенные жирные кислоты, стерины, фосфолипиды, моно – ди и триглицериды.

Жирные кислоты содержат (в % от суммы жирных кислот): олеиновую кислоту (C<sub>18:1</sub>) - 5,95 (белые) 8,10 (красные) %, линолевую (C<sub>18:2</sub>)-10,20...25,46%, линоленовую (C<sub>18:3</sub>) – 2,23...7,16%. Стерины которые составляют 6,53-10,48 % от суммы липидов представлены в основном эргостерином (провитамин Д).

Из всего вышеизложенного можно сделать вывод что осадочные дрожжи являются ценным источником биологически активных веществ и могут быть использованы при разработке различных пищевых и кормовых добавок, белково-витаминных концентратов, косметических средств.

### Литература:

1. ABDEL-MONEM M. M., Anderson M. D. Copper complexes of alfa-amino acids that contain terminal amino groups and their use as nutritional supplements. USA. Patent № 4948594, 1990.
2. BUI K., Garly P. Food yeast / J. F. Spencer, D. M. Spencer (eds.) Yeast technology: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1990. P. 241–265.
3. BULIMAGA С. „Deșeuri viniviticole: Formarea și tehnologiile de prelucrare, tratare și valorificarea lor”// Chișinău, 1999.- 40 p.
4. COMPANIES manufacturing enzymatic of microbial feed additives. Biotechnol. News. 1990. v. 10, nr. 17., p.3-5.

▣ Исследования были проведены при поддержке Высшего Совета по Науке и Технологическому Развитию АН Молдовы, независимый проект 07.411.11. INDA «Определение биологически активных веществ в осадочных дрожжах виноделия как источника получения биопрепаратов».



## THE SEDIMENT WINERY YEASTS AS SOURCE FOR BIOLOGIC ACTIVE COMPOUNDS

*Chiselita O., Topala L., Usaty A., Chiselita N., Molodoi E.*

Institute of Microbiology and Biotechnology, Moldova Academy of Sciences, Chisinau, Moldova  
e-mail: chiselita@mail.ru

The winery is one of the most important and developed areas in Moldova Republic. Due that yeasts sediments consist 5-12% from wine products, every year on Moldova winery factories about 12-13 thousands tones of such sediments are deposited. That is why their utilization becomes so evidential problem [3].

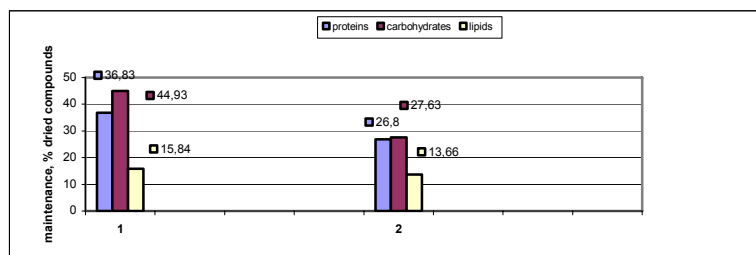
On the basis of microbe biological active compounds the different food and feed additives are elaborated [1,2,4]. Thanks to increased interest to this theme, the problem of search and discovering of such compounds new sources, have been and still remains enough urgent.

The sediment winery yeasts which are thought out after ethanol topping, could be used like source of such biologic active compounds as proteins, essential amino acids, vitamins, lipids enriched in phospholipids, polyunsaturated fatty acids, ergosterol(provitamin D) and carbohydrates.

The microorganism biomass compound determination is the supreme problem in the process of some ecological harmless products development.

The scope of studying was to determine biochemical composition of winery sediment yeasts for the future obtaining of food and feed additives. In the experiments the yeasts biomass obtained after the white(Chardonnay) and red (Cabernet) wines production has been used.

The studies showed the biochemical composition of winery sediment yeasts varies in large scale, depending on their origin. Biomass contains in% of dried compound: proteins – 26,80-36,83%, lipids – 13,66-15,84%, carbohydrates – 27,63-44,93%. Fig.1.



Legend: 1-sediment yeasts of red wine; 2- sediment yeasts of white wine  
**Fig 1.** Biochemical composition of sediment yeasts.

Must be mentioned, that proteins contain big quantity of essential (in % of amino acids sum) amino acids: 39,78% (red), 41,53% (white) and immunoactive amino acids. Yeasts contain great deal of glycine, valine, leycine, lysine and serine. Lipids of studied yeasts excel with valuable composition: polyunsaturated fatty acids, sterins, phospholipids, mono-, bi- and tryglycerids. Fatty acids contain (in % of fatty acids sum): oleic acid (C<sub>18:1</sub>) - 5,95 (white)...8,10 (red) %, linolic (C<sub>18:2</sub>) - 10,20...25,46%, linolenic (C<sub>18:3</sub>) – 2,23...7,16%. Sterins, which contain 6,53-10,48 % from lipids sum, are present in general by ergosterin (provitamin D).

From all these could be summarized that sediment yeasts are the valuable source of biologic active compounds and could be used for different food and feed additives, protein-vitamin concentrates, cosmetic products elaboration.

### References:

1. ABDEL-MONEM M. M., Anderson M. D. Copper complexes of alfa-amino acids that contain terminal amino groups and their use as nutritional supplements. USA. Patent № 4948594, 1990.
2. BUI K., Garly P. Food yeast / J. F. Spencer, D. M. Spencer (eds.) Yeast technology: Springer-Verlag Berlin Heidelbere. 1990. P. 241–265.
3. BULIMAGA C. „Deșeuri viniviticole: Formarea și tehnologiile de prelucrare, tratare și valorificarea lor”// Chișinău, 1999.- 40 p.
4. COMPANIES manufacturing enzymatic of microbial feed additives. Biote acid schnol. News. 1990. v. 10, nr. 17., p.3-5.

«The researches have been done by the supporting of Supreme Council for Science and Technological Development of Moldova Academy of Sciences, independent project 07.411.11. INDA «The determination of biological active compounds in sediment winery yeasts as the source for biopreparations obtaining».



## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 1-(1,1-ДИОКСОТИЕТАНИЛ-3)ТРИАЗОЛОВ С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ - СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

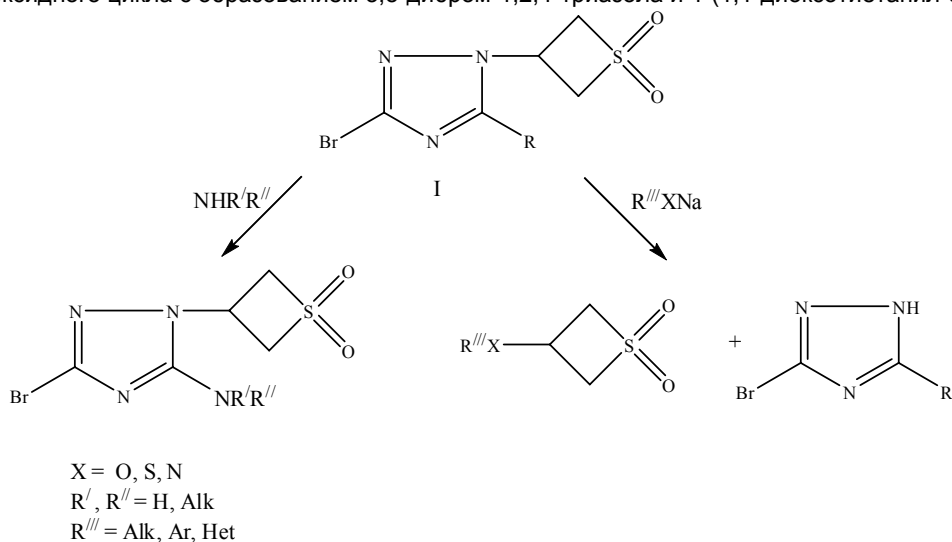
Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А., Макарова Н.Н., Гильманова А.Г.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия  
e-mail: khaliullin\_ufa@yahoo.com

С целью синтеза новых биологически активных соединений в ряду производных триазола, содержащих тиетан-1,1-диоксидный цикл, нами изучено взаимодействие 5-замещенных 3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолов (I) с различными нуклеофильными реагентами.

Исходные 5-R-3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолы получены путем окисления соответствующих 5-R-3-бром-1-(тиетан-3)-1,2,4-триазолов пероксидом водорода в среде ледяной уксусной кислоты [1].

Взаимодействие соединения I (R= Br) с первичными и вторичными аминами приводит к замещению атома брома по положению 5 триазольного цикла и образованию соответствующих 5-амино-3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолов. Реакция соединения I (R= Br) с NH-азолами отсутствие оснований не протекает. В случае использования натриевых солей гетероциклов происходит элиминирование тиетан-1,1-диоксидного цикла с образованием 3,5-дибром-1,2,4-триазола и 1-(1,1-диоксотиетан-3)азолов.



При взаимодействии исходных 5-R-3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолов I (R = Br, OAlk, OAr, N(Alk)<sub>2</sub>) с O- и S-содержащими нуклеофилами: алкоголями, фенолями и тиолями натрия также происходит элиминирование тиетандиоксидного цикла и образуются соответствующие 3-алкокси-, 3-арилокси-, 3-алкилтио-, 3-арилтиотиетан-1,1-диоксиды и 5-R-3-бром-1,2,4-триазолы (R = Br, OAlk, OAr, N(Alk)<sub>2</sub>) [2].

Структура синтезированных соединений подтверждена данными элементного анализа, а также ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и ИК-спектроскопии.

Таким образом, в зависимости от строения исходного диоксотиетан-1,1-диоксидтриазола, вида реагента и условий протекания реакции возможно как замещение атома брома по 5 положению (в случае 3,5-дибром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазола) и образование 5-аминозамещенных 3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолов, так и элиминирование тиетандиоксидного цикла и образование 3-замещенных тиетан-1,1-диоксидов и N-незамещенных 1,2,4-триазолов.

В результате фармакологического скрининга синтезированных соединений были обнаружены вещества - 3-замещенные тиетан-1,1-диоксиды, антидепрессивная активность которых сравнима с флуоксетином. Изучение влияния синтезированных соединений на активность монооксигеназной системы печени показало, что наиболее активными индукторами являются диоксотиетан-1,1-диоксидтриазолы, содержащие в 5 положении фрагменты вторичных гетероциклических аминов.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что взаимодействие 5-замещенных 3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3)-1,2,4-триазолов с нуклеофильными реагентами является перспективным способом получения трех новых классов потенциально биологически активных веществ.

### Литература:

- Исхакова Г.Ф., Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А. // Науки о человеке: сборник статей Третий международный конгресс молодых ученых и специалистов. – Томск, 2002. - С.217-218.
- Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А., Макарова Н.Н. // Журн. орган. химии. 2008, 44, 1729-1732.



REACTION OF 1-(1,1-DIOXIDOTHETANYL-3)TRIAZOLES WITH NUCLEOPHILIC REAGENTS – AN ACCESS TO POTENTIALLY BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

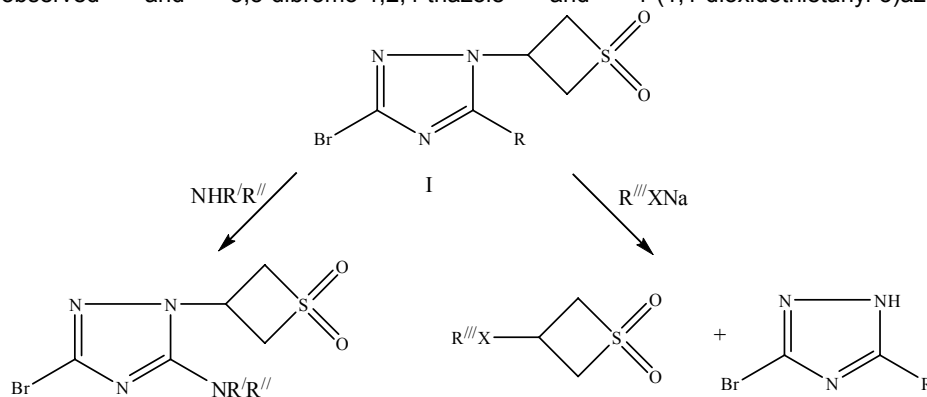
Klen E.E., Khaliullin F.A., Makarova N.N., Gilmanova A.G.

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia  
e-mail: khaliullin\_ufa@yahoo.com

In order to obtaining novel biologically active compounds in the series of 1,2,4-triazoles bearing thietane 1,1-dioxide moiety, we studied reactions of 5-substituted 3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles (I) with various nucleophilic reagents.

The starting 5-R-3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles were prepared by oxidation of the 5-R-3-bromo-1-(thietanyl-3)-1,2,4-triazoles with hydrogen peroxide in a glacial acetic acid [1].

The reaction of compound I (R = Br) with primary and secondary amines leads to the substitution of bromine atom at position 5 of 1,2,4-triazole and corresponding 5-aminosubstituted 3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles were obtained. Treatment of compound I (R = Br) with NH-azoles without base did not afford to 5-azolyderivatives. In the case of using sodium salts of heterocycles elimination of thietane 1,1-dioxide cycle is observed and 3,5-dibromo-1,2,4-triazole and 1-(1,1-dioxidothietanyl-3)azoles were obtained.



X = O, S, N  
R', R'' = H, Alk  
R''' = Alk, Ar, Het

Treatment of 5-R-3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles I (R = Br, OAlk, OAr, N (Alk)<sub>2</sub>) with O- and S- nucleophiles leads to elimination of thietane 1,1-dioxide cycle with formation of 3-alkoxy-, 3-aryloxy-, 3-alkylthio-, 3-arylthiothietane 1,1-dioxide and 5-R-3-bromo-1,2,4-triazoles (R = Br, OAlk, OAr, N (Alk)<sub>2</sub>) [2].

The structure of the synthesized compounds confirmed by elemental analysis and <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C and IR spectroscopy.

Thus, depending on the structure of the original (1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazole, type of reagent and reaction conditions there are possible both replacement of bromine atom at position 5 (in the case of 3,5-dibromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazole) with formation of 5-aminoderivatives and elimination of thietane 1,1-dioxide cycle with formation 3-substituted thietane 1,1-dioxides and NH-1,2,4-triazoles.

The pharmacological screening of synthesized compounds on antidepressant activity was shown that 3-substituted thietane 1,1-dioxides have antidepressant activity comparable to fluoxetine. The study of the effect of synthesized compounds on activity of the liver monooxygenase system was shown that 3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles containing at 5 position fragment of secondary amines are most effective inductors.

In conclusion, reactions of 5-substituted 3-bromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazoles with nucleophilic reagents is an access to new classes of potentially bioactive substances.

References:

1. Iskhakova G.F., Klen E.E., Khaliullin F.A. // Science of Man: The third collection of articles of the International congress of young scientists and specialists. - Tomsk, 2002. - C.217-218.
2. Klen E.E., Khaliullin F.A., Makarova N.N. // Russian Journal of Organic Chemistry. 2008, 44, 1729-1732.





## ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ГРИБОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИКРОВОЛНОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Коломийчук С. Г.<sup>1</sup>, Бошков Л. З.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Госучреждение «Институт им. В.П. Филатова АМН Украины»,  
<sup>2</sup> Одесская государственная академия холода, Одесса, Украина  
e-mail: Kolomiychuk\_odes@mail.ru

Экстрагирование биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья связано, как правило, с использованием традиционных технологий когда в качестве экстрагентов используют воду, органические растворители, растительные и минеральные масла. Существенным недостатком такого технологического процесса является длительный контакт исходного сырья с экстрагентом, необходимый для пассивной экстракции за счет диффузии наиболее лабильных клеточных компонентов. Тем не менее определенная часть биологически активных веществ остается не экстрагированной. Применение микроволнового поля способствует повышению скорости и эффективности экстрагирования БАВ. Экстракторы, в которых используется микроволновая технология, достаточно эффективны, имеют относительно низкую себестоимость, экологически безопасны и позволяют сохранить физиологическую активность экстрагированных веществ.

В настоящее время большое внимание уделяется промышленному выращиванию грибов, что обусловлено их питательной ценностью. Кроме того грибы содержат вещества, имеющие противоопухолевую активность (1,3-R-D- глюканы грибов - пентинан, шизифилан, курдлан), незаменимые аминокислоты, витамины группы В, ниацин, аскорбиновую кислоту, минеральные вещества и другие БАВ, что и определяет возможность их использования при профилактике различных заболеваний.

Цель исследования - оценка эффективности экстрагирования БАВ из грибов при применении микроволновой технологии.

Плодовые тела дереворазрушающего гриба вешенки и Шии – таке (*Lentinus edodes*) измельчали и использовали для экстрагирования БАВ с помощью аппарата Сокслета в течение 3 часов без и с микроволновой обработкой в течении 5 мин (600 Вт).

Для оценки влияния БАВ полученных экстрактов (обычное встряхивание, Сокслет-экстракция и Сокслет-экстракция в сочетании с микроволновой обработкой) грибов использовали дрожжевой тест. Исследования проводили с чистой культурой *Saccharomyces cerevisiae* (штам 47) в стерильных условиях. Через 20 часов после инкубации дрожжевой суспензии с экстрактами при 28°C измеряли оптическую плотность растворов и по разнице между опытной и контрольными пробами судили об активности препарата (усл. ед.).

В другой серии экспериментов у кроликов моделировали герпетический кератит. Для заражения использовали штам вируса простого герпеса 1 типа, полученный на заводе бактериальных препаратов (титр 4,0 ТЦД 50). На третьи сутки у зараженных животных наблюдалась клиническая картина, характерная для герпетического кератита. Контролем служили 10 кроликов (10 глаз) интактных животных. Полученный экстракт Шии-таке после комбинированной экстракции ежедневно 5 раз в день инстиллировали в глаз. В разные сроки наблюдения в роговице глаз получавших и не получавших инстилляцию экстракта, а также интактных животных определяли уровень окисленного и восстановленного глутатиона

Исследование биологической активности экстрактов из плодовых тел вешенки на дрожжевом тесте показало, что наиболее эффективна экстракция биологически активных веществ с применением микроволновой обработки – 109% ( $p > 0,05$ ) при Сокслет – экстракции и 116% ( $p < 0,01$ ) при Сокслет – экстракции в сочетании с микроволновой обработкой относительно контроля с обычным встряхиванием. Установлено также, что экстракт из Шии-таке обладает большей активностью по сравнению с экстрактом вешенки.

При моделировании герпетического кератита значительно возрастало содержание окисленного глутатиона в роговице кроликов в разные сроки наблюдения и только через 34 суток его уровень значимо не отличался от контроля. Уровень восстановленного глутатиона в роговице с кератитом был резко понижен на всех сроках эксперимента. Установлено, что данные опытной группы при применении экстракта значимо не отличались от контроля при исследовании уровня окисленной формы глутатиона уже на 21 сутки, а уровня восстановленного глутатиона через 34 суток. Полученные данные представляют несомненный интерес учитывая, что глутатион является важным компонентом антиоксидантной и детоксикационной системы в тканях. Использование экстракта способствовало регенерации роговицы в более ранние сроки по отношению к группе без экстракта.

Касааясь механизмов увеличения эффективности экстрагирования с помощью микроволновой технологии следует отметить, что при температуре жидкости внутри частиц, близкой к температуре ее кипения, молекулярный механизм внутреннего массопереноса заменяется конвективным и скорость процесса увеличивается. В традиционных технологиях, изменение структуры и размера частиц при подготовке к экстрагированию, заметно не ускоряет процесс, так как механизм внутреннего массопереноса не изменяется и остается молекулярным.

*Работа выполнена в рамках проекта № 3141 УНТЦ.*



## EFFICIENCY INCREASE OF MUSHROOMS' BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION WITH THE MICROWAVE TECHNOLOGY

Kolomiychuk S. G.<sup>1\*</sup>, Boshkov L. Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Filatov State Institute of Ukrainian Academy of Medical Sciences, Odessa, Ukraine

<sup>2</sup>Odesa State Academy of Refrigeration, Odessa, Ukraine

e-mail: Kolomiychuk\_odes@mail.ru

Traditional practices of bioactive compounds (BAC) extraction from vegetative raw materials usually use as an extracting medium water, organic solvents and vegetable or mineral oils. The substantial deficiency of this approach is a long-term contact between raw materials and extracting medium which is necessary for the passive extraction due to diffusion of the most labile cell components. Nevertheless, with this class of techniques the full BAC extraction is usually unattainable.

The microwave field application promotes the velocity and effectiveness of BAC extraction. Extractors that use microwave technique are enough effective, have relatively low cost price, ecologically safe and allow to preserve a physiological activity of extracted compounds.

The industrial cultivation of mushrooms currently attracts a considerable attention due to their great nutritional value. More over, mushrooms contain compounds that propagate an anti-tumour activity (mushroom 1,3-R-D-glucans – penthynane, shiziphylane, curdlane), essential amino acids, group B vitamins, nicotinic acid, ascorbic acid, mineral compounds and other BACs. All these allow to use mushrooms for the preventive health care.

The aim of this study is an assessment of BAC extraction from mushrooms with a microwave technique.

The oyster mushroom and shii-take (*Lentinus edodes*) mycothalluses where grinded and underwent the BAC extraction with Soxhlet's apparatus during three hours with or without five minutes of microwave treatment at 600 watts.

For the assessment of BAC influence in final mushroom' extracts (ordinary shaking, Soxhlet's extraction and Soxhlet's extraction with microwave treatment) the yeast test was used. Investigation was performed at a clear culture of *Saccharomyces cereisiae* (strain 47) in a sterile environment. After 20 hours of incubation of the yeast suspension with different extracts at 28°C we measured an optical density. The extract's activity was evaluated basing on the difference between optical densities of control and experimental samples in arbitrary units.

In another experimental series the herpetic keratitis was modelled at rabbits by infecting them with the herpes type 1 virus (prepared at a bacterial drugs factory, titre 4.0 TCD 50). On the third day after infection infected animals displayed a clinical presentation of the herpetic keratitis. 10 intact rabbits (10 eyes) were used as a control group. The shii-take extract after the combined extraction was instilled into eye daily. The concentration of a reduced and oxidized glutathione was measured in cornea of animals that underwent or did not underwent instillation, and animals of control group.

Data processing was performed with a Statistica 5.5 software by descriptive statistical methods and Student's t-test for groups with equal or unequal variances.

Study of biological activity of extracts from oyster mushroom mycothalluses at an yeast pastry revealed that the most effective extraction of BACs with a microwave treatment is 109% ( $p > 0.05$ ) with Soxhlet's extraction and 116% ( $p < 0.01$ ) with Soxhlet's extraction combined with microwave treatment compared to control with ordinary shaking. It was also shown that shii-take extract is more active than extract of oyster mushroom.

The oxidized glutathione content in rabbits' cornea was considerably increased in different time intervals and only after 33 days did not differ significantly from control values. The reduced glutathione in cornea with keratitis was markedly decreased at all experimental time intervals. It was shown that experimental group data after the treatment with extracts did not differ significantly from control in terms of oxidized glutathione content after 20 days and in terms of reduced glutathione content after 33 days. These data are of considerable interest, since glutathione is an important component antioxidative and detoxificative system of living tissues. Extract use promoted cornea regeneration in shorter time period compared to control group.

As to mechanisms that increase extraction effectiveness due to microwave treatment we would like to mention that when temperature of a liquid inside particles comes close to the boiling point, the molecular mechanism of inner mass transfer undergoes replacement with a convectional that leads to the overall increase of the process velocity. Changes of particles' structure and size in traditional techniques during the preparation for extraction does not cause a noticeable acceleration of an overall process since the mechanism of inner mass transfer does not change and remains molecular.

*This study was performed in a project # 3141 UNTC*



## БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ ИНДОЛЬНОГО РЯДА В КЛЕТКАХ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ БАРВИНКА МАЛОГО (*Vinca minor* L.)

Молчан О.В., Ромашко С.Н., Сатыго А.Н., Курченко В.П.

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь  
e-mail: svetlan\_rom@mail.ru

Фармакологическая ценность барвинка малого (*Vinca minor* L.) обусловлена высоким содержанием в надземной части растения алкалоидов индольного ряда, основным из которых является дитерпеновый алкалоид винкамин. Лекарственные препараты, содержащие сумму алкалоидов барвинка малого (винкатон («Гедеон Рихтер», Венгрия), винкапан (Болгария), винканор (Украина)) применяют при спазмах сосудов головного мозга, I и II стадиях гипертонической болезни, неврогенной тахикардии, при депрессивных состояниях и др.

Особое значение имеет разработка и внедрение современных технологий, позволяющих получать экологически чистые препараты растительного происхождения, содержащие необходимые фармакологически активные вещества в достаточном количестве независимо от внешних климатических условий. Одной из таких технологий является культивирование клеток и тканей растений. Однако очень часто в культурах *in vitro* достаточно сложно определить условия индукции биосинтеза и накопления конечных продуктов вторичного метаболизма. Это касается, в частности, биосинтеза алкалоидов индольного ряда в *Catharanthus roseus*. Для катарантуса розового подобраны среды с различным составом фитогормонов и получены культуры с высокими скоростью роста и уровнем накопления биомассы, но в большинстве случаев конечные продукты биосинтеза алкалоидов индольного ряда – винбластин и винкристин – либо не образуются, либо находятся на крайне низком уровне.

Первая реакция пути биосинтеза всех алкалоидов индольного ряда – это превращение L-триптофана в триптамин, катализируемое ферментом триптофан декарбоксилазой. Следующий этап биосинтеза заключается в конденсации триптамина с циклическим альдегидом – секологанином. На первой стадии образуется шиффово основание, которое циклизуется с образованием стриктозидина (изовинкозида) – общего предшественника всех терпеноидных индольных алкалоидов. Поскольку накопление практически важных вторичных метаболитов в высших растениях часто определяется активностью синтеза их предшественников, целью данной работы было исследование содержания L-триптофана, триптамина, секологанина и винкамина в каллусной ткани при культивировании на средах с различным содержанием фитогормонов.

Каллусная ткань была получена из листовых эксплантов. Каллус культивировали в темноте при температуре 25-26<sup>0</sup>С на среде Мурасиге и Скуга, содержащей сахарозу, пиридоксин, тиамин хлорид, глицин, фитогормоны. При инициации каллусогенеза и культивировании каллуса варьировали содержание регуляторов роста в питательной среде: кинетин, НУК и 2,4 Д. Определение содержания винкамина и его предшественников осуществляли с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Agilent 1100, США.

В ходе проведенных исследований было установлено, что при уменьшении в среде культивирования содержания НУК или замене НУК на 2,4-Д снижается, как интенсивность каллусогенеза, так и накопление биомассы каллусной культурой барвинка малого *Vinca minor* L.

На содержание триптофана в каллусной ткани на стационарной фазе роста изменение концентрации ауксина в среде культивирования существенного влияния не оказывало. Возможно, это связано с тем, что аминокислота L-триптофан не является незаменимой для растений и снижение концентрации ауксина в среде не затрагивает шикиматный путь биосинтеза ароматических аминокислот. Было установлено также, что уменьшение содержания НУК в среде культивирования, и замена НУК на 2,4-Д приводит к значительному снижению накопления триптамина и секологанина и ингибирует дальнейший процесс биосинтеза индольных алкалоидов.

Особый интерес представляло сравнение содержания винкамина в полученной каллусной ткани и в интактном растении. Как было установлено ранее, содержание винкамина в свежесобранных листьях барвинка малого составило 324 мкг/г. К сожалению, во всех исследованных каллусных линиях содержание конечного продукта биосинтеза алкалоидов индольного ряда – винкамина – было ниже предела определения. Однако в клетках каллуса, культивируемой на среде с высоким содержанием НУК был обнаружен аналог, либо предшественник винкамина. Данное вещество характеризовалось спектром поглощения, абсолютно идентичным спектру поглощения винкамина, но отличалось по времени удержания. Обнаружение «предшественника» винкамина может свидетельствовать о более высоком уровне биосинтеза индольных алкалоидов в клетках данной каллусной линии.

Исходя из результатов проведенного исследования, становится очевидным, что выход винкамина, который напрямую зависит от количества триптамина и секологанина – исходных продуктов реакций биосинтеза, связан с ростовыми процессами и зависит от содержания ауксина в среде культивирования.



## THE INDOLE ALKALOIDS BIOSYNTHESIS IN *VINCA MINOR* CALLUS CULTURE

Molchan O.V., Romashko S.N., Satygo A.N., Kurchenko V.P.

Belarusian State University, Minsk, Belarus  
e-mail: svetlan\_rom@mail.ru

Over ground organs of *Vinca minor* (L.) are a rich source of pharmacologically important indole alkaloids. One of the most significant indole alkaloids of this plant is diterpene alkaloid vincamine. The pharmaceutical products of *Vinca minor* such as vincatone "Gedeon Richter" (Hungary), vincapane (Bulgaria), vincanore (Ukraine) find an application for hypertension, tachycardia, depression therapy and others illness.

At present time an environmentally appropriate technologies have become an irreplaceable source of pharmacologically active substances which are full-value and ecologically safe. One of the most interesting direction in the field of such investigations is a plant cells culture. A medical herbal products obtained on a basis of plant culture cells are characterized by a high ecological compatibility, independence from external climatic conditions and others value properties. But it is frequently difficult to detect an alkaloids induction conditions and final products accumulation in cells cultures. For example it is concern of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. A numerous incubation medium supplemented with different phytohormones composition were selected for *Catharanthus roseus* cell cultures which are characterized of a fast rate of growth and biomass accumulation. But in most cases the terminal products of indole alkaloid biosynthesis are neither synthesized nor accumulated adequately.

Terpenoid indole alkaloid biosynthesis starts with the decarboxylation of L-tryptophan to the tryptamine. Tryptophan decarboxylase is the enzyme that catalyzes this conversion. The following stage of biosynthesis is the condensation of triptamine and cyclic aldehyde – secologanine to form the indole alkaloid glucoside strictosidine. Strictosidine occupies a central role in the biosynthesis of the major classes of monoterpene indole alkaloids.

As long as accumulation of secondary metabolites frequently depends on biosynthesis activity of their precursors the aim of our investigation was to discover of L-tryptophan, triptamine, secologanine and vincamine contents in callus tissues which were incubated in MS medium supplemented with different combinations of growth phytohormones.

Callus culture was initiated from leaves explants. Cultures were incubated in the dark at 25-26°C in Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with sucrose, pyridoxine, thiamine, glycine and phytohormones. The content of growth regulator such as kinetin, NAA and 2,4 D was varied. The biochemical analysis was carrying out with the help of HPLC (Agilent 1100, USA).

It was shown that the callus initiation and biomass accumulation of *Vinca minor* callus culture were reduced under the decreasing of NAA content in incubation medium or replacement of NAA to 2,4 D. The alteration of auxin concentration in incubation medium hadn't an influence upon tryptophan content in callus tissue. It is quite possible that it relates to the fact that L-tryptophan is not an essential amino acid in a plants and an auxin content decreasing in incubation medium doesn't affect shikimic pathway of biosynthesis of aromatic amino acids.

It was demonstrated also that the decreasing of NAA content in incubation medium and the replacement of NAA to 2,4 D lead to the significant decreasing of tryptamine and secologanine accumulation and inhibit the indole alkaloids biosynthesis either.

But the most exciting procedure was to compare the vincamine content in callus culture with the content in native plant. As was shown earlier the vincamine content in fresh leaves was 324 µg/g. Unfortunately the vincamine content in all lines of callus culture was low than the limit of detection. But in callus cells which was cultivated in MS medium supplemented with high content of NAA was revealed a vincamine analog or its precursor. This fact could testify to more higher level of indole alkaloids biosynthesis in the callus cells.

On the assumption of results it is obvious that the vincamine level which depends on quantity of triptamine and secologanine – starts products of indole biosynthesis, is connected with a growth processes and depends on an auxin contents in incubation medium.



## АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА НОВОЙ ВКУСОФОРМИРУЮЩЕЙ ДОБАВКИ

Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Богданова Е.В., Рудниченко Е.С.

Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

В последние годы возрастающее значение уделяется поиску нетрадиционных источников физиологически ценных пищевых компонентов с целью создания новых функциональных продуктов питания. Актуальность приобретает рациональное применение различных видов сырья для получения качественных продуктов высокой пищевой и биологической ценности.

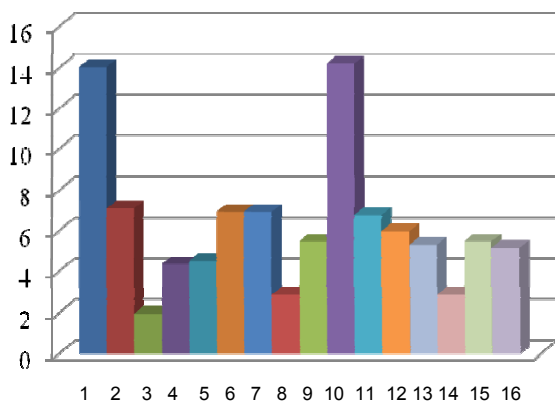
Известно, что большую ценность при создании комбинированных молочных продуктов имеет многолетнее травянистое растение якон (*Polymnia Sonchifolia* Poir & Endl.), в корневых клубнях которого содержатся фруктоза, инулин, олигофруктаны, клетчатка, жиры, белки, свободные аминокислоты, макро- и микроэлементы, важнейший для человека антиоксидант – селен – в количестве до 1,1 мкг/кг. Основные азотсодержащие компоненты – амиды и аминокислоты в свободном состоянии, а также в составе белков. Общее содержание белков от 5,9 до 6,5 % сухого вещества.

Для извлечения углеводного комплекса, аминокислот и других пищевых компонентов из корневых клубней якона нами применено экстрагирование депротеинизированной творожной сывороткой, использование которой в качестве экстрагента позволяет объединить ценные свойства творожной сыворотки, являющейся основой многих лечебно-профилактических продуктов питания, и дефицитные нутриенты, входящие в состав клубней якона.

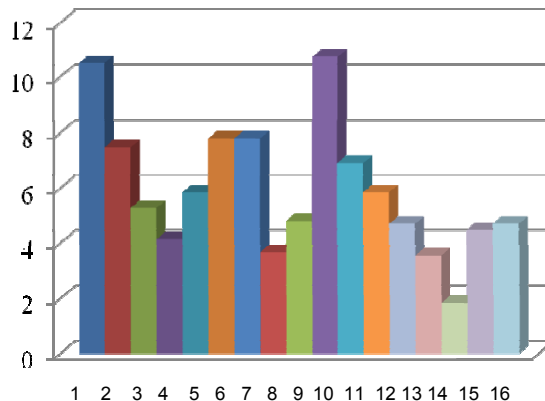
С применением метода центрального композиционного ротатабельного равномерного планирования установлены оптимальные параметры процесса экстрагирования физиологически ценных компонентов якона: температура 60 °С, продолжительность 60 мин, соотношение объемов твердой и жидкой фаз 1:6, рН экстрагента 4,4, степень измельчения клубней 2 мм. Полученный экстракт подвергали двухступенчатой очистке с применением колонки с активированным углем.

Способ получения молочно-растительного экстракта запатентован. Изучены его химический состав, физико-химические и органолептические свойства. Массовая доля сухих веществ составляет 20 %, инулина – 11 %. Аминокислотный анализ экстракта якона проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105». Установлено, что экстрагирование существенно улучшает аминокислотный состав новой модифицированной формы творожной сыворотки (рисунком).

мас. доля, %



мас. доля, %



1. Аргинин	7. Изолейцин	13. Аланин
2. Лизин	8. Метионин	14. Глицин
3. Тирозин	9. Валин	15. Цистин
4. Фенилаланин	10. Пролин	16. Глутаминовая кислота
5. Гистидин	11. Треонин	17. Аспарагиновая кислота
6. Лейцин	12. Серин	

Полученный молочно-растительный экстракт повышает иммунитет и биоэнергетические возможности организма человека, характеризуется гипогликемическими и антиоксидантными свойствами, высокой пищевой ценностью. Значительное содержание незаменимых аминокислот, а также сладкий вкус и приятный фруктовый запах позволяют применять его в производстве вкусоформирующих добавок-подсластителей для пищевых продуктов высокой биологической ценности.



### AMINO ACID ANALYSIS OF THE NEW FLAVOURFOAMING ADDITIVE'S STRUCTURE

*Korenman Ya.I., Mel'nikova E.I., Niftaliev S.I., Bogdanova E.V., Rudnichenko E.S.*

Voronezh state technological academy, Voronezh, Russia  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

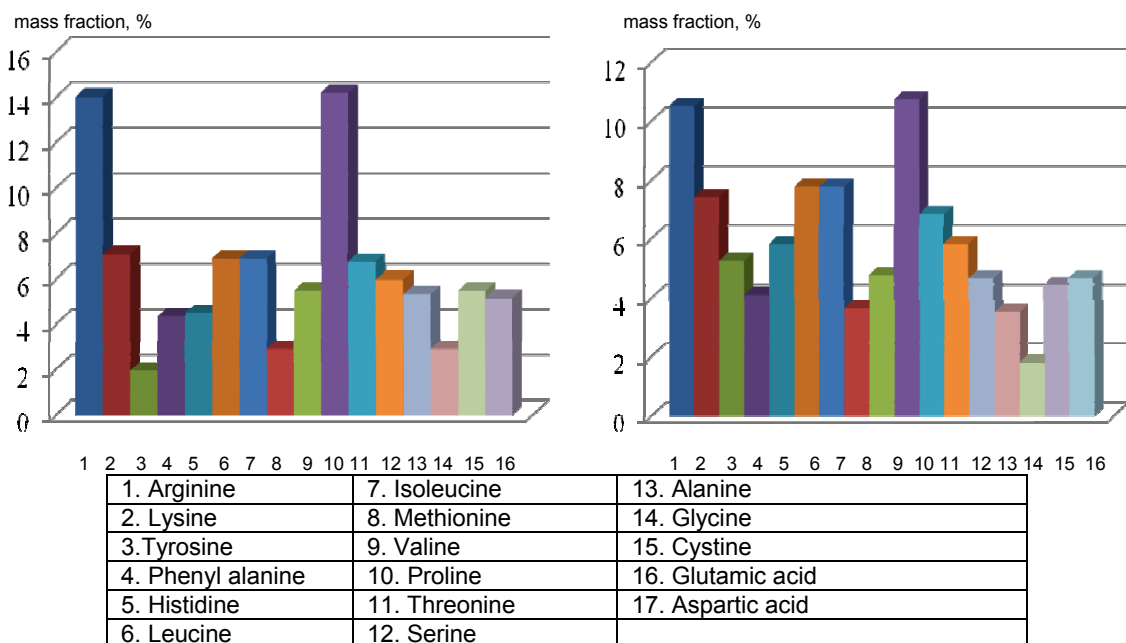
At last time increasing value is given to search of nontraditional sources of physiologically valuable food components for the purpose of creation of new functional food products. The urgency acquires rational application of various kinds of raw materials for reception of qualitative products of high food and biological value.

It is known, that important value at creation of the combined dairy products has the perennial herbaceous plant yakon (*Polymnia Sonchifolia* Poepp and Endl). It's root tubers contain fructose, inulin, cellulose, fats, proteins, free amino acids, macro- and microelements, the major for the person an antioxidant – selenium – in quantity to 1,1 mkg/kg. The basic nitrogenous components are amides and amino acids in a free condition, and also as a part of proteins. The general content of proteins varies from 5,9 to 6,5 % of a solid.

To infusion of a carbohydrate complex, amino acids and other food components from root tubers of yakon the extraction by the nonprotein curd whey is applied. It permits to unite valuable properties of the curd whey which is a basis of many prophylactic food products, and deficitic components, which are a parts of yakon's tubers.

The optimum parameters of extraction of physiologically valuable yakon's components are established with application of a central composite uniforms-planning method. This conditions are: temperature is 60 °C, duration is 60 min, correlation of volumes of solid and liquid phases is 1:6, pH of extragent is 4,4, degree of crushing of root tubers is 2 mm. The received extract was subjected to two-level clearing with application of a column with the activated coal.

The way of reception of a dairy-vegetable extract is patented. Its chemical compound, physical and chemical and sensory properties are studied. The mass fraction of solids makes 20 %, of inulin – 11 %. Amino acid analysis of the yakon's extract was carried out by the method of wicking electrophoresis with using of device "Капель-105". It is established, that extraction essentially improves amino acid structure of the new modified form of curd whey (the figure).



The received dairy-vegetable extract raises immunity and biopower possibilities of a human body, is characterised hypoglycemic and antioxidant properties, high food value. The considerable content of indispensable amino acids, sweet taste and a pleasant fruit flavour allow to apply it in manufacture flavourfoaming additives-sweetness to food products with high biological value.



## ЭКСТРАКЦИОННО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Коренман Я.И., Зыков А.В., Мокшина Н.Я.

Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

В связи с расширением производства и потребления биологически активных добавок, поливитаминных комплексов, лекарственных препаратов, содержащих витамины группы В, необходимо совершенствовать контроль их качества и подлинности.

Витамины группы В долгое время относились к неэкстрагируемым соединениям [1]. Цель исследования – разработка экстракционных систем для их извлечения из водных растворов с последующим спектрофотометрическим определением.

Витамины В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub> экстрагировали гидрофильными растворителями (спирты, кетоны, эфиры) в присутствии высаливателя (галогениды и сульфаты щелочных металлов и аммония), необходимого для образования двухфазной системы. Соль влияет на диэлектрическую проницаемость среды, ионную силу раствора, повышает количественные характеристики экстракции (коэффициент распределения D и степень извлечения R, %) [2]. Высаливающие действие электролитов по отношению к органическим соединениям объясняется уменьшением количества несвязанной воды в водном растворе [3].

Для анализа применяли метод спектрофотометрии в УФ-области, растворитель – вода. Витамин В<sub>12</sub> имеет максимумы светопоглощения при 549 и 360 нм; подлинность витамина В<sub>2</sub> в формах рибофлавина и рибофлавин-мононуклеотида подтверждается наличием трех максимумов светопоглощения при 266, 373, 445 нм и практически постоянным отношением оптических плотностей при 373 и 445 нм (0,83 – 0,86), при 266 и 445 нм (2,50 – 2,75) [4]. Количественно витамины В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub> определяли при 360 и 445 нм соответственно.

Оптимальные параметры экстракции достигаются в системах с сульфатом аммония. Для извлечения витаминов применяли экстракцию индивидуальными растворителями и смесями ацетон – изопропиловый спирт при фиксированном соотношении объемов водной и органической фаз (r). Эффективный экстрагент двух форм витамина В<sub>2</sub> – ацетон, витамина В<sub>12</sub> – изопропиловый спирт:

витамин	экстрагент (мол. доли)	r	D	R, %
В <sub>12</sub>	бутиловый спирт (1)	20:1	300	94
	ацетон (1)	20:1	500	96
	изопропиловый спирт (1)	20:1	1400	98
рибофлавин	ацетон (1)	10:1	20	80
	изопропиловый спирт (1)	10:1	17	60
	ацетон (0,4) изопропиловый спирт (0,6)	10:1	25	96
рибофлавин- мононуклеотид	ацетон (1)	5:1	1	20
	изопропиловый спирт (1)	5:1	<1	12
	ацетон (0,4) изопропиловый спирт (0,6)	5:1	2	25

Значительные различия в коэффициентах распределения рибофлавина и рибофлавин-мононуклеотида в одних и тех же экстракционных системах обусловлены их различной растворимостью в воде. Рибофлавин-мононуклеотид содержит полярную эфирную группировку фосфорной кислоты, которая обуславливает сильнополярный характер витамина и его большую растворимость в воде.

Показана принципиальная возможность экстракционного извлечения витамина В<sub>12</sub> и двух форм витамина В<sub>2</sub> из водных растворов с целью последующего спектрофотометрического определения. Оптимизированы условия извлечения витаминов. Разработанный способ позволяет определять витамины В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub> в водных растворах при концентрациях на уровне 1–30 мкг/см<sup>3</sup>, характеризуется экспрессностью (продолжительность анализа в пределах 10 мин), надежностью и воспроизводимостью получаемых данных. Относительно невысокая степень извлечения рибофлавин-мононуклеотида (20–25%) повышается при проведении повторной экстракции в идентичных условиях.

### Литература:

1. Коренман Я.И. Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та. 1992. 336 с.
2. Мокшина Н. Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад. 2007. 246 с.
3. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия. Пятигорск, 1996. Т. 2. 608 с.
4. Основы жидкостной экстракции / Под ред. Г.А. Ягодина. М.: Химия. 1981. 400 с.



**DETERMINATION OF VITAMINS GROUP B IN WATER SOLUTIONS  
BY EXTRACTION-SPECTROPHOTOMETRIC**

*Korenman Ya.I., Zykov A.V., Mokshina N.Ya.*

Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia  
e-mail: korenman@vgta.vm.ru

Increase in production and consumption of biological active additions, polyvitamines, medicines, containing vitamins group B makes necessary to control its quality and authenticity.

Vitamins B were considered as non-extracted substances [1]. The research objective is development of systems for vitamins B extraction from water and its spectrophotometric determination.

Vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>12</sub> are extracted by hydrophilic solvents (spirits, ketones, ethers) with salt-out (halogenides and sulphates of alkaline metals and ammonium) which necessary for formation of diphasic system. Salt influences dielectric constant, ionic strength, increase quantitative extraction characteristics (distribution number D and degree of extraction R, %) [2]. Salting-out action of electrolits to organic compounds is explained by decreasing of quality of untied water in a water solution [3].

Spectrophotometric methods are used for analyses at UV-zone, solvent - water. Vitamin B<sub>12</sub> has light absorption maximum at 549 and 360 nm; authenticity of vitamin B<sub>2</sub> in forms heptoflavin and heptoflavin-mononucleotide is confirmed presence of three light absorption maximum at 266, 373, 445 nm and practically constant relation of optical density at 373 and 445 nm (0,83 - 0,86), at 266 and 445 nm (2,50 - 2,75) [4]. Quantity vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>12</sub> content were determined at 360 and 445 nm.

Optimum extraction parameters are reached in systems with ammonium sulphate. Individual dissolvents and compounds of acetone – isopropyl alcohol were using to extract vitamins. The effective extragent for two forms of vitamin B<sub>2</sub> - acetone, vitamin B<sub>12</sub> - isopropyl alcohol:

vitamin	extragent (molar fraction)	r	D	R, %
B <sub>12</sub>	butyl alcohol (1)	20:1	300	94
	acetone (1)	20:1	500	96
	isopropyl alcohol (1)	20:1	1400	98
heptoflavin	acetone (1)	10:1	20	80
	isopropyl alcohol (1)	10:1	17	60
	acetone (0,4) isopropyl alcohol (0,6)	10:1	25	96
heptoflavin- mononucleotide	acetone (1)	5:1	1	20
	isopropyl alcohol (1)	5:1	1	12
	acetone (0,4) isopropyl alcohol (0,6)	5:1	2	25

The considerable difference in rations of heptoflavin and heptoflavin- mononucleotide in same extraction systems are caused by their various solubility in water. Heptoflavin- mononucleotide contains polar etherous grouping of phosphoric acid which causes strong-polar character of vitamin and larger solubility in water.

The basic possibility of extraction vitamin B<sub>12</sub> and two forms of vitamin B<sub>2</sub> from water solutions for the purpose of spectrophotometric determination is shown. The conditions of vitamins extraction are optimised. The developed method allows to determine vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>12</sub> in water solutions at level of 1-30 mkg/cm<sup>3</sup>, is characterised as expression method (duration of the analysis is about 10 mines), reliability and reproducibility of received data. Rather low degree of extraction of heptoflavin- mononucleotide (20-25 %) raises at carrying out repeated extraction in identical conditions.

**References:**

1. Ya. I. Korenman Factors of distribution of organic . The directory. Voronezh: Publishing house Voronezh, State. Univ. 1992. 336 P.
2. N. Ya. Mokshina N.J. Extraction of amino acids and vitamins. Voronezh: 2007. 246 P.
3. V.G. Belikov. Pharmaceutical chemistry. Pyatigorsk, 1996. V. 2. 608 P..
4. Liquid extraction / Under the editorship of G.A. Jagodin. M: Chemistry. 1981. 400 P..





## ЭКСТРАКЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ В ДВУХФАЗНЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИМЕРОВ

Коренман Я.И., Мокшина Н.Я., Пахомова О.А., Зыков А.В.

Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

Известно, что водорастворимые полимеры поли-N-виниламидного ряда широко применяются для экстракции биологически активных веществ, в частности, имеются сведения о распределении гуминовых кислот в двухфазных системах на основе полимеров [1-3].

Ароматические аминокислоты длительное время относились к трудно экстрагируемым соединениям, их степень извлечения из водных сред органическими растворителями (спирты, сложные эфиры, кетоны) в пределах 15-20 % [4,5]. Цель исследования – повышение степени извлечения тирозина, фенилаланина и триптофана из водных сред с применением водорастворимых кислородсодержащих полимеров и разработка способа экспрессного определения аминокислот в водной и органической фазах.

Изучено межфазное распределение ароматических  $\alpha$ -аминокислот в системах с поли-N-винилпирролидоном, поли-N-винилкапролактамом и поли-N-винил-N-метилацетамидом. Для полноты выделения полимера в самостоятельную фазу применяли высаливатели. Рассчитаны коэффициенты распределения (D) и степень извлечения аминокислот ( $R_1$ , %) в системах полимер – водно-солевой раствор. Максимальные количественные характеристики достигаются в системах с поли-N-винилпирролидоном при pH, близком к изоэлектрической точке. При этом степень двукратного извлечения тирозина, фенилаланина и триптофана ( $R_2$ , %) составляет 91, 97 и 90 % соответственно (таблица).

Таблица. Коэффициенты распределения и степень извлечения аминокислот поли-N-винилпирролидоном; высаливатель  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $C_{\text{соли}} = 5,7$  моль/дм<sup>3</sup>

аминокислота	pH	D	$R_1$ , %	$R_2$ , %
тирозин	2,00	1,78	54,8	87,1
	5,63	2,31	60,0	91,2
	9,01	0,26	17,2	37,2
триптофан	2,00	1,26	44,2	80,4
	5,88	2,23	59,2	90,4
	9,00	0,37	20,0	47,3
фенилаланин	2,00	2,01	55,6	89,0
	5,91	5,46	78,8	97,7
	9,02	3,58	73,2	95,3

Методами УФ- и ИК-спектроскопии изучен состав и строение комплексов аминокислот и полимеров. По максимумам светопоглощения можно заключить, что при взаимодействии полимеров с аминокислотами образуются комплексы, оптические свойства которых отличаются от свойств исходных компонентов. Для определения аминокислот в водных растворах и фазе экстрагента изучены спектральные характеристики полимеров.

### Литература:

1. Альбертсон П.-О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. – М.: Мир, 1974. – 260 с.
2. Кирш Ю.Э. Поливинилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. – М.: Наука, 1998. – 252 с.
3. Нифантьева Т.И., Шкинев В.М., Заварзина А.Г., Демин В.В. Экстракция гуминовых кислот в двухфазных водных полимерных системах // Журн. аналит. химии. 2000. Т.55, № 10. С. 1030 – 1032.
4. Коренман Я.И. Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. – Воронеж: Изд-во Воронеж.гос.ун-та, 1992. – 336 с.
5. Мокшина Н.Я., Селеменов В.Ф., Матвеева М.В., Крестникова Ю.В.. Экстракция тирозина и фенил-аланина гидрофильными растворителями // Журн. аналит. химии. 1994. Т.49, № 11. С.1193 – 1196.



**EXTRACTION AND DETERMINATION AROMATIC  $\alpha$ -AMINO ACIDS IN DIPHASIC SYSTEMS ON WATER-SOLUBLE POLYMERS BASIS**

*Korenman Ya. I., Mokshina N. Ya., Pahomova O. A., Zykov A.V.*

Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia  
e-mail: korenman@vgta.vm.ru

It is known, that water-soluble polymers of poly-N- vinylamine are used for extraction of biologically active substances, in particular, there are data on distribution huminic acids in diphasic systems on basis of polymers [1-3].

It has considered that aromatic amino acids are concerned difficult extractive compounds, it's degree of extraction from by organic solvents (spirits, ester, ketones) was about 15-20 % [4,5]. The research objective is an increasing of extraction degree of tyrosine, phenylalanine and tryptophan from water with application water-soluble oxychemical polymers and development of determination express method of amino acids in water and organic phases.

The interfacial distribution of aromatic  $\alpha$ -amino acids in systems poly-N-vinylpyrrolidone, poly-N-vinylcaprolaktam and poly-N-vinyl-N-methylacetamide is studied. Desalting systems are used for complete allocation of polymer in an independent phase. Distribution factors (D) and degree of extraction of amino acids ( $R_1$ , %) in systems polymer - a water-salt solution were calculated. The maximum quantitative characteristics are reached in systems with poly-N-vinylpyrrolidone at pH which near isoelectric point. Thus degree of two-multiple extraction tyrosine, phenylalanine and tryptophan ( $R_2$ , %) (table) are 91, 97 and 90 %.

Table. Factors of distribution and degree of extraction of amino acids by poly-N-vinylpyrrolidone; desalting -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $c=5,7 \text{ mol/dm}^3$

Amino acid	pH	D	$R_1$ , %	$R_2$ , %
tyrosine	2,00	1,78	54,8	87,1
	5,63	2,31	60,0	91,2
	9,01	0,26	17,2	37,2
tryptophan	2,00	1,26	44,2	80,4
	5,88	2,23	59,2	90,4
	9,00	0,37	20,0	47,3
phenylalanine	2,00	2,01	55,6	89,0
	5,91	5,46	78,8	97,7
	9,02	3,58	73,2	95,3

The composition and structure of complexes of amino acids and polymers was studied by UV IR-spectroscopy methods. Knowing the maximum of light-absorption it is possible to conclude, that at interaction of polymers with amino acids complexes form which optical properties differs from properties of initial components. The spectral characteristics of polymers were studied for determination of amino acids in water solutions and extragent phase.

**References:**

1. P. O. Al'bertson Division of cellular particles and macromolecules. - M: the World, 1974. - 260.
2. Yu.E. Kirsh Polyvinylpyrrolidone and others poly-N-vinylamids. - M: the Science, 1998. - 252.
3. T. I. Nifant'eva, Shkinev V. M, Zavarcina A.G., Dyomin V.V. Extraction of huminic acids in diphasic water polymeric systems//Analytic. Chemistry. 2000.,55, № 10. pp. 1030 1032.
4. Ya. I. Korenman Factors of distribution of organic components. The directory. - Voronezh, 1992. 336.
5. Mokshina N.J., Selemenev V. F, Matveeva M. V, Krestnikova Yu. V. Extraction of tyrosine and phenylalanine by hydrophilic solvents//Anal. Chemistry. 1994. - 49, № 11.pp. 1193 - 1196.



## АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНО-РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ЯКОНА

Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Рудниченко Е.С., Богданова Е.В.

Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

В производстве функциональных продуктов питания возрастающее значение придается подсластителям натурального происхождения, в частности якону. Корнеплоды якона содержат природные флавоноиды, (катехины – кверцетин, рутин, дигидрокверцетин), а также витамины и другие соединения, способные связывать свободные радикалы.

Экстрагирование – эффективный способ извлечения антиоксидантов из корнеплодов якона. В качестве экстрагента нами впервые применен ультрафильтрат творожной сыворотки [1]. Цель работы – определение антиоксидантной активности молочно-растительного экстракта якона амперометрическим методом.

Для получения экстракта клубни якона измельчали, сушили до содержания сухих веществ на уровне 6–7 мас. % и добавляли экстрагент – ультрафильтрат творожной сыворотки (продукт фракционного разделения сыворотки, полученный нами на ультрафильтрационной установке). Методами математического планирования эксперимента установлены оптимальные условия экстрагирования: степень измельчения клубней якона 2 мм, соотношение объемов твердой и жидкой фаз 1 : 6; кислотность экстрагента (рН ~ 4,4) контролировали потенциометрически. Экстрагировали на вибросмесителе при 60 °С, в течение 60-минутного контакта фаз содержание сухих веществ в экстракте достигает максимума. Затем проводили двухступенчатую очистку экстракта путем пропускания через колонку, заполненную активированным углем [2].

Антиоксидантную активность экстракта определяли амперометрически на жидкостном хроматографе «ЦветЯуза-01-АА». Выбор метода анализа экстракта обусловлен возможностью высокоселективного амперометрического определения всех антиоксидантов в пробе, другие известные метод – не прямые и менее избирательные.

Условия измерений: температура (25±10) °С, напряжение переменного тока 220 В, частота тока (50 ± 1) Гц. Окисление антиоксидантов происходит на поверхности стеклоуглеродного электрода, потенциал которого при этом возрастает, полученный сигнал сопоставляли со стандартом (дигидрокверцетин), измеренным в тех же условиях. Высокая чувствительность определения, низкий остаточный ток и хорошая воспроизводимость аналитического сигнала достигаются при применении стеклоуглеродного электрода. Скорость потока элюента 1,2 см<sup>3</sup>/мин.

На хроматограмме молочно-растительного экстракта якона t – продолжительность анализа (время выхода) экстракта якона, с; I – величина аналитического сигнала (высота пика), нА.

I, нА 2 3 4 5 Показания анализатора «ЦветЯуза-01-АА» при анализе экстракта якона



По результатам измерений вычисляли среднее арифметическое площади пиков. Из полученных значений высот пиков следует, что относительная погрешность измерений не превышает 5 %.

Молочно-растительный экстракт якона характеризуется высокой антиоксидантной активностью (122 мг/дм<sup>3</sup>), сопоставимой с бальзамами и может быть применен в фармацевтической промышленности, а также для создания новых пищевых продуктов с повышенной антиоксидантной активностью.

### Литература:

- Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Рудниченко Е.С., Корнеева М.М., Коренман Я.И. Экстрагирование углеводов натурального подсластителя якона ультрафильтратом творожной сыворотки // II Всерос. конф. « Аналитика России». – Краснодар, 2007. – С. 452.
- Рудниченко Е.С., Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И. Аминокислотный и углеводный состав молочно-растительного экстракта якона // Химия растительного сырья, 2008. – № 4. – С. 79 – 82.



**AMPEROMETRIC DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY  
IN MILK-VEGETABLE YAKON'S EXTRACT**

*Korenman Ya.I., Mel'nikova E.I., Rudnichenko E.S., Bogdanova E.V.*

Voronezh State Technological Academy, Voronezh Russia  
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru

Increasing meaning in manufacture food products attached to the natural sweetness, in particular, yakon. The yakon's root vegetable contain such antioxidants as natural flavonoids (katechins – meletin. rutin, dihydromeletin), vitamins and other compounds, which are able to connect with free radicals.

The extraction is effective method of antioxidants extraction from yakon's root vegetable. The ultrafiltrate of curd whey was used by us as extragent [1].

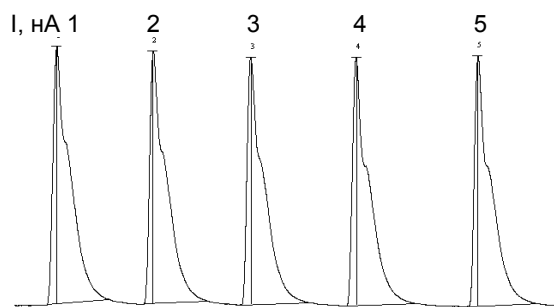
The purpose of the work is determination of antioxidant activity in milk-vegetable yakon's extract de using of amperometric method.

For receiving of extract the yakon's root vegetable cut were crushed very small, dried until the content of dried compounds forms 6 – 7 mass. %. Then was added ultrafiltrate of curd whey as the extragent. It is the product of factional separation of curd whey, which was received with using of ultrafiltration sitting. The optimal conditions of the extraction was determined by methods of mathematical experimental planning. It are degree of yakon's root vegetable cutting is 2 mm; correlation of solid and fluid phases volumes is 1 : 6; acidity of the extragent (pH = 4,4) was controlled by potentiometric method. The extraction was carried out on the vibromixer at 60 °C. The content of dried compounds in the extract run up to maximum after 60 min of phases contact. Then multigraded clearance was carried out by passing through the column with activated coal [2].

Antioxidant activity of the extract was determined by amperometric method with using of fluid chromatograph. Selection of this method is conditioned by possibility of high – power amperometric determination of all antioxidants in the sample. The other known methods are indirect and less selective.

The conditions of measuring: temperature was (25 ± 10) °C, tension of alternating current was 220 V, frequency of current was (50 ± 1) Gc. Oxidation of antioxidant realizes on the surface of glasphalt electrode. It's potential increases and this value was compared with standard (dihydromeletin), which has been measured at identical conditions. High sensitivity of determination, slight permanent current and and reproducibility of analytical signal is achieved by using of glasphalt electrode as an electrode of comparison. The speed of eluent movement is 1,2 sm<sup>3</sup>/min.

Amperometric oxidation of milk – vegetable extract is shown in the chromatogram: τ – duration of the analyse (time of outlet) of milk – vegetable yakon's extracts; I – analytical signal.



Chromatogram of yakon's extract

Results of chromatography of yakon's extract

No of peak	time of outlet, s	Half-width of peak, s	analytical signal, nA	Area of peak, S, nA·s
1	23,61	10,74	589,82	6333,55
2	77,31	10,46	578,47	6049,58
3	132,08	10,54	567,10	5974,53
4	191,04	10,35	568,40	5882,67
5	258,89	10,32	573,76	5921,23
S <sub>cp</sub> =				6032,31

Average arithmetic value of peak's area was calculated in results of measuring. As it can be ascertained from receiving values of peak's altitude, relative error of measuring is less 5 %.

It have been determined that milk – vegetable yakon's extract is characterized by high antioxidant activity (122 mg/l), which can be compared with balsams. It can be applied for producing of new food products with heightened antioxidant activity and in pharmaceutical industry too.

**References:**

- Mel'nikova E.I., Niftaliev S.I., Rudnichenko E.S., Korneeva M.M., Korenman Ya.I. Extraction of carbohydrates of natural sweetness yakon by ultrafiltrates of curd whey // II Russuan conf. "Analytic of Russia". – Krasnodar, 2007. – P. 452.
- Rudnichenko E.S., Korenman Ya.I., Mel'nikova E.I., Niftaliev S.I. Amino-acid and carbohydrate composition of milk – vegetable yakon's extract // Chemistry of plant raw material, 2008. – № 4. – P.79 – 82.



## КУЛЬТУРНЫЕ РАСТЕНИЯ КАК ИСТОЧНИКИ N-АЦИЛФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНОВ

Котельникова И.М.

Институт геологии и природопользования ДВО РАН, Благовещенск, Россия  
e-mail: kot@ascnet.ru

С открытия в 1992 году эндогенного лиганда каннабиноидных рецепторов - N-арахидоноилэтанолamina (анандамида) начинается изучение новых биорегуляторов – эндоканнабиноидов. Это соединения липидной природы, представляют собой N-ацилированные этаноламины (NAE) [1]. В настоящее время у животных обнаружен целый ряд NAE: 16:0, 18:0, 18:1. Поскольку эндоканнабиноиды вовлечены во множество физиологических и патологических процессов [2], особенное внимание и интерес вызывает применения потенциальных терапевтических препаратов, регулирующих содержание биоактивных NAE. У животных и человека уровень анандамида в мозге и периферических тканях низок, поэтому могут быть полезны лекарства, предотвращающие его гидролиз или усиливающие биосинтез. К таким соединениям относятся другие молекулярные виды NAE [3]. NAE образуются из N-ацилфосфатидилэтаноламинов (NAPE) специфичной фосфолипазой D. У животных активность этого фермента обнаружена в микросомальной фракции многих тканей и клеток.

Возможными источниками NAE и NAPE могут быть семена растений и продукты питания, получаемые из них [3]. У растений содержание NAE составляет до 44,6 мкг/г сырого веса. Содержание NAPE существенно выше и может достигать 100 мкг/г сырого веса и более. Эти факты делают актуальным поиск NAPE – предшественника биоактивного NAE - в семенах растений, используемых в питании.

Целью исследования являлось изучение распространения NAPE в семенах культурных растений, и пищевых продуктах, получаемых из семян.

Поиск NAPE проводили в липидных экстрактах, приготовленных из зрелых семян культурных растений 9 видов и в продуктах питания (крупы, мука). Качественный анализ NAPE в растительном материале проводили методом ВЭТСХ. Для обнаружения NAPE использовали малахитовый зеленый [4]. Для достоверного подтверждения наличия NAPE применяли гидролиз NAPE и обнаружение нингидрином свободной NH<sub>2</sub>-группы у образующегося продукта - NAE. NAPE идентифицировали сравнением его хроматографического поведения с образцом из пшеничной муки [4,5]. Для сравнения использовали препарат ФМ, полученный из фосфатидилхолина фосфолипазой D капусты. Количественное определение NAPE производилось по содержащемуся в нем фосфору [5].

Качественно удалось идентифицировать NAPE в липидах фасоли, сои, пшенице, амаранте, овсе, ячмене, ржи. Результаты количественного содержания NAPE в семенах и продуктах представлены в таблице.

Таблица. Содержание NAPE в семенах культурных растений и продуктах их переработки

Образец	<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Glycine max</i>		<i>Triticum aestivum</i> Амурская 1495	Овес	Ячмень	Мука 1 сорт	Мука высший сорт	Отруби пшеничные	Мука ржаная
	Щедрая	Местная	ВНИИС-1	Смена							
Содержание NAPE на сухой вес семян, мкг/г	345,5	63,5	58,5	153,0	206,5	205,5	248,0	210,0	252,5	149,0	190,0

В исследуемых экстрактах достаточно высокое содержание NAPE было обнаружено в липидах семян (фасоль, злаковые культуры) и в продуктах их переработки. Содержание NAPE в семенах значительно варьировало в зависимости от сорта растений. Фасоль и зерновые могут быть использованы для получения препарата NAPE в количестве 0,2 - 0,35 г из 1 кг сырья.

### Литература:

- Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // Science. 1992. V. 258. P. 1946 – 1949.
- Berdyshev R.V., Boichot E., Lagente V. Anandamide - a new look on fatty acid ethanolamides // J. Lipid Mediators Cell Signalling. 1996. V. 15. P. 49 – 67.
- Chapman K.D., Venables B.J., Dian E.E., Gross G.W. Identification and quantification of neuroactive N-acylethanolamines in cottonseed processing fractions // JAOCS. 2003. V. 80. № 3. P. 223 – 229.
- Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. - 1975. - V. 115. - P. 246-249.
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.A. Universal Reagent for Phospholipid Analysis// J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129-141.



## CULTIVATED PLANTS AS SOURCES OF N- ACYLPHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

*Kotelnikova I.M.*

Institute of Geology and Nature Management FEB RAS, Blagoveshchensk, Russia  
e-mail: kot@ascnet.ru

Studying of endocannabinoids - new biologically active compounds – was started in 1992 when N-arachidonylethanolamine (anandamide) was identified as first endogenous ligand of cannabinoid receptors [1]. Since that time various molecular types of N- acylethanolamines (NAE) had been found out: NAE 16:0, 18:0, 18:1. Endocannabinoids are involved in variety spectrum of physiologically and pathologically process. Therefore especial emphasis and interest causes drugs that regulate NAE level. Because NAE content is low in mammalian tissues, drugs which preventive hydrolysis anandamide and act as inhibitors of endogenous anandamide degradation or stimulators of biosynthesis may therapeutical adopted. Other molecular types NAE may use in such way. NAE produced from N- acylphosphatidylethanolamine (NAPE) by phospholipase D. In mammalian tissues phospholipase D activity was detected in varieties tissues and cells.

Seeds of cultivated plants and cereal products may use as potential natural sources of NAE and NAPE [3]. NAE content amounts till 44,6 µg on g of fresh weight in plant seeds. NAPE content much higher and amounts more than 100 µg on g of fresh weight. The fact gives current interest in NAPE research as precursor for bioactive NAE in plant seeds.

We study NAPE content in cultivated plant seeds and cereal products. NAPE was detected in lipids from mature plant seeds of 9 species of several cultivars and cereal products (flour, grain). HPTLC was used for NAPE analyses. Phospholipid identifications based upon cochromatography with standards (an extract from wheat flour and a phosphatidylmethanol) and by spray reagent (malachite green) [4]. NAPE was hydrolyzed and NAE was detected by ninhydrin. The NAPE quantity was determined spectrophotometrically by measuring phosphorus [5].

We revealed NAPE in kidney bean *Phaseolus vulgaris*, soya *Glycine max*, buckwheat *Phagopyrum esculentum*, barley *Hordeum sp.*, rye *Secale cereale*, amaranth *Amaranthus tricolor*, corn *Zea mays*, rice *Oryza sativa*, oat *Avena sativa*. Quantity NAPE content in seeds and cereal products are shown in table.

Table. NAPE content in seeds of cultural plants and cereal products

Plant species cultivar s, cereal product	<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Glycine max</i>		<i>Triticum aestivum</i> Amurskay 1495	Oat	Barley	First grade flour	Top grade flour	Bran	Rye flour
	Tshedray	Mestmay	VNIIS-1	Smena							
NAPE content, mg/g of dry weight	345,5	63,5	58,5	153,0	206,5	205,5	248,0	210,0	252,5	149,0	190,0

NAPE content vary within species. Highest NAPE content was revealed in lipids of kidney bean, cereals and wheat flour. This plant materials may use as sources for recovery of 0.2-0.35 g NAPE on 1 kg dry weight.

### References:

1. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // Science. 1992. V. 258. P. 1946 – 1949.
2. Berdyshev R.V., Boichot E., Lagente V. Anandamide - a new look on fatty acid ethanolamides // J. Lipid Mediators Cell Signalling. 1996. V. 15. P. 49 – 67.
3. Chapman K.D., Venables B.J., Dian E.E., Gross G.W. Identification and quantification of neuroactive N-acylethanolamines in cottonseed processing fractions // JAOCS. 2003. V. 80. № 3. P. 223 – 229.
4. Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. - 1975. - V. 115. - P. 246-249.
5. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.A. Universal Reagent for Phospholipid Analysis// J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129-141



## СУЧАСНІ ТЕХНОЛОГІЇ ПОШУКУ РОСЛИННИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ОСНОВІ МЕТОДІВ БАГАТОВИМІРНОГО ТАКСОНОМІЧНОГО АНАЛІЗУ

Ковальова А. М.

Національний фармацевтичний університет, Україна, Харків  
allapharm@yahoo.com

**Метою** роботи стало створення нових технологій пошуку рослинних джерел біологічно активних речовин (БАР) серед офіційних і неофіційних рослин флори України та суміжних держав на основі методів багатовимірної таксономії.

В дослідженні застосовувались різні допоміжні методи – морфологічні: визначення вегетативних і генеративних ознак видів рослин; хімічні: виділення та ідентифікація речовин, кількісне визначення БАР: фізико-хімічні: двовимірна хроматографія, спектрофотометрія в ІЧ- та УФ-областях; програмне забезпечення Microsoft Excel: процедура присвоєння імені діапазоном і функція обробки масивів, кореляційний аналіз; метод генерації випадкових чисел та граф-аналіз.

Дослідження складались з основних етапів: 1. Порівняльне вивчення морфолого-анатомічних ознак та екологічних умов зростання видів; 2. Хімічне вивчення речовин-маркерів на основі хроматографічного, хімічного та спектрального аналізу; 4. Виявлення корелятивних зв'язків між хімічними, морфологічними та екологічними ознаками, на основі знайденого алгоритму, визначення перспективних джерел БАР; 5. Створення системи континууму з урахуванням усіх параметрів – морфологічних, хімічних, і в подальшому, морфолого-хемо-екологічних (фенетичних).

У результаті досліджено об'ємні за кількістю видів деякі роди, які зростають на території України і суміжних держав. Визначені хімічні профілі родів *Astragalus* L., *Crataegus* L., *Equisetum* L.

Знайдена інформаційна вага ознак, розрахована хімічна і морфологічна своєрідність таксонів, виявлена кореляція між хімічними та морфолого-екологічними ознаками.

Створені дендрограми з використанням основних принципів теорії графів, на основі яких було встановлено алгоритми пошуку видів, що містять певні БАР та є перспективними для практичної медицини або представляють інтерес для подальшого наукового вивчення.

Для побудови системи взаємовідносин численних родів такого, як *Astragalus* L. (2000 видів), нами досліджено 81 вид (виключено ендеми): враховувалось більше 32 000 ознак – флавоноїди і циклоартани.

У роді *Crataegus* L. (3000 видів) досліджено 38 видів флори України (інтродуковані та дикоростучі), проаналізовано більше 12000 ознак – флавоноїди, гідроксикоричні кислоти.

Для встановлення корелятивних зв'язків між екотопом і хімічною ознакою (сполукою) застосовували елімінуючий вибір: нами відсіювалась множина ознак і вибирались ті, які повторювались частіше ніж у 50% випадках. Наприклад, для видів астрагалів, які синтезують робінін, характерні ознаки вторинної ефемероїдності, аридні умови існування, одночасно ці рослини накопичують кемпферол та астрагалін.

Доведено, що еволюціонують хемотаксони *Astragalus*, котрі синтезують оригінальні флавоноїди, що є факторами адаптації рослин до плинних екологічних умов зростання тобто відрізняються високою своєрідністю (коефіцієнт своєрідності більше 100%). На основі оригінальності хімічного складу флавоноїдів найбільше перспективними для поглибленого вивчення виявились види *A.penduliflorus* (276%), *A.floccosifolius* (170,5%), *A.melilotoides* (157,5%), *A.cicer* (126,5%), *A.karakucshensis* (111,5%), *A.lagurus* (112%), *A.adsurgens* (125%), *A.frigidus* (129%), *A.glycyphyllus* (116,5%).

Вперше проведене систематичне вивчення фенольних сполук роду *Crataegus* і *Equisetum* флори України, встановлено хімічні профілі родів. Хімічними індикаторами для роду *Equisetum* є флавоноїди, які мають коефіцієнт оригінальності нижче 50% – це кемпферол, кверцетин, астрагалін, нікотифлорин, кемпферол-3-глюкозидо-7-глюкозид, кемпферол-3-диглюкозидо-7-глюкозид, кемпферол-3-рутинозидо-7-глюкозид.

Рід *Crataegus* характеризується наявністю проціанідинів, флавонолів, С-флавонів, гідроксикоричних кислот, тритерпеноїдів. Виявлено корелятивні зв'язки між морфологічними і хімічними ознаками, які використані нами для цілеспрямованого пошуку цінних фармакологічних сполук серед глодів: гіперозиду, вітексину, ацетилвітексину та хлорогенової кислоти.

Визначено, що перспективними видами є *C.arnoldiana* Sarg., *C.macracantha* Lodd., *C.submollis* Sarg., *C.mollis* Sarg., *C.canadensis* Sarg. Обґрунтовано їх використання як джерел БАР з гіпотензивною та антиаритмічною активністю. Розроблено комплексні препарати, що вміщують екстракти глодів, та проекти АНД на сировину цих видів та препарати.

**Висновки.** Використовуючи знайдені для систем рослин алгоритми пошуку БАР на основі таксономічних зв'язків між таксонами, розроблено методи пошуку цінних фармакологічних сполук. Застосування багатовимірної (багатофакторного) аналізу хімічних і морфологічних ознак видів на основі сучасних інформаційних технологій дозволяє об'єктивно вносити зміни до філогенетичних систем родів і родин та створює можливість цілеспрямованого пошуку БАР серед рослинних джерел.



**CONTEMPORARY TECHNOLOGIES TO THE SEARCH FOR PLANT BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES  
ON THE BASIS OF THE METHODS OF THE MULTIDIMENSIONAL  
TAXONOMIC ANALYSIS**

*Kovalyova Alla M.*

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine  
e-mail: allapharm@yahoo.com

**The aim** of work was to create new approaches for goal-directed search for plant sources of biologically active substances (BAS) among the official and unofficial plants of flora of Ukraine and neighboring countries on the basis of methods of multidimensional taxonomy.

Different methods were used in research – morphological: study of vegetative and genic factor characteristics of types of plants; chemical: identification of substances, determination of the quantitative content (BAS); physic-chemical: two-dimensional chromatography; spectrophotometry in the IR- and the UV-range; Microsoft Excel software: the procedure of name assignment to ranges and the function of array processing, a correlation analysis; a random numbers generation method, analysis of graphs .

The research included the following main stages: 1. Comparative study of morphological, morphological-anatomical signs and ecological conditions. 2. Chemical study of substance-markers (chemosigns) on the basis of methods of two-dimensional chromatography, chemical methods of qualitative and quantitative analysis, transformations of connections and spectral analysis. 3. Construction of graphs, dendrograms of studied continua and creation of the evolutionary system of genera. 4. Development of correlative connections between chemical, morphological and ecological signs and, on the basis of the established algorithm, the development of perspective plants as sources of BAS. 5. Creation of the system of continuum taking into account all parameters of plants - morphological and chemical and in future - morphological-chemo-ecological

As a result a volumetric in a quantity of forms generas that grow in the territory of the Ukraine and neighboring countries were investigated. Chemical profiles of the *Astragalus* L., *Equisetum* L., *Crataegus* L. genera were developed; the information weight of properties and taxon individual characteristics are determined, correlation between the chemical and morphological characteristics is identified. The dendrograms were developed on the basis of the graphs theory, which enabled to set species, that contain certain (searched) BAS, and that are prospective in practical medicine as well as from the point of view of scientific theory.

For the construction of interrelation system of numerous genera such, as *Astragalus* L. (2000 kinds), we have investigated 81 forms: over 32 000 signs – flavonoids and cycloartane were taken into account; for the *Crataegus* L. genera (3000 kinds), 38 kinds were investigated, over 12000 signs were analyzed – flavonoids, hydroxycinnamic acids

For establishing correlative connections between an ecotope and flavonoid of robinin eliminating selection was applied: we sifted great number of signs and selected those which repeat more frequent than 50%. So, for instance, kinds which synthesize robinin and have signs of secondary ephemerooids and arid existence conditions these plants simultaneously synthesize kaempferol and astragalin.

It is shown that chemotaxons of *Astragalus*, which synthesize new original flavonoids, that are agents of the adaptation of plants evolve. They also have high uniqueness (coefficient is more than 100%). On the basis of the originality of the flavonoids composition of astragals the most promising for the intensified study proved to be the kinds of *A.penduliflorus* (276%), *A.floccosifolius* (170,5%), *A.melilotoides* (157,5%), *A.cicer* (126,5%), *A.karakucshensis* (111,5%), *A.lagurus* (112%), *A.adsurgens* (125%), *A.frigidus* (129%), *A.glycyphyllus* (116,5%).

The systematic comparative study of phenol connections of genera *Crataegus* (flora of Ukraine) et of genera *Equisetum* is first time conducted. The chemical profile of the genera was defined. Forms *Equisetum* contain kaempferol, quercetin, astragalin, nikotiflorin, kaempferol-3-glucoside-7-glucoside, kaempferol-3-glucoside -7-glucoside, kaempferol-3-rutinozid-7-glucoside.

It is characterized by the presence of hyperoside, chlorogenic and neochlorogenic acids, vitexine, acetylvitexine. Correlative connections between morphological and chemical signs are exposed, that is used for goal-directed search for valuable pharmacological connections among hawthorns.

It is determined, that genera *C.arnoldiana* Sarg., *C.macracantha* Lodd., *C.submollis* Sarg., *C.mollis* Sarg., *C.canadensis* Sarg are perspective generas for continuous research. It is grounded, that they can be utilized as sources of bioactive connections. The projects of AND (GMP) are created for these kinds. Complex medicines, including the extracts of fruits that possess a hypotension action, are got.

**Conclusions.** Using the developed algorithm for searching BAC in this systems, we created the method of the definition of such valuable pharmacological substances in the genera *Astragalus*; *Crataegus*, *Equisetum*.

The application of multidimensional (multifactor) analysis of the chemical and morphological signs of kinds on the basis of contemporary information technologies makes it possible to objectively introduce changes in the phylogenetic systems of genera and families; it creates the possibility of the goal-directed search for pharmacologically active substances from the plant sources.





## ЛИПОФИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *GALIUM VERUM*, *MELILOTUS OFFICINALIS*, *POTENTILLA ALBA* И *SALVIA OFFICINALIS*

Ковалева А.М., Ильина Т.В., Кошевой О.Н., Комиссаренко А.Н.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина  
e-mail: allapharm@yahoo.com

**Целью** нашей работы стало изучение липофильных соединений цветков и травы подмаренника настоящего *Galium verum*; травы, листьев, стеблей и цветков донника лекарственного *Melilotus officinalis*; травы лапчатки белой *Potentilla alba* и листьев, стеблей и соцветий шалфея лекарственного *Salvia officinalis* методом хромато-масс-спектрометрии и оценка возможности их использования для создания лекарственных препаратов. Липофильные соединения этих видов практически не исследовались.

*Galium* – многочисленный род однолетних и многолетних травянистых растений семейства мареновые *Rubiaceae*, который насчитывает более 400 видов, распространенных в умеренных зонах как Северного, так и Южного полушарий. Подмаренник настоящий не является фармакопейным видом, нашел применение только в гомеопатии. Оказывает диуретическое, желчегонное, литолитическое, противовоспалительное и седативное действие. Содержит иридоидные гликозиды монотропин и асперулозид, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества. В хлороформной фракции цветков подмаренника настоящего методом хромато-масс-спектрометрии определено 41 соединение. Идентифицированы и установлено количественное содержание 9 веществ терпеноидной природы – линалоол, цис-линалоол-оксид, транс-линалоол-оксид, цис-эпокси-линалоол, транс-эпокси-линалоол,  $\alpha$ -терпинеол, борнеол, камфора, сквален. Среди фенольных соединений обнаружены бензиловый спирт, 4-винилфенол, 4-винил-2-метоксифенол; остальные соединения относятся к насыщенным углеводородам, жирным кислотам и их сложным эфирам. В этанольном экстракте из травы подмаренника настоящего выявлено 68 соединений. Идентифицировано и установлено количественное содержание 44 веществ, среди которых терпеноиды, ароматические соединения, альдегиды, кетоны, жирные кислоты и их сложные эфиры. Доминирующими веществами являются пальмитиновая, миристиновая, линолевая кислоты и гексагидрофарнезиллацетон. Наличие терпеноидов в хлороформной и спиртовой фракциях создает предпосылки для рассмотрения подмаренника настоящего как сырьевого источника линалоола, борнеола, камфоры и сквалена.

*Melilotus officinalis* входит только лишь в Британскую Травяную Фармакопею. Траву донника применяют в гомеопатической и официальной медицине при тромбофлебитах, застойных явлениях в легких, яичниках. Производные кумарина оказывают антикоагулянтное, фибринолитическое действие. Нами исследованы трава, листья, стебли и цветки донника лекарственного хромато-масс-спектрометрическим методом, выявлены и количественно определены жирные кислоты и их эфиры, кумарин, дикумарин и инозитол. Методом трехмерной сканирующей спектрофлуориметрии в ультрафиолетовом и видимом диапазонах спектра установлен количественный состав хлорофиллов и каротиноидов. Результаты исследования показывают перспективность использования липофильных фракций различных частей донника лекарственного для создания лекарственных средств.

*Potentilla alba* – нефармакопейное растение. Биологически активные добавки, полученные из лапчатки белой, применяются при атеросклерозе, различных видах тиреоидита. Химический состав травы и подземных органов лапчатки белой практически не изучен. Хромато-масс-спектрометрическим методом в траве лапчатки белой впервые идентифицированы компоненты эфирного масла и установлено их количественное содержание. Определено 41 вещество, из них идентифицировано 27. Алифатические соединения составляют 36,65%, изопреноиды – 21,38%. Наличие биологически активных терпеноидов таких, как линалоол и цис-линалоол-оксид, фарнезиллацетон, фитол и сквален, обладающих спазмолитической и противовоспалительной активностью, служит предпосылкой для создания лекарственных препаратов.

*Salvia officinalis* L. в настоящее время входит в фармакопеи большинства стран мира, в том числе и в отечественную фармакопею. Листья шалфея лекарственного содержат эфирное масло, дубильные вещества, дитерпены, оказывающие противовоспалительное, антиоксидантное, антисептическое действие. Нами изучены компоненты эфирных масел листьев, стеблей и соцветий шалфея методом хромато-масс-спектрометрии: доминирующими являются кислородосодержащие монотерпеноиды – 1,8-цинеол, борнеол,  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйоны и камфора; сесквитерпеноид азуленового ряда – виридифлорол и дитерпеноид – манол. Сравнительный анализ компонентного состава эфирного масла из листьев шалфея лекарственного с дву- и четырехлетних растений выявил, что в старших по возрасту растениях увеличивается суммарное количественное содержание бициклических терпеноидов таких, как камфора и борнеол. Уменьшается содержание виридифлорола, моноциклических сесквитерпеноидов – гумулена и кариофиллена, содержание 1,8-цинеола увеличивается незначительно. Как источник 1,8-цинеола, борнеола и камфоры наиболее оптимальным сырьем являются листья шалфея четырехлетнего возраста.

Нами проведен сравнительный качественный и количественный анализ липофильных веществ различных надземных органов и частей растений флоры Украины. На основе полученных результатов осуществлена оценка возможности использования этих объектов в качестве новых фармакопейных видов растений и новых видов сырья для получения лекарственных препаратов.



**LYPOPHYLIC COMPOUNDS OF *GALIUM VERUM*, *MELILOTUS OFFICINALIS*,  
*POTENTILLA ALBA* AND *SALVIA OFFICINALIS***

Kovalyova A.M., Ilyina T.V., Koshevoy O. N., Komissarenko A.N.

National University of Pharmacy, Kharkiv  
e-mail: allapharm@yahoo.com

**The aim** of our work was to study lipophylic compounds of flowers and herb of Lady's Bedstraw *Galium verum*, herb, leaves, stems and flowers of Yellow Melilot *Melilotus officinalis*, herb of White Cinquefoil *Potentilla alba* and flowers and the floscule, herb of Common Sage *Salvia officinalis* L. using method of chromatography-mass spectrometry and to estimate the possibility of their use for creation of medicines.

Lipophylic connections of these kinds practically have not been investigated.

*Galium* is a genus of one-year and long-term herbal plants of family madder, which counts more than 400 kinds, widespread in moderate areas both North and South hemispheres. *Galium verum* L. everywhere kind in Europe, Canada and in east part of the Pacific coast of the United States.

Lady's Bedstraw the real is not a pharmacopic kind, it is applied only in homoeopathy. It has moderate diuretic renders, bile-expelling, litholytic, mild astringent, anti inflammatory, antineoplastic and sedative effect. *Galium verum* contains glycosides of iridoids – monotropein, asperuloside, phenolic acids – chlorogenic, coffee, gallic, coumarines, flavonoids, anthracene derivatives, tannic matters, ascorbic acid.

41 compounds have been found in the lipophilic fraction of Lady's bedstraw's flowers using chromatography-mass spectrometry method. 9 compounds of terpenoid structure were identified and quantitatively analyzed: linalool, cis-linalool-oxyd, trans-linalool-oxyd, cis-epoxy-linalool, trans-epoxy-linalool,  $\alpha$ -terpineol, borneol, camphor, squalene. Among phenolic compounds benzyl alcohol, 4-vinylphenol, 4-vinyl-2-methoxyphenol were identified. Other compounds belong to saturated hydrocarbons, fatty acids and their esters.

68 connections were exposed in ethanol extract from the herb of Lady's bedstraw's using method of mass-spectrometry. Quantitative content of 44 substances were identified and set, among which are terpenoids, aromatic connections, aldehydes, ketones, fat acids and their difficult ethers.

Substances that dominate are palmitic, myristic, linolic acids, ethyl palmitate, hexahydrofarnesylacetone. Presence significant amount of terpenoids in chloroform's and spirit factions creates pre-conditions to suggests Lady's Bedstraw flowers as a promising raw material for obtaining linalool, borneol, camphor, and squalene.

*Melilotus officinalis* is included in the British Herbal Pharmacopoeia. The herb of Melilot is applied in homoeopathic and official medicine at thrombophlebitis, stagnant phenomena in lights, ovaries. The derivatives of coumarine have anticoagulants, fibrinolytic action. We investigated herb, leaves, stems and flowers.

In the Melilot herb fatty acids and their esters, coumarin, dicoumarin and inositol were identified by chromatography-mass spectrometry method. By the method of three-dimensional scanning spectral fluorimetric in the ultraviolet and visible ranges of the spectrum the quantitative content of the chlorophylls and carotenoids was established.

The result of the search shows the perspectives in use of lipophylic fractions of different parts of Melilot for further creation of new medicines.

*Potentilla alba* is not pharmacopic plant. Nature's Sunshine Products, got from White Cinquefoil are used at atherosclerosis, different types of tireoidit. The chemical composition of herb and underground organs of White Cinquefoil are practically not studied. For the first time it is lead identification and quantitative definition of components of essential oil of *Potentilla alba* herb: 41 substance were found and 27 of which were identified. Aliphatic compounds in certain make 36,65% and terpenoids – 21,38%. The most important as biologically active substances are linalool and cis-linalool oxide, farnesylacetone, phytol, squalene.

Common Sage *Salvia officinalis* L. presently enters in pharmacopoeia of the most countries of the world, including in a domestic pharmacopoeia. The leaves of Sage contain essential oil, tannic matters, diterpens, that have anti inflammatory, anti oxidant, antiseptic and astringent action.

By us are studied the components of the essential oils of leaves, stems and floscules of Sage by the method of chromatography-mass spectrometry. Oxygen containing monoterpenoids – 1,8-cineole, borneol,  $\alpha$ -thujone and  $\beta$ -thujone and camphor; sesquiterpenoid of azulene derivatives – viridiflorol and of diterpenoid – manool are basic operating substances presented in essential oil of Sage.

The comparative analysis of the component content of the essential oil from leaves of the Sage, that has been assembled from the two year and four year old plants, revealed, that the summary of quantitative content of bicyclic terpenoids (such, as camphor and borneol) increases in the elder plants.

The content of sesquiterpenoid – to viridiflorol decreases, disappear monocyclic sesquiterpenoids – humulene, caryophyllene. The content of 1,8-cineole increases insignificantly. Leaves of the Sage of four year old age are the most optimum raw material by the content of 1,8-cineole, camphor and borneol in the essential oil.

We carried out the comparative qualitative and quantitative analysis of the lipophylic substances of different overground organs and parts of the plants of flora of the Ukraine.

The possibility of using these objects as new pharmacopoeias species of plants and as new medicines was estimated.



## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *NOSTOC LINCKIA (ROTH) BORN ET FLAH CNM-CB-03* И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Кожокарь А.И., Чепой Л., Рудь Л.Б., Миску В.Г., Плэчинтэ Н.С., Рудик В.Ф.

e-mail: angelacojocari@gmail.com

Ценность фундаментальных исследований в современной науке состоит не только в теоретическом обосновании некоторых постулатов, установлении механизмов некоторых процессов, но и в том, что они предоставляют неограниченные возможности практического применения полученных результатов и преодоления препятствий, возникающих в процессе производства.

Азотфиксирующие цианобактерии, обладающие высоким уровнем синтеза специфических фикобилипротеинов являются ценным объектом промышленного производства этих веществ. Несколько последних лет мы работали над разработкой способов направленного синтеза фикобилипротеинов и экзополисахаридов цианобактерией *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* с использованием координационных соединений.

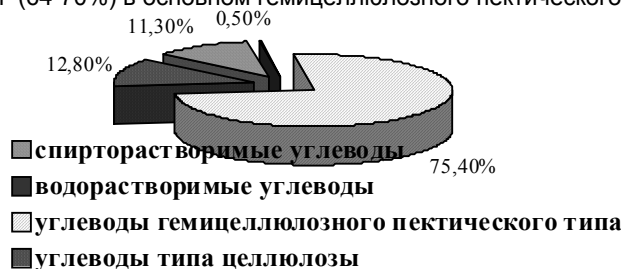
Была разработана экономически выгодная технология культивирования *Nostoc linckia (Roth.) Born et Flah CNM-CB-03* с применением стимуляторов: одного стимулятора фикобилиногенеза -  $[Fe(Pc)_2OH]_2$  и другой для увеличения выхода экзополисахаридов -  $[Mn(CBr_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$ . Предложенная технология культивирования штамма *Nostoc linckia (Roth.) Born et Flah CNM-CB-03* позволяет получить ценную биомассу из которой за один технологический цикл можно получить 4 разных препарата: EPZ; FB; EN и RN.

**Препарат EPZ** - экзополисахариды, выделенные из культуральной жидкости. Спектральный анализ в инфракрасном диапазоне выявил наличие в данном препарате многочисленных функциональных групп (O-H; C-H; C=O; S=O; C-O-S; =P-O-) которые придают ему анионные свойства и определяют области его применения. Будучи протестированным в качестве биосорбента для ионов  $^{60}Co^{2+}$  и  $^{134}Cs^+$  он проявил уровень ретенции в 46,3% и 80,6%, соответственно.

**Препарат FB** – фикобилипротеины полученные из биомассы *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03*, при помощи разработанного нами способа. Препарат FB также был протестирован в качестве биосорбента для ионов  $^{60}Co^{2+}$  и  $^{134}Cs^+$  (с уровнем ретенции в 70,5 и 86,4% соответственно).

**Препарат EN** – водный экстракт из биомассы ностока. Характеризуется высоким содержанием аминокислот (36,62%), при этом доля основных аминокислот составляет 37,5% их общей суммы. Около 60% всех установленных аминокислот относится к иммуноактивным. Существенная часть препарата EN представлена углеводами, спектральный анализ которых выявил наличие серосодержащих полимеров. Препарат EN был протестирован в качестве стимулятора продуктивности и липидогенеза у *Streptomyces canosus CNM 71* и стимулятора цианокобаламиногенеза, порфириногенеза и липолитической активности у *Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii CNM-PB -01*, показывая высокий биологический эффект по отношению ко всем изученным признакам.

**Препарат RN** – остаток, полученный после всех проведенных экстракций. Содержит в основном белки (10-12%) и углеводы (64-70%) в основном гемицеллюлозного пектического типа.



Содержание углеводов в препарате RN

Препарат RN проявил самый высокий уровень ретенции ионов  $^{60}Co^{2+}$  и  $^{134}Cs^+$  (74,5 и 95,1%).

Применение предложенной технологической схемы культивирования *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* обеспечивает максимальное использование биосинтетического потенциала данного штамма. А полученные при этом препараты могут найти широкое применение в качестве биостимуляторов в микробиологическом промышленном производстве. А также в качестве биосорбентов в процессах очистки сточных вод.



**TECHNOLOGIES OF PREPARATIONS FROM NOSTOC LINCKIA (ROTH) BORN ET FLAH CNM-CB-03 BIOMASS OBTAINING AND SOME ASPECTS OF THEIR USING**

Cocjocari A., Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Placinta N., Rudic V.

e-mail: angelacojocari@gmail.com

The researches value in actual science consists not only in theoretical bases of some postulates, some processes mechanisms stabilization, but it also presents numerous possibilities for the practical application of obtained results, and possibilities to negotiate the problems originated since the production processes.

Nitrogen-fixing cyanobacteria with high level of specific phycobiliproteines are very valuable object for their industrial production. The last years we have worked on the procedures for phycobiliproteines and exopolysaccharides direct synthesis by *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* using coordinating compounds elaboration.

The economical technology for *N. linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* cultivation using two stimulators was elaborated.  $[Fe(Pc)_2OH]$  has been used for phycobiligenesis and  $[Mn(CBr_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$  for exopolysaccharides quantity increasing.

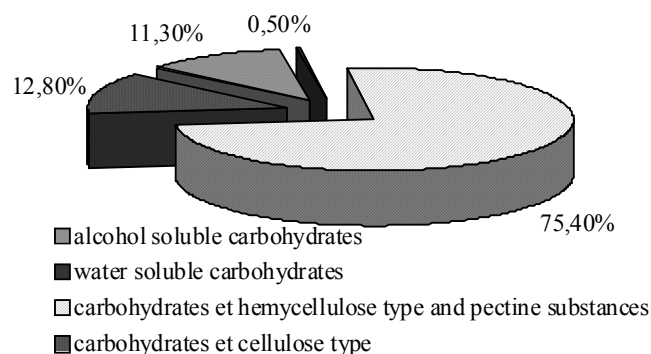
Proposed technology for *N.linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* strain cultivation permits the valuable biomass obtaining, from which during the only one technological process 4 valuable preparations are extracted: EPS; FB; EN and RN.

**Preparation EPS** – exopolysaccharides separated from cultural liquid. Spectral analysis of this preparation in infrared spectrum showed a big quantity of functional groups (O-H; C-H; C=O; S=O; C-O-S; =P-O-) offer anionic character and determine the areas of its using. EPS tested as  $^{60}Co^{2+}$  and  $^{134}Cs^+$  ions biosorbent has retention 46,3 % and 80,6 % respectively.

**Preparation FB** – phycobiliproteins separated from *N. linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* biomass using our method. FB preparation has been tested as  $^{60}Co^{2+}$  and  $^{134}Cs^+$  ions biosorbent with grade of retention 70,5% and 86,4% respectively.

**Preparation EN** – water extract from nostoc biomass. Is has high amount of aminoacids (36,62 %), from which 37,5 % are essential. About 60% from total content of identified aminoacids have immunoactive effect. Considerable part of EN preparation form carbohydrates, whose spectral analysis demonstrates the presence of sulphated polymers. EN preparation has been tested as stimulator of productivity and lipidogenesis on *Streptomyces canosus* CNM 71, and of cyanocobalaminogenesis, porphyrinogenesis and lipolytic activity on *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01. Preparation demonstrated important positive effect on all studied data.

**Preparation RN** – residue after all extractions. It contains special proteins (10-12%) and carbohydrates (64-70%), most in the form of hemicelluloses and pectin substances (fig.).



**Figure.Carbohydrates maintenance in RN preparation**

RN preparation had the highest grade of  $^{60}Co^{2+}$  and  $^{134}Cs^+$  ions biosorbition (74,5 % and 95,1 % respectively).

Application of technological scheme proposed for *Nostoc linckia (Roth) Born et Flah CNM-CB-03* cultivation permits the maximal use of strain biosynthetic potential, but preparation obtained in this way could be widely used as biostimulators in industrial microbiology and as biosorbents in sewage purification processes.



## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИ-, БИС- И ПОЛИГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОСТРОЕННЫХ НА ОСНОВЕ МОЧЕВИН И ИХ АНАЛОГОВ

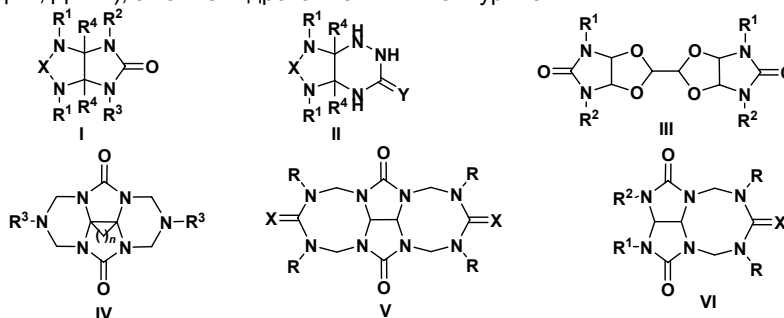
Кравченко<sup>1</sup> А.Н., Аникина Л.В.,<sup>2</sup> Вихарев Ю.Б.,<sup>2</sup> Баранов В.В.,<sup>1</sup> Газиева Г.А.,  
<sup>1</sup> Василевский С.В.,<sup>1</sup> Махова<sup>1</sup> Н.Н.

<sup>1</sup>Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Российская Федерация  
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru

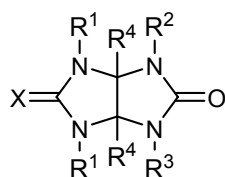
<sup>2</sup>Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Российская Федерация

Одной из важнейших фундаментальных задач современного этапа развития медицинской химии является углубленное исследование основных типов органических реакций с целью расширения границ их применения и создания новых подходов к получению практически важных органических соединений, в том числе потенциально биологически активных. Коллектив лаборатории азотсодержащих соединений ИОХ РАН решает эту задачу на примере бициклических бисмочевин октанового ряда (гликольурилов). Одно из соединений этого класса под названием мебикар (2,4,6,8-тетраметилгликольурил) внедрено в медицинскую практику.

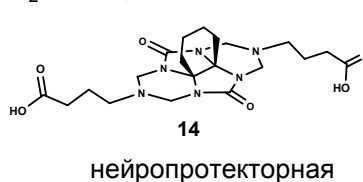
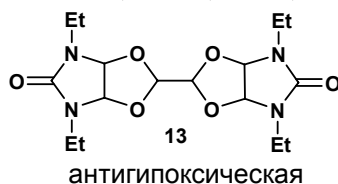
С целью получения различных типов би-, бис- и полигетероциклических соединений **I-VI** в настоящей работе изучены реакции циклоконденсации мочевины и их аналогов (тиосемикарбазида, аминокванидина, сульфамидов) с глиоксалем в различных гидратных формах и 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-онами(тионами) (ДГИ, ДГИТ), а также гидроксиметилгликольурилами.



Известно, что гликольурилы обладают широким спектром биологической активности, поэтому исследование токсико-фармакологических свойств основных типов синтезированных соединений **1-14** проводилось в Институте технической химии УрО РАН. Острая токсичность представленных соединений была определена по экспресс-методу В.Б. Прозоровского (1978). По классификации К.К. Сидорова (1973) полученные соединения относятся к классу относительно безвредных веществ (6 класс) и практически нетоксичных веществ (5 класс). Исследование токсико-фармакологических свойств проводили на беспородных мышцах-самцах массой 20-22 г в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».



- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH                       | седативная                     |
| 2 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH <sub>2</sub> COOH   | седативная                     |
| 3 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH                         | нейропротекторная и седативная |
| 4 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH <sub>2</sub> C(O)NHCH <sub>2</sub> COOH                   | седативная                     |
| 5 X = O, R <sup>1</sup> = Me, R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH                     | седативная и антигипоксическая |
| 6 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(COOH)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SMe (S-R,S)          | нейропротекторная              |
| 7 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(COOH)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SMe (R-S,S)          | антигипоксическая              |
| 8 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(COOH)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SMe (R-S,R)          | седативная                     |
| 9 X = O, R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(COOH)CH(Me) <sub>2</sub>                                  | повышает тревожность           |
| 10 X = O, R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Me, R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOMe               | ноотропная                     |
| 11 X = O, R <sup>1</sup> = Me, R <sup>2</sup> = R <sup>4</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH(COOH)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | нейропротекторная              |
| 12 X = S, R <sup>1</sup> = Et, R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH <sub>2</sub> COOMe, R <sup>4</sup> = Ph                               | анксиолитическая               |



Работа выполнена при поддержке программы ОХНМ РАН (ОХ-9) и гранта РФФИ 08-03-01070а.



## НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНО- И ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ – ПОЛУПРОДУКТОВ ДЛЯ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ

*Тарасенко А.И., Бушуев А.С., Галстян А.Г.*

Институт химических технологий Восточноукраинского национального университета им. В. Даля,  
Рубежное, Украина  
e-mail: tov@iht.lg.ua

Амино- и гидроксibenзойные кислоты широко используются, как полупродукты, для получения разнообразных биологически активных субстанций, которые применяются для производства анестезирующих, анальгезирующих и противовоспалительных препаратов. Известные методы получения данных кислот имеют ряд недостатков. Одни характеризуются образованием токсичных отходов, другие - низкой селективностью, третьи - сложностью технологического процесса.

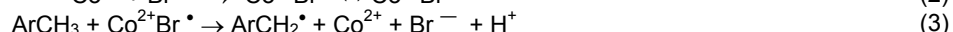
С целью разработки экологически чистого способа получения гидрокси- и аминобензойных кислот, который бы характеризовался высоким выходом целевых продуктов и мягкими условиями протекания процесса, нами было изучено окисление гидрокситолуолов и аминотолуолов озоном в уксусной кислоте.

Показано, что в уксусной кислоте гидрокси- и аминопроизводные толуола реагируют с озоном с высокой скоростью ( $k_{эф} = 10^3 \div 10^4$  л/моль·с,  $t = 20^\circ\text{C}$ ) преимущественно по неподеленной паре электронов гетероатома с образованием, в основном, продуктов разрушения ароматического кольца и смолообразных соединений. Ароматические продукты окисления по метильной группе субстрата в этих условиях не образуются.

Высокая реакционная способность гидрокси- и аминотолуолов утрачивается после их О- и N-ацилирования. Образующейся при этом ацетокси- и ацетамидотолуолы по своей активности в реакции с озоном ( $k_{эф} = 0,6 \div 2,5$  л/моль·с,  $t = 20^\circ\text{C}$ ) приближается к метилбензолам, что, вероятнее всего, свидетельствует об изменении механизма окисления. Очевидно, атака озоном в этих условиях осуществляется уже не по неподеленной паре электронов гетероатома, а, в соответствии с классическими представлениями о реакции озона с алкилбензолами, преимущественно по ароматическому кольцу с образованием алифатических пероксидов (80-94%) и, в меньшей степени, по метильной группе с образованием соответствующих ароматических карбоновых кислот (5-15%).

Введение в окислительную систему каталитических добавок солей кобальта в смеси с бромидами щелочных металлов позволяет, в значительной степени, предотвратить озонолиз ароматического кольца и направить процесс в сторону окисления по метильной группе с образованием ацетокси- и ацетамидобензойных кислот, выход которых при  $95^\circ\text{C}$  достигает (68-95%) и (59-86%) соответственно.

Селективное окисление по метильной группе в присутствии ацетата кобальта (II) и бромида калия становится возможным в результате двухстадийного окисления озоном: озон преимущественно реагирует с  $\text{Co}^{2+}$  с образованием активных частиц  $\text{Co}^{3+}$  (1). Далее по реакции (2) образуется комплекс  $\text{Co}^{2+}\text{Br}^\bullet$ , который с высокой скоростью вовлекает субстрат в процесс селективного окисления по метильной группе с образованием бензильного радикала (3):



Для прохождения реакции (1) подачу озона в окислительную систему необходимо осуществлять непрерывно. Прекращение его подачи тормозит процесс вплоть до полной остановки. Этот факт является дополнительным подтверждением образования активной формы катализатора, в основном, по реакциям (1,2). В условиях опытов концентрация молекулярного кислорода в газовой смеси в 30 раз выше концентрации озона, поэтому образующийся в системе бензильный радикал реагирует преимущественно с молекулой кислорода по реакции (4) с образованием пероксидного радикала, который далее преобразуется в конечные продукты (5):



Следует отметить, что при необходимости полученные ацетамидо- и ацетоксibenзойные кислоты легко гидролизуются ( $\text{EtOH}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $60^\circ\text{C}$ ) до соответствующих амино- и гидроксibenзойных кислот.



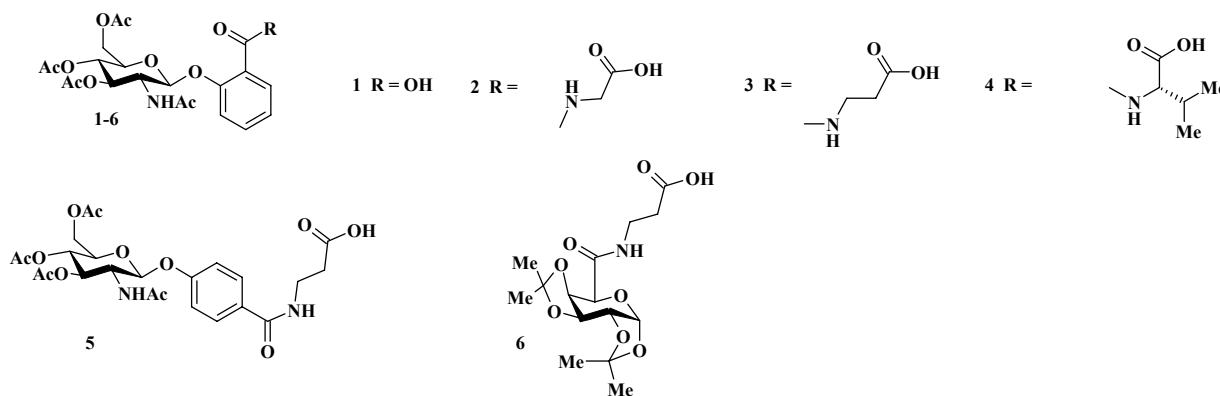
## УГЛЕВОД-АМИНОКИСЛОТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ. НОВЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Курьянов В.О., Чупахина Т.А., Шаповалова А.А., Гамма Т.В., Раваева М.Ю., Чирва В.Я., Коренюк И.И.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
e-mail: vladimir@tnu.crimea.ua

Среди многочисленных исследований, проводимых в области поиска средств, модулирующих деятельность центральной нервной системы, значительное место занимают работы, посвященные синтезу и изучению биологической активности производных медиаторных аминокислот. Показано, что химически модифицированные аминокислоты, по-видимому, являются пролекарствами, а введенные в их молекулы заместители облегчают транспорт через гемато-энцефалический барьер, доставляя нейромедиатор к мишеням, где и происходит высвобождение аминокислоты и связывание ее с рецептором. Кроме того, такая модификация приводит к появлению новых, не характерных для свободных аминокислот, фармакологических свойств, например, противовоспалительных, антиульцерогенных, противовоспалительных и других.

В связи с этим, актуальным является поиск таких способов химической модификации медиаторных аминокислот, которые, повышая их мембранотропность, сохраняли и/или усиливали биологический эффект.



Нами, на беспородных крысах-самцах со средним уровнем двигательной активности в ряде экспериментальных моделей стресса – «открытое поле», Порсолта, «черно-белая камера», «подвешивание за хвост», «крестообразно-приподнятый лабиринт», исследовано влияние производных **2-6** на поведенческие реакции животных в различных дозах при внутрибрюшинном введении за 30 мин до начала эксперимента. Антиульцерогенная активность глюкозаминидов **2-4** в дозе 50 мг/кг изучена в тесте стрессорного язвообразования.

Обнаружено, что соединения **2-6** обладают выраженным дозозависимым стресспротекторным и неселективным антидепрессантным действием. Показано, что структура тестируемых веществ – положение заместителя в ароматическом ядре остатков гироксибензойных кислот, природа углеводного остатка, не оказывают существенного влияния на характер и величину психотропного эффекта.

В тесте стрессорного язвообразования найдено, что гликозиды **2-4** оказывают заметное ulceroprotective действие по сравнению с контролем. Общая площадь поражения слизистой оболочки желудка при введении гликозида **2** снижается до  $4,0 \pm 0,9$  мм<sup>2</sup>, **3** до  $3,50 \pm 0,86$  мм<sup>2</sup>, **4** – до  $1,7 \pm 1,1$  мм<sup>2</sup>. В контрольной группе животных площадь поражения слизистой оболочки желудка составила  $5,80 \pm 0,75$  мм<sup>2</sup>. Таким образом, введение веществ **2-4** непосредственно перед стрессом способствует существенному уменьшению степени поражения слизистой оболочки желудка по сравнению с контролем. Различия в величинах язвенного индекса у опытных и контрольных групп свидетельствуют о способности исследуемых веществ **2-4** оказывать быстрое защитное действие при патогенезе слизистой оболочки желудка в условиях острого стресса.

Также на модели «формалинового воспаления» у крыс исследована противовоспалительная активность гликозидов **1-4**. Установлено, что исследованные соединения **1-4** в дозе 50 мг/кг обладают выраженным противовоспалительным действием. Отметим, что выраженной корреляции между липофильностью и противовоспалительной активностью, не наблюдается.

Таким образом, нами впервые обнаружена психотропная, антиульцерогенная и противовоспалительная активность углеводсодержащих конъюгатов глицина, β-аланина, L-валина.



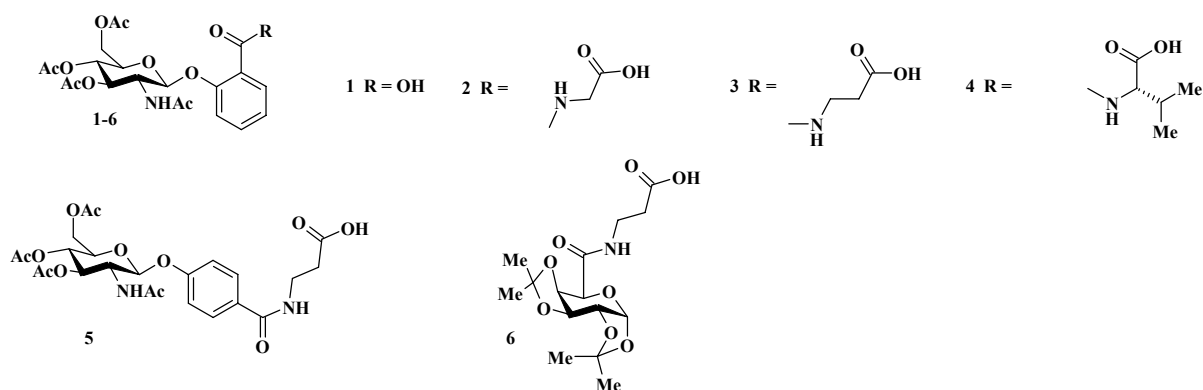
### CARBOHYDRATE AMINO ACIDS CONJUGATES. NEW ASPECTS OF BIOLOGICAL ACTIVITY

Kuryanov V.O., Chupakhina T.A., Shapovalova A.A., Gamma T.V., Ravaeva M.Yu., Chirva V.Ya., Korenyuk I.I.

V.I. Vernadsky Tavrical national university, Simferopol, Ukraine  
e-mail: vladimir@tnu.crimea.ua

Among the numerous investigations in the field of neuromodulators works, devoted to synthesis and biological activity of derivatives of mediatory amino acids occupy a considerable place. It was shown that the substituent's in amino acids residues were assist to amino acids passed through blood-brain barrier and deliver neurotransmitter to it target. Thus chemically modifying amino acids may be a prodrugs. Furthermore such modification result to appearance of new pharmacological properties which are not inhere to native amino acids, such as antiulzerogenic, anticancer, anti-inflammatory etc.

In view of this fact a new approaches to the chemical modification of mediatory amino acids in order to increase of their affinity to cellular membrane without decreasing of biological effects.



The influence of derivatives **2-6** on behavioral response of outbred male rats with medium level of locomotor activity was investigated in several behavioral tests, such as "an open field", Porsolt, "dark-light camera", "hanging at the tale".

Antilcerogenic activity of glucosaminides **2-4** was investigated in the test of stressful ulcer formation in dose of 50 mg/kg.

As it was found out derivatives **2-6** have strongly pronounced dose based stress protective and non selective anti-depressant influence. It was found the structure of tested compounds is the place of the aromatic ring substituent of the hydroxy benzoic acid residue and the nature of carbohydrate residue and it doesn't cause any influence on the character and amount of the psychotropic effect.

During the test of stressful ulcer formation has been found that glycosides **2-4** gives significant ulceroprotective influence unlike to rat checkup group. After glycoside **2** injection the general damaged area of the stomach mucous tunic decreases to  $4,0 \pm 0,9 \text{ mm}^2$ , **3** to  $3,50 \pm 0,86 \text{ mm}^2$ , **4** – to  $1,7 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ . In the checkup group of rats the damaged area of the stomach mucous tunic was  $5,80 \pm 0,75 \text{ mm}^2$ . So derivatives **2-4** before stress directly injection assists to reduce of the mucous tunic damage degree. The difference of the ulcer index amounts between researched groups of rats testified to the ability of the researched compounds **2-4** caused fast protective action with pathogenesis of the stomach mucous tunic under the high stress.

Also anti-inflammatory activity of glycosides **1-4** has been investigated on "formalin inflammatory" rat test. Has been found that investigated compounds **1-4** has strong anti-inflammatory activity. The expressed correlation of lipophilicity and anti-inflammatory activity was not detected.

This way we were the first who found out psychotropic, antiulcerogenic and anti-inflammatory activity of carbohydrate contained conjugates of glycine, b-alanyne, L-valine





## ЭКСТРАКЦИЯ ГИСТИДИНА СУЛЬФОЭКСТРАГЕНТОМ

Куваева З.И., Агабалаев А.А.

ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», Беларусь. e-mail: lie@bas-net.by

Гистидин [2-амино-3-(4-имидазолил)пропионовая кислота] является слабой основной аминокислотой, содержащей имидазольный цикл. Используется при лечении аллергии, анемии, артрита, повышенной кислотности, язвенной болезни и сердечно-сосудистых болезней. Недостаток гистидина может вызвать ослабление слуха [1]. Основным способом получения гистидина является микробиологический синтез с последующим выделением из ферментативной среды. Ранее было показано [2], что одним из наиболее перспективных методов выделения аминокислот из водных растворов, в том числе ферментационных сред, является экстракция. В работах [3, 4] было показано, что эффективным сульфоекстрагентом при экстракции аминокислот является динилнафталинсульфонокислота. Гистидин в зависимости от pH он может существовать в различных ионных формах. Распределение гистидина по ионным формам в зависимости от pH показано на рис. 1. Видно, форма двухзарядного катиона превалирует в наиболее кислой области pH (pH<1).

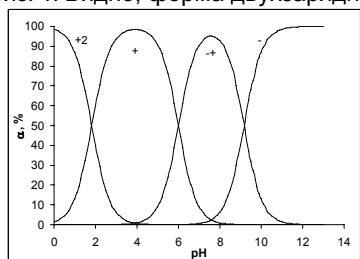


Рис. 1

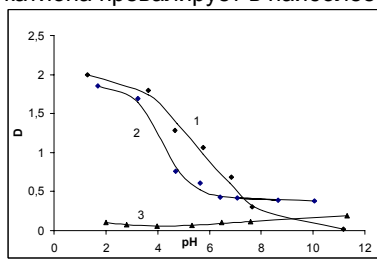


Рис. 2

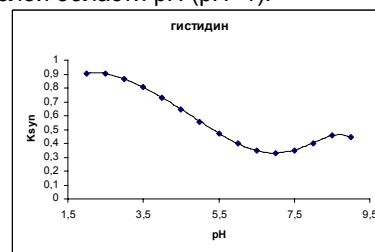


Рис. 3

В виде однозарядного катиона гистидин находится при pH4. Цвиттер-ионная форма имеет довольно узкий максимум в изоэлектрической точке при pH7,6. При pH>11 гистидин находится в форме аниона. В силу того, что гистидин существует в зависимости от pH в виде катионов различного заряда, наиболее удобной характеристикой межфазного распределения является коэффициент распределения (D), который не учитывает заряд катиона, а определяется концентрациями распределяемого вещества в двух фазах:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

где  $C_{org}$  – равновесная концентрация аминокислоты в органической фазе,  $C_{aq}$  –

равновесная концентрация аминокислоты в водной фазе. Зависимость коэффициента распределения гистидина от pH среды показана на рис. 2:

Экстракция гистидина HD/октан (кривая 1) сильно зависит от pH среды. Для многих аминокислот экстракция динилнафталинсульфонокислотой в зависимости от pH имеет экстремальный характер с максимумом [3, 5, 6]. В данном случае характерно отсутствие максимума на кривой  $D=f(pH)$ . Коэффициент распределения гистидина возрастает с уменьшением pH, что указывает на сильное взаимодействие аминокислоты с молекулами экстрагента. В качестве модифицирующей добавки к растворителю был выбран н-нонанол-1. Кривая 2 показывает зависимость коэффициента распределения гистидина от pH при использовании в качестве растворителя октан +20% (об.) нонанола. Сравнение зависимостей 1 и 2 показывает наличие существенных изменений в ходе коэффициента распределения при добавлении в фазу экстрагента спирта. Наблюдается более резкое уменьшение значений D в интервале pH 3-6, при pH 6-10 величина D практически не изменяется. Зависимость может быть обусловлена проявлением сольватационного эффекта за счет взаимодействия спирта с молекулами гистидина и экстрагента. Как следует из кривой 3, экстракция гистидина растворителем октан/20% нонанол-1 во всем диапазоне pH незначительна. Используя экспериментальные данные, нами был рассчитан коэффициент синергизма ( $K_{syn}$ ):

$$K_{syn} = \frac{D3}{D1 + D2}$$

где D1 – коэффициент распределения при экстракции HD/октан, D2 – коэффициент

распределения при экстракции октан/20% нонанол-1, D3 – коэффициент распределения при экстракции NHD/октан/20% нонанол-1. Зависимость  $K_{syn}=f(pH)$  приведена на Рис. 3:

Из представленных данных следует, что в широком диапазоне pH наблюдается отрицательный синергетический эффект ( $K_{syn}<1$ ). Полученные результаты могут быть объяснены сольватационным экранированием молекул экстрагента и гистидина молекулами спирта.

Таким образом, гистидин хорошо экстрагируется из водных растворов органическими растворами HD в неполярном растворителе в кислой области pH. При использовании добавки нонанола в фазу экстрагента процесс экстракции проходит менее эффективно, при этом наблюдается отрицательный синергетический эффект.

### Литература:

1. ReKicen. – Режим доступа: <http://reKicen.ru/php/content.php?group= 2&id=462>. Дата доступа: 18.11.2008.
2. Солдатов В.С., Куваева З. И., Бычкова В.А., Водопьянова Л.А. // ЖПХ. 1999. Т. 72. Вып. 6. С. 935-938.
3. Солдатов В.С., Гринько В.Н., Куваева З.И., Бычкова В.А., Водопьянова Л.А. // ЖФХ. 2004. Т. 78. №1. С. 114-118.
4. Гаврилюк И.В., Куваева З.И. // Вести НАН Беларуси. Сер. хим. наук. 2005. №1. С. 22-25.
5. Солдатов В.С., Куваева З.И., Бычкова В.А., Водопьянова Л.А. // Вести НАН Беларуси. Сер. хим. наук. 2000. №4. С. 27-31.
6. Куваева З.И., Гаврилюк И.В., Микулич А.В. // Вести НАН Беларуси. Сер. хим. наук. 2004. №4. С. 28-31.



## EXTRACTION OF HISTIDINE WITH SULFOEXTRACTANT

Kuvaeva Z. I., Ahabalajeu A. A.

Institute of Physical Organic Chemistry NAS of Belarus, Belarussia. e-mail: lie@bas-net.by

Gistidin [2-amin-3 (4-imidazolil) propionic acid represents the weak basic amino acid containing a cycle of imidazol. The lack of histidine can cause easing of hearing [1]. The basic way of reception of histidine is microbiological synthesis with the subsequent allocation from fermental environments. Earlier it has been shown [2] that one of the most perspective methods of allocation of amino acids of water solutions, including fermentative environments, is extraction. In works [3, 4] it has been shown that a effective sulfoextractant at the extraction of amino acids is a dinonilnaphthalenesulfonic acid (HD). Thus, research of interaction of histidine with the dinonilnaphthalenesulfonic acid represents an actual problem from the point of view of working out of ways of allocation of histidine from water environments. Histidine depending on pH it can exist in various ionic forms. Distribution of histidine under ionic forms depending on pH is shown in Fig. 1: Apparently, the form of two-charge cation prevails in the most sour area pH (pH <1).

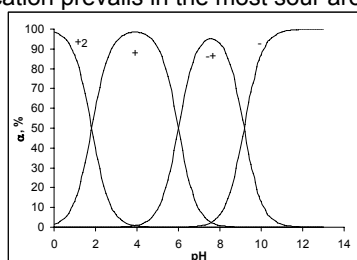


Fig. 1

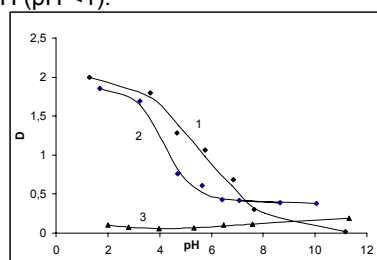


Fig. 2

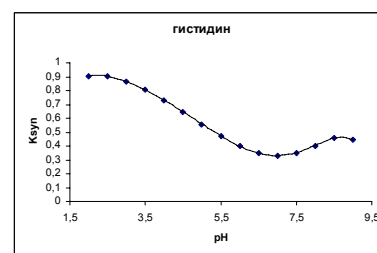


Fig. 3

The maintenance maximum of histidine in the form of singly cation is in a kind at pH 4. The zwitterionic form has narrow enough maximum in an isoelectric point at pH 7,6. At pH > 11 histidine is in the form of anion. Owing to that the histidine exists depending on pH in a kind of cations the various charge, the most convenient characteristic of interphase distribution is the distribution factor (D) which does not consider a charge of cation, and is defined by concentration of distributed substance in two phases:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

where  $C_{org}$  – equilibrium concentration of amino acid in an organic phase,  $C_{aq}$  – equilibrium

concentration of amino acid in a water phase. Dependence of factor of distribution of histidine from pH is shown environments in a Fig. 2:

It is visible that the ecstartion of histidine HD/octane (the curve 1) strongly depends from pH environments. For many amino acids ecstartion with dinonilnaphthalenesulfonic acid depending on pH has extreme character with a maximum [3, 5, 6]. In the given case absence of a maximum on curve  $D=f(pH)$  is characteristic. The distribution factor of histidine increases with reduction pH that specifies in strong interaction of amino acid with molecules of extractant. We have study influence of polarity of solvent on distribution factor of histidine. As the modifying additive to solvent has been chosen n-nonanol-1. The curve 2 shows dependence of factor of distribution of histidine from pH at use as solvent octane+20 % (ab.) n-nonanol-1. Comparison of dependences 1 and 2 shows presence of essential changes in a course of factor of distribution at addition a nonanol in a phase of extractant. Sharper reduction of values D in an interval pH 3-6 is observed, at pH 6-10 size D practically does not change. The given kind of dependence can be caused display of a solvation effect at the expense of interaction of spirit with molecules of histidine and extractant. As appears from a curve 3, extraction. of histidine solvent octane/20 % nonanol-1 in all range pH it is insignificant.

Using experimental data, by us has been calculated factor of synergism ( $K_{syn}$ ):

$$K_{syn} = \frac{D_3}{D_1 + D_2}$$

where  $D_1$  – distribution factor at extraction HD/octane,  $D_2$  – distribution factor at extraction

octane/20 % nonanol-1,  $D_3$  – distribution factor at extraction HD/octane/20 % nonanol-1. Dependence  $K_{syn}=f(pH)$  is resulted in a Fig. 3:

From the presented data follows that in a wide range pH it is observed negative synergetic effect ( $K_{syn} < 1$ ). The received results can be explained a solvation shielding spirit molecules of molecules of histidine and extractant.

Thus, on the basis of the spent researches it is possible to conclude that histidine is good extract from water solutions with organic solutions HD in not polar solvent in sour area pH. At additive use n-nonanol-1 in a phase of extractant process of extraction passes less effectively, is thus observed negative synergetic effect.

### References:

1. Rekicen. – an access Mode: <http://rekicen.ru/php/content.php?group=2&id=462>. Access date: 18.11.2008.
2. Soldatov V. S, Kuvaeva Z. I, Bychkova V. A, Vodopjanova L. A. // JCh. 1999. Vol. 72. № 6. P. 935-938.
3. Soldatov V. S, Grinko V. N, Kuvaeva Z. I., Bychkova V. A., Vodopjanova L. A. // JPhCh. 2004. Vol. 78. № 1. P. 114-118.
4. Gavriljuk I. V., Kuvaeva Z. I. // Cond. NAS of Belarus. S. Chemical sciences. 2005. № 1. P. 22-25.
5. Soldatov V. S, Kuvaeva Z. I., Bychkova V. A, Vodopjanova L. A. // Cond. NAS of Belarus. S. Chemical sciences. 2000. № 4. P. 27-31.
6. Kuvaeva Z. I., Gavriljuk I. V., Mikulich A. V. // Cond. NAS of Belarus. S. Chemical sciences. 2004. № 4. P. 28-31.



### СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФОТОХРОМНЫХ АНАЛОГОВ ВИТАМИНА А

Лаптев<sup>1</sup> А.В., Лукин<sup>1</sup> А.Ю., Беликов<sup>1</sup> Н.Е., Земцов<sup>1</sup> Р.В., Звездин К.В.<sup>1</sup>, Ходонов<sup>1</sup> А.А., Швец<sup>1</sup> В.И.,  
Барачевский<sup>2</sup> В.А., Варфоломеев С.Д.<sup>3</sup>, Демина<sup>3</sup> О.В.

<sup>1</sup>Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия. e-mail: biolara@inbox.ru

<sup>2</sup>Центр фотохимии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

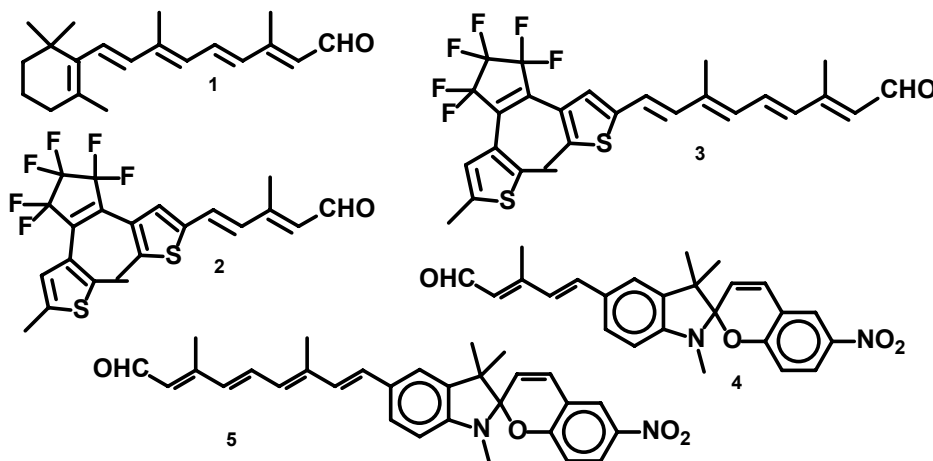
Ретиноиды (производные витамина А) играют ключевую роль в процессах функционирования природных светопреобразующих систем на основе ретиналь-содержащих белков – бактериородопсина, галородопсина, зрительного родопсина, сенсорного родопсина ксантородопсина, ретинохрома и других. При поглощении кванта света происходит изомеризация конкретной кратной связи молекулы ретиноида и запускается каскад событий, необходимых для генерации определенного типа физиологического или химического ответа.

В настоящее время бактериородопсин является одной из хорошо изученных простейших фотосинтетических систем, которые обладают функцией преобразования солнечной энергии. Этот мембранный белок был открыт в 1971 году в экстремально галофильной бактерии *Halobacterium salinarum* и функционирует как светуправляемый протонный насос. Белковая часть (бактериоопсин) состоит из единственной полипептидной цепи, хромофорной группой является протонированный альдимин ретиналя (альдегида витамина А) с  $\alpha$ -аминогруппой Lys-216.

Наш подход к структурно-функциональному исследованию светозависимой протонной транслоказы - бактериородопсина заключается в замещении природного хромофора (ретиналя) на его аналог и комплексного изучения их свойств [1].

Молекула этих полиеналей (**2-5**) содержит полиеновую цепь природного ретиналя (**1**), и вместо триметилгексенового кольца – фрагмент фотохрома (дигетарилэтененового или спиропиранового рядов). Нами разработан эффективный синтетический путь получения новых фотохромных полиеновых соединений (**2-5**) ряда витамина А при помощи реакции олефинирования по Хорнеру-Эммонсу соответствующих карбонильных предшественников  $C_5$ -фосфонатом и последующее восстановление промежуточных нитрилов DIBAL.

Проведено исследование спектральных и фотохимических свойств полученных аналогов ретиналя.



Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (проекты №09-03-00565 и 09-04-01003)

#### Литература:

1. А.А. Ходонов, С.В. Еремин, Дж.Л. Локшин, В.И. Швец, О.В. Демина, Л.В. Хитрина, А.Д. Каулен. // Аналоги ретиналя и их применение для исследования бактериородопсина - Биоорганич. химия, 1996, т. 22, N10-11, с. 747-778



### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF PHOTOCHROMIC VITAMIN A ANALOGS

Lapteva A.V.<sup>1</sup>, Lukin A.Yu.<sup>1</sup>, Belikov N.E.<sup>1</sup>, Zemtsov R.V.<sup>1</sup>, Zvezdin K.V.<sup>1</sup>, Khodonov A.A.<sup>1</sup>, Shvets V.I.<sup>1</sup>,  
Barachevsky V.A.<sup>2</sup>, Varfolomeev S.D.<sup>3</sup>, Demina O.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia  
e-mail: biolapa@inbox.ru

<sup>2</sup>Photochemistry Center RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia.

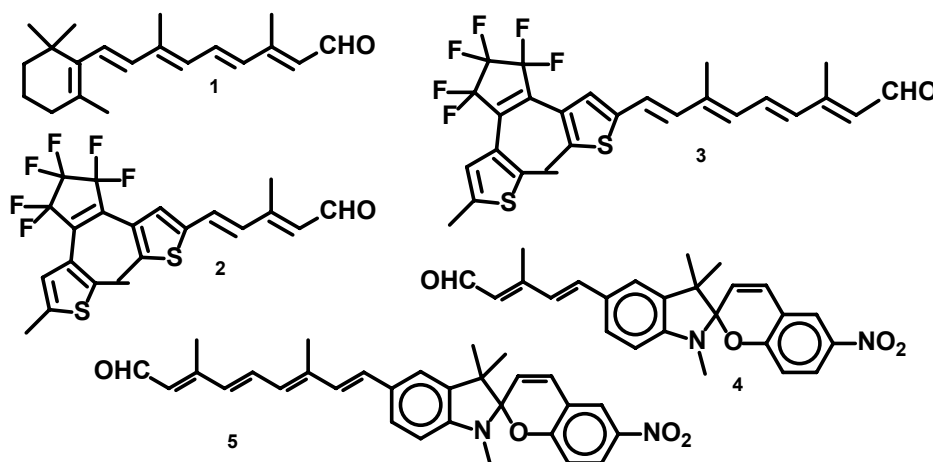
Retinoids (vitamin A derivatives) play a key role in the functional processes in the natural light-transforming systems based on retinal proteins – bacteriorhodopsin, halorhodopsin, visual rhodopsin, sensoric rhodopsin, retinochrome and other. The isomerisation of definite double bond takes place during light quantum absorption and this act initiates an event cascade, which is necessary for generation of definite type physiological or chemical signals.

Nowadays, bacteriorhodopsin is one of the simplest, well-known light-converter systems. This membrane protein was discovered in *Halobacterium salinarum* in 1971 and it functions as a light-driven proton pump. The polypeptide part (bacterioopsin) consists of a sole peptide chain, the chromophore group is a protonated Schiff base of retinal with  $\alpha$ -amino group Lys-216.

Our approach to the bacteriorhodopsin structure-function investigation includes replacement of the natural chromophore (retinal) by its analogs and complex study of their properties [1].

We proposed an effective synthetic route for the preparation of new photochromic polyenic compounds (**2-5**) related to Vitamin A aldehyde (retinal) (**1**). These polyenes possess photochromic fragment – diarylethene or spiropyran moiety instead of the trimethylcyclohexenic ring in its molecule. The key steps of proposed synthetic route involved the Horner-Emmons olefination procedure of carbonyl precursor with the usage of C<sub>5</sub>-phosphonate and reduction of intermediate nitrile to the polyenal by DIBAL.

Spectral and photochemical properties for the new retinal analogs in solution are described.



This work was partly supported by RFBR grants (projects № 09-03-00565 and 09-04-01003).

#### References:

1. A.A. Khodonov, S.V. Eremin, J.L. Lokshin, V.I. Shvets, O.V. Demina, L.V. Khitrina, A.D. Kaulen, Bioorg. Khim. (Rus), 1996, v. 22, N10-11, p.745-776.



**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ СОЗДАНИЯ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РЕГУЛИРУЕМОЙ ГИДРОФИЛЬНОСТИ/ГИДРОФОБНОСТИ НА ПРИМЕРЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИРОДНЫХ ХЛОРИНОВ С ПЕРВИЧНЫМИ АЛИФАТИЧЕСКИМИ АМИНАМИ**

Ларкина Е.А.<sup>а</sup>, Лохматов А.В.<sup>а</sup>, Ткачевская Е.П.<sup>а</sup>, Семерня Л.Г.<sup>а</sup>, Мачнева Т.В.<sup>б</sup>, Осипов А.Н.<sup>б</sup>

<sup>а</sup> Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,  
e-mail: larisas.05@mail.ru

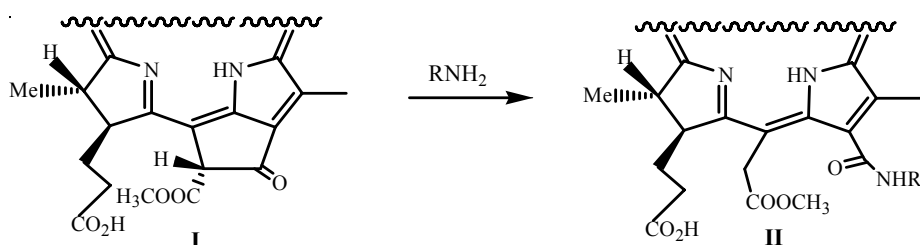
<sup>б</sup> Российский государственный медицинский университет,  
Москва, Россия

В последние годы тетрапиррольные соединения (природного и синтетического происхождения) являются предметом фундаментальных исследований в области биоорганической химии, медицины, техники и технологии в связи с их активностью в качестве фотосенсибилизаторов.

Наши первоначальные исследования были связаны с воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения на заживление ран у крыс в присутствии фотосенсибилизаторов феофорбида *a* и протопорфирина IX. Было обнаружено, что введение этих фотосенсибилизаторов в дозе 3 мг/кг с последующим облучением лазером приводило, во-первых, к снижению количества и активности лейкоцитов и, во-вторых, к сильному уменьшению активности супероксиддисмутазы по сравнению с аналогичными показателями у крыс, не получавших фотосенсибилизатор. Кроме того, было обнаружено, что как феофорбид *a*, так и протопорфин IX примерно одинаково ускоряют заживление ран. Это может быть связано с генерацией ими активных форм кислорода. Присутствие фотосенсибилизатора не оказывало заметного влияния на общую продолжительность заживления ран, хотя и несколько сокращало воспалительную стадию.

В соответствии с этими результатами представляется интересным провести химическую модификацию феофорбида. Для новых производных путём изменения заместителей, соответственно, введением алифатических групп с различной длиной цепи, можно регулируемым образом усилить липофильность фотосенсибилизатора. Известно, что возрастание гидрофобности фотосенсибилизатора может, например, увеличить степень подавления роста микроорганизмов или усилить инсектицидную эффективность.

Посредством раскрытия экзоцикла в молекуле природного хлорина – феофорбида *a* (I) при действии амина (см. нижеприведённую схему), были синтезированы различные биологически активные амидные производные.



Жирные амины с алкильными цепями различной длины (от бутиламина до октадециламина) использовали в качестве нуклеофила в реакции нуклеофильного замещения, приводящей к получению гидрофобных производных хлорина *e*<sub>6</sub> (II). Показано влияние структуры первичного алифатического амина и условий (растворитель, присутствие третичного амина и время реакции) проведения реакции его с феофорбидом *a* и метиловым эфиром феофорбида *a* на выход конечного продукта - хлорина *e*<sub>6</sub>-13-алкиламида.

Все полученные хлорин *e*<sub>6</sub>-13-алкиламида были активны в качестве фотосенсибилизаторов в модельных системах молекулярного, клеточного уровня и на животных в соответствии с их структурными и физико-химическими свойствами.

*Исследование частично поддержано грантом № 2.1.1/2889 целевой ведомственной программы «Развитие научного потенциала высшей школы».*



**DEVELOPMENT APPROACH TOWARDS PRODUCTION OF TETRAPYRROLIC PHOTOSENSITIZERS WITH ADJUSTABLE HYDROPHILIC/HYDROPHOBIC PROPERTY IN TERMS OF INTERACTIONS OF NATURAL CHLORINS WITH PRIMARY ALIPHATIC AMINES**

Larkina E.A.<sup>a</sup>, Lokhmatov A.V.<sup>a</sup>, Tkachevskaya E.P.<sup>a</sup>, Semernya L.G.<sup>a</sup>, Machneva T.V.<sup>b</sup>, Osipov A.N.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russian Federation,  
e-mail: larisas.05@mail.ru

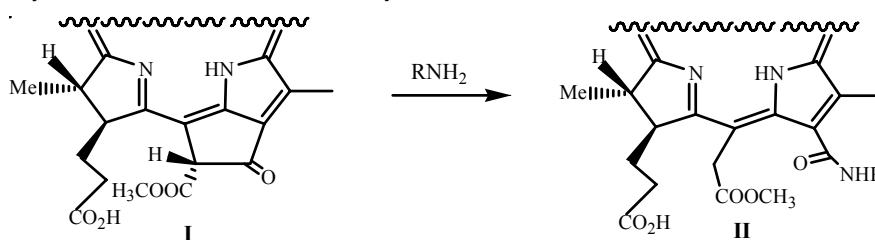
<sup>b</sup>Russian State Medical University, Moscow, Russian Federation

Tetrapyrrolic compounds (natural and synthetic origin) have been essential to the study of biomimetic chemistry, medicine and technology in recent years, because of these compounds are active as photosensitizers.

Our initial study is related to low-intensity laser radiation exposure on rats dermaric wound repair development in the presence of pheophorbide *a*, and protoporphyrin IX photosensitizers. It was revealed that administration of these photosensitizers in dose of 3 mg/kg with subsequent laser irradiation firstly led to activity decrease and quantity reduction of leukocytes and secondly, it led to high activity decrease of superoxide dismutase comparing to similar figure with rats that didn't get any photosensitizer. Above all, it was revealed that pheophorbide *a* as well as protoporphyrin IX are much the same in wound repair acceleration. This process may involve their generation of reactive oxygen species. The presence of photosensitizer didn't have much impact on total wound repair time, although it reduced inflammatory stage.

Pursuant to such results it appears to be interesting to accomplish the chemical modification of pheophorbide. New derivatives could be extended by varying the substituents, accordingly the introduction of aliphatic groups with various chain lengths could enhance the photosensitizer's lipophilicity adjustable. It is known that the increasing of photosensitizer's hydrophobicity may for example enhance the degree of the growth inhibition for microorganisms or increase insecticidal efficiency.

By using natural chlorin – pheophorbide *a* (**I**) exo ring cleavage by amine action (see following scheme), various biologically active amide derivatives were synthesized.



Fatty amines with various alkyl chain length (from butylamine to octadecylamine) were used in nucleophilic substitution reaction as amine that allowed to obtain hydrophobic derivatives of chlorin *e*<sub>6</sub> (**II**). The effect of primary aliphatic amine structure and of conditions during it's reaction with pheophorbide *a* and methylpheophorbide *a* (solvent, the presence of tertiary amine and the reaction time) on the yield of the end product – chlorine *e*<sub>6</sub>-13-alkylamide is displayed.

All obtained chlorine *e*<sub>6</sub>-13-alkylamides were active as photosensitizers in molecular, cell and animal modelling systems stand in one-to-one correspondence with their structural and physic-chemical properties.

*The research was supported in part by the grant № 2.1.1/2889 of special programm «Development of scientific potential of high education».*



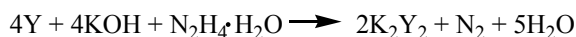
## НАПРАВЛЕННЫЙ СИНТЕЗ ХАЛЬКОГЕНПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦЕРИНА

Леванова Е.П., Земирова И.А., Грабельных В.А., Руссавская Н.В., Корчевин Н.А.

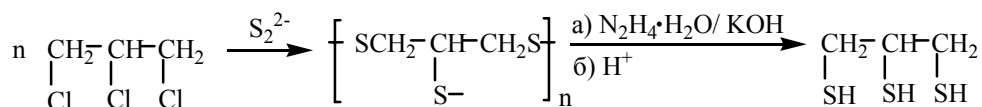
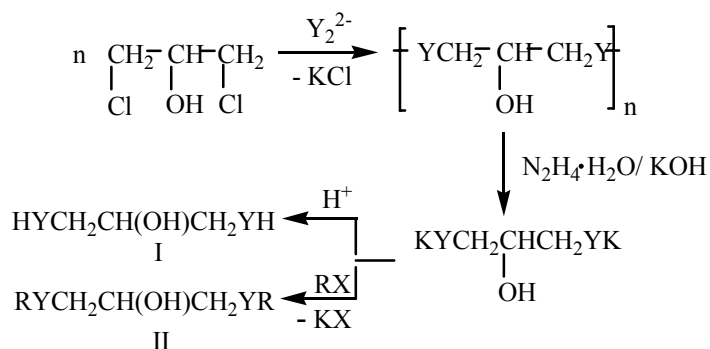
Иркутский институт химии имени А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук,  
Иркутск Россия  
e-mail: venk@irioc.irk.ru

Глицерин играет важную роль в биохимических процессах. Замена одной или нескольких групп OH в молекуле глицерина на группировки, содержащие атомы халькогена (SH, SeH, SR, SeR, TeR, где R – органический радикал), дает широкий круг халькогенпроизводных глицерина. В литературе описано использование дитиоглицеринов в качестве лекарственных препаратов – антидотов при отравлении соединениями мышьяка, ртути и некоторыми другими тяжелыми металлами [1]. Для 1,3-метилселанильных производных глицерина обнаружена акарицидная активность (включая нокаун – эффект) по отношению к клещам *Ixodes persulcatus* [2]. Расширение сферы биологического применения производных халькогенглицеринов сдерживается отсутствием простых препаративных методов их получения.

Нами рассмотрены возможности синтеза халькогенглицеринов, исходя из галогенпроизводных пропана и галогенпропанолов, элементарных халькогенов и системы гидразингидрат-основание. Методы включают получение дихалькогенидных олигомеров и их последующее восстановительное расщепление. Например:



Y=S, Se



Методы подобного типа дают выходы на соответствующие халькогенолы (I) или на их алкильные производные (II). Обсуждается влияние структуры исходных реагентов, характера халькогена Y, основности среды на селективность рассматриваемых процессов.

При использовании 1,2,3-трихлорпропана олигомерные продукты образуются только в случае серы. На основе полученного олигомера синтезирован тритиоглицерин. В случае селена и теллура олигомерные продукты из трихлорпропана не образуются. Обсуждаются возможные направления протекающих реакций.

### Литература:

1. А.Д. Гарновский, А.П. Садименко, О.А. Осипов, Г.В. Цинцадзе. Жестко-мягкие взаимодействия в координационной химии. Изд-во Ростовского ун-та. Ростов-на Дону. 1986. 272 с.
2. Д.А. Козлова, Г.Г. Левковская, Е.В. Рудякова, А.В. Елаев, Л.П. Базанова, А.Я. Никитин. Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Синантропизация растений и животных». Иркутск. 2007. С. 259-261.



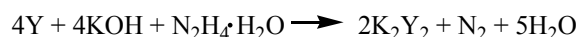
### DIRECT SYNTHESIS OF CHALCOGEN DERIVATIVES OF GLYCEROL

Levanova E.P., Zemirova I.A., Grabelnykh V.A., Russavskaya N.V., Korchevin N.A.

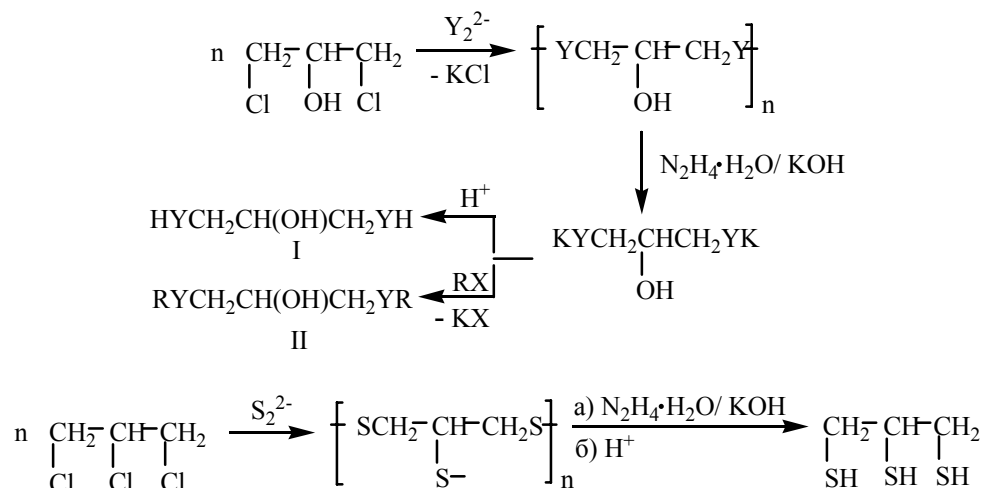
A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia  
e-mail: venk@iirioch.irk.ru

Glycerol is of paramount importance in biochemical processes. The substitution of one or more OH group in glycerol molecule for the moieties bearing chalcogen atoms (SH, SeH, SR, SeR, TeR, where R is an organic radical) affords a variety of chalcogen derivatives of glycerol. It has been reported the application of dithioglycerols as antidotes against poisoning with compounds of arsenic, mercury and some other heavy metals [1]. It has been found that 1,3-methylselenanyl derivatives of glycerol exhibit acaricide activity (including knock-down effect) with respect to ticks *Ixodes persulcatus* [2]. Further expanding the sphere of biological application of chalcogen glycerol derivatives is restrained due to the absence of feasible protocols of these compounds synthesis.

In the present work, we have studied the possibilities of synthesis of chalcogen glycerols starting from halogen derivatives of propane and halogen propanols, elemental chalcogenes in the system hydrazine hydrate – base. The methods involve the preparation of dichalcogenide oligomers followed by their reductive cleavage. For example:



Y=S, Se



The methods proposed provide an access to the corresponding chalcogenols (I) or to their alkyl derivatives (II). The effects of the initial reactants structure, chalcogen Y nature and medium basicity on selectivity of the processes studied are discussed.

When 1,2,3-trichloropropane is used in the reaction, the oligomer products are formed only in the case of sulfur. Trithioglycerol has been synthesized on the basis of oligomer obtained. In the case of selenium and tellurium, the oligomer products are not obtained from trichloropropane. Probable directions of the reactions studied are also discussed.

#### References:

1. A.D. Garnovsky, A.P. Sadimenko, O.A. Osipov, G.V. Tsintsadze. Rough and mild interactions in coordination chemistry. Rostov-na-Donu: Rostov University. 1986. 272 pp. (In Russian)
2. D.A. Kozlova, G.G. Levkovskaya, E.V. Rudyakova, A.V. Elaev, L.P. Bazanova, A.Ya. Nikitin. Proceedings of the International conference «Sinantropization of plants and animals». Irkutsk. 2007. P. 259-261.





## **О СОЗДАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СЫВОРОТКИ КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

*Липина О.В., Прокопюк О.С., Чижевский В.В., Мусатова И.Б., Фалько О.В.*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ГП "Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины", Харьков, Украина  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Кордовая кровь человека представляет собою уникальную субстанцию, так как содержит широкий спектр биологически активных соединений и по своему составу отличается от крови взрослых. Во время беременности синтезируется плацентой и попадает в кордовую кровь целый ряд биологически активных соединений. Сыворотка кордовой крови человека (СККЧ) содержит репродуктивные гормоны (хорионический гонадотропин, плацентарный лактоген, пролактин и др.), структурные аналоги нейропептидов головного мозга (главным образом эндорфины и энкефалины), ряд цитокинов, в частности интерлейкины и интерфероны, факторы роста и антипролиферативные факторы, гемопозитины и адаптогены, ферменты, микроэлементы, витамины. Сохранить биологически активные соединения и их исходное физиологическое соотношение позволяет низкотемпературное консервирование.

Проведенные научные исследования по изучению влияния режимов замораживания и низкотемпературного хранения позволили определить оптимальные условия криоконсервирования СККЧ и ее длительного хранения

(в морозильной камере при температуре – 20°C - на протяжении 6 месяцев, в жидком азоте при – 196°C - до 15 лет и больше).

Эти разработки, а также стерильное получение кордовой крови и выделение сыворотки кордовой крови с учетом ее особенностей, обследование на стерильность и отсутствие возбудителей инфекционных заболеваний были положены в основу криобиотехнологии создания биологически активного препарата сыворотки кордовой крови – "Криоцелл-Криокорд".

Проведенные эксперименты по исследованию возможности применения "Криокорда" для повышения устойчивости теплокровного организма к общему глубокому охлаждению выявили высокую эффективность этого препарата.

Доклинические испытания "Криокорда" показали, что его применение способствует нормализации иммунобиологического и эндокринного статуса, стимуляции кроветворения и процессов репарации, обеспечивает антигипоксическое и противовоспалительное действие. Клинические исследования выявили высокую эффективность "Криокорда" при лечении хронических воспалительных заболеваний и нарушений гормонального баланса, при иммунологическом дефиците и половых расстройствах, в комплексном лечении наркозависимости и в терапии других заболеваний.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### ABOUT DESIGNING OF BIOLOGICALLY ACTIVE PREPARATION ON HUMAN CORD BLOOD SERUM BASE

*Lipina O.V., Prokopyuk O.S., Chizhevsky V.V., Musatova I.B., Falko O.V.*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov  
State Enterprise "Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences,  
Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine", Kharkov, Ukraine  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Human cord blood is the unique substance, because of the content of a wide spectrum of biologically active compounds and is different by its composition from adult blood. Some biologically active compounds are synthesised by placenta and come into cord blood during pregnancy. Human cord blood serum (HCBS) contains reproductive hormones (chorionic gonadotropin, placental lactogen, prolactin etc.), structural analogues of brain neuropeptides (mostly endorphins and enkephalines), some cytokines, particularly interleukines and interferons, growth factors and anti-proliferative factors, hemopoietins and adaptogens, enzymes, microelements, vitamins. Low temperature preservation enables to preserve biologically active compounds and their initial physiological ratio.

The performed research on studying the effect of freezing and low temperature storage regimens allowed to determine the optimal conditions for HCBS cryopreservation and its long-term storage (for 6 months in freezing chamber at  $-20^{\circ}\text{C}$ , up to 15 years and more at  $-196^{\circ}\text{C}$  in a liquid nitrogen).

These findings, as well as a sterile procurement of cord blood and its serum isolation, taking into account its peculiarities, the examination for sterility and infectious agent absence were taken as the basis of cryobiotechnology for creating biologically active preparation of cord blood serum: "Cryocell-Cryocord".

The research performed on studying the possibility of "Cryocord" application for increasing the homoiothermal organism resistance to general deep cooling revealed this preparation high efficiency.

The "Cryocord" pre-clinical trials have demonstrated its application as contributing to immune-biological and endocrine status normalization, hemopoiesis and reparative process stimulation, providing the anti-hypoxic and anti-inflammatory effects. Clinical research revealed the "Cryocord" high efficiency when treating chronic inflammatory diseases and hormonal balance disorders, under immunological deficiency and sexual disorders, in a combined treatment of drug addiction and therapy of other diseases.



## СИНТЕЗ И АНТИДИАБЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЧАСТИЧНО ГИДРИРОВАННЫХ АЗОЛОАЗИНОВ

*Липсон В.В., Полторац В.В., Карножицкая Т.М., Бородина В.В., Широбокова М.Г., Светличная Н.В., Красова Н.С., Гладких А.И., Федорова А.В., Лещенко Ж.А., Тыжненко Т.В., Почерняев А.К.*

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины», Харьков, Украина  
e-mail: lipson@ukr.net

Эпидемический характер роста распространенности сахарного диабета (СД) 2 типа и ассоциированная с ним повышенная частота сердечно-сосудистой патологии и смертности обуславливает острую необходимость превентивной и реабилитационной патогенетически обоснованной терапии. Общеизвестно, что причиной развития СД 2 типа является инсулинорезистентность тканей и прогрессирующая дисфункция *бета*-клеток поджелудочной железы, обусловленные глюко- и липотоксичностью, оксидативным стрессом, амилоидом, повышенной секрецией провоспалительных (адипо)цитокинов и усиленным апоптозом. Следовательно, фармакологическую коррекцию СД 2 типа нельзя акцентировать только на снижении глюкозы крови и/или инсулинорезистентности. Возникает необходимость в разработке новых лекарственных средств с сочетанным (плейотропным) эффектом, способных обеспечить нормализацию глюкозного гомеостаза, снизить ассоциированный с дисгликемией и инсулинорезистентностью риск развития сердечно-сосудистых осложнений и затормозить спонтанную эволюцию инсулиновой недостаточности. Цель: выявить среди частично гидрированных азолопиримидинов, -пиримидинов и продуктов их химической модификации соединения с сахароснижающим действием, которые повышают чувствительность к инсулину и способность панкреатических *бета*-клеток к выживанию. Разработаны методы синтеза азолов и азолоазиннов с амидиновым или аминогуанидиновым фрагментом, которые основаны на реакциях  $\alpha$ -аминоазолов с непредельными карбонильными 1,3-бизэлектрофилами, их синтетическими предшественниками или эквивалентами и позволяют создавать комбинаторные и фокусные библиотеки биологически активных веществ<sup>1,2</sup>. Скрининг большого массива таких соединений по показателям антиоксидантной, гипогликемической и противовоспалительной активности и низкой токсичности определил перспективность расширенного изучения антидиабетических свойств производных 3-арил-3-(2H-1,2,4-триазол-3-ил)пропионовой кислоты<sup>3,4</sup>, тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазол-2-онов<sup>5,6</sup>, 2-метилсульфанилтетрагидро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-5-онов<sup>7</sup>. В настоящее время нами накоплен значительный экспериментальный материал относительно специфического антидиабетического действия тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазол-2-онов. На лабораторных животных (мыши, крысы, кролики) с использованием моделей, воспроизводящих разные патогенетические звенья СД 2 типа, было установлено, что применение 4-фенилпроизводного (2501) из указанного ряда (50 мг/кг, per os) тормозит метаболические проявления инсулиновой недостаточности, повышает чувствительность печени и периферических тканей к инсулину, улучшает показатели углеводного и липидного обмена, снижает оксидативный стресс и проатерогенные процессы. Доказано положительное воздействие длительного применения 2501 на общую выживаемость клеток печени и поджелудочной железы кроликов с дитизоновым диабетом, оцененную по торможению обусловленного СД апоптоза. Гистологические исследования свидетельствуют о выраженных панкреотропных свойствах вещества 2501 и его восстановительно-стимулирующем эффекте на инсулинпродуцирующий аппарат поджелудочной железы крыс с СД 2 типа и кроликов с дитизоновым диабетом.

### Литература:

1. Пат. 58768 А UA;<sup>2</sup>
2. Пат. 17943 UA;<sup>3</sup>
3. Пат. 43676 А UA;<sup>4</sup>
4. Diabetologia, 2001, Vol.44, Suppl. 1, P.A226;<sup>5</sup>
5. Пат. 30964 UA;
6. Diabetologia, 2007, Vol.50, Suppl. 1, P.S374;<sup>7</sup>
7. Пат. 68302 А UA



**SYNTHESIS AND ANTIDIABETIC PROPERTIES OF PARTIALLY HYDROGENATED AZOLOAZINES**

*Lipson V., Poltorak V., Karnozhitskaya T., Borodina V., Shirobokova M., Svitlichna N., Krasova N., Gladkih A., Fedorova G., Leshchenko Z., Tyzhnenko T., Pochernyaev A.*

SI "V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of AMS of Ukraine", Kharkiv, Ukraine  
e-mail: lipson@ukr.net

Prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2D) and high frequency associated cardiovascular morbidity and mortality cause necessity of preventive and pathogenically grounded therapy. Insulin resistance and pancreatic beta-cell dysfunction caused by gluco- and lipotoxicity, oxidative stress, amyloid, pro-inflammatory (adipo)cytokines, and intensive apoptosis, are the hallmark of T2D. Consequently, pharmacotherapy of T2D have include not only hypoglycemic agents and insulin sensitizers, but also new drugs with complex effect for glucose homeostasis normalization, dyslipidaemia and insulin resistance associated cardiovascular risk decrease, and insulin insufficiency delay. Aim: to reveal among the partially hydrogenated azolopyridines, -pyrimidines and products of their chemical modification substances with hypoglycemic activity, which increase insulin sensitivity and ability of the beta-cells to survive. The synthetic methods leading to azoles and azoloazines with amidine or aminoguanidine fragments in the structure have been elaborated. These methods are based on the  $\alpha$ -amino-azoles' reactions with unsaturated carbonyl 1,3-bielectrophyles, their synthetic precursors or equivalents and allowed to create combinatorial and focus libraries of biologically active compounds. Such compounds large massifs screening by the index of low toxicity, antioxidant, hypoglycemic, and anti-inflammatory activity determined the perspectives of wide research of the antidiabetic properties of 3-aryl-3-(2*H*-1,2,4-triazol-3-yl)proprionic acid derivatives, tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-2-ones, 2-methylsulfanyltetrahydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine-5-ones. We have got a lot of experimental data about specific antidiabetic properties of tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-2-ones. Using mice, rats and rabbits with different models of experimental diabetes, it was revealed, that supplementation of 4-phenyl derivative 2501 (50 mg/kg, per os) reduced insulin insufficiency, increased in insulin sensitivity of liver and peripheral tissues, improved glucose and lipid metabolism parameters, decreased in oxidative stress and pro-atherogenic process. Our data have shown the positive effect of long-term supplementation of substance 2501 on liver and pancreas cell surviving assessed by decreasing in diabetes-induced apoptosis in rabbits with dithizone diabetes. Histological researches suggest restoring impact of 2501 on pancreas of the rats with T2D and rabbits with dithizone diabetes.

**References:**

1. Patent 58768 A UA;<sup>2</sup>
2. Patent 17943 UA;<sup>3</sup>
3. Patent 43676 A UA;<sup>4</sup>
4. Diabetologia, 2001, Vol.44, Suppl. 1, P.A226;<sup>5</sup>
5. Patent 30964 UA;
6. Diabetologia, 2007, Vol.50, Suppl. 1, P.S374;<sup>7</sup>
7. Patent 68302 A UA



## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 5-АМИНО-ЭКЗО-3-АЗАТРИЦИКЛО[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]ДЕКАН-4-ОНА

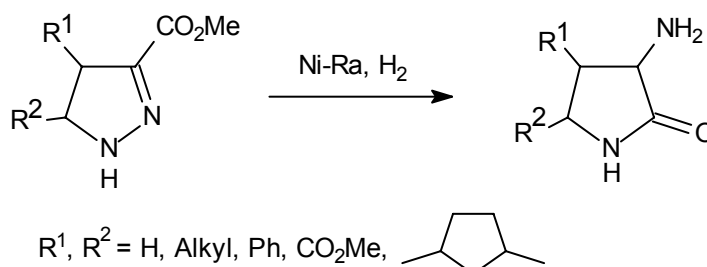
Ложкин<sup>а</sup> С.С., Габдрахманова<sup>а</sup> С.Ф., Петров<sup>а</sup> Д.В., Докичев<sup>а</sup> В.А., Томилов<sup>б</sup> Ю.В., Нефедов<sup>б</sup> О.М.

<sup>а</sup>УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: dokichev@anrb.ru

<sup>б</sup>Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва, Россия  
e-mail: tom@ioc.ac.ru

Наличие в молекуле многих природных и синтетических соединений пирролидинового цикла обуславливает широкий спектр их биологической активности. Гидрирование пиразолинов является удобным методом получения 1,3-пропилендиаминов, которые при наличии сложноэфирной группы или лактонного цикла превращаются в пирролидин-2-оны, находящие применение в синтезе производных пирролидина и аналогов  $\gamma$ -аминомасляной кислоты - основного ингибитора нейротрансмиттера в центральной нервной системе млекопитающих.

В продолжение наших исследований в области химии азотистых гетероциклов в настоящей работе изучено восстановление ряда замещенных пиразолинов.



В результате поиска оптимальных условий реакции установлено, что из способов, нашедших широкое применение для восстановления связей C=N и N=N, ( $H_2$ -никель Ренея,  $H_2$ -Pd/C,  $H_2$ -PtO<sub>2</sub>,  $H_2$ -Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, Na-*n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-*i*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH-KOH, Cu(acac)<sub>2</sub>-NaBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>) наиболее эффективным является гидрирование водородом в присутствии никеля Ренея в метаноле (100°C, давление H<sub>2</sub> 7.1 МПа, 5 ч), приводящее к образованию 3-аминопирролидонов с высокими выходами (87-99%). Гидрирование на никеле Ренея метилового эфира 1*H*-пиразолин-3-карбоновой кислоты, а также его 4-фенил- и 5-метоксикарбонилзамещенных аналогов, приводит соответственно к 3-аминопирролидин-2-ону, его 4-фенил- и 5-метоксикарбонилпроизводным, преимущественно в виде *транс*-изомеров. В тех же условиях 3,4-ди(метоксикарбонил)-1*H*-пиразолин дает 1-амино-4-метоксикарбонилпирролидин-2-он, а 3,4,5-три(метоксикарбонил)-1*H*-пиразолин в реакцию не вступает. На примере гидрирования метилового эфира экзо-3,4-дiazатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]дец-4-ен-5-карбоновой кислоты с помощью программы Gaussian 98 проведен анализ наиболее вероятных маршрутов образования *транс*- и *цис*-изомеров 3-аминопирролидин-2-она, а также квантово-химические расчеты стандартных энтальпий и относительных энергий наиболее устойчивых конформеров.

В ряду синтезированных азотистых гетероциклов найдено соединение - 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он, в виде смеси *транс*- и *цис*-изомеров в соотношении 2,6:1, которое проявляет высокую противовоспалительную, анальгетическую, ноотропную и антиаритмическую активность (ED<sub>50</sub> = 0.28 мг/кг аконитиновая аритмия, LD<sub>50</sub> = 680 мг/кг) и по эффективности превосходит применяемые в настоящее время антиаритмические препараты [1]. Необходимо отметить, что *транс*-изомер является более токсичным (LD<sub>50</sub> = 352 мг/кг) и не обладает антиаритмической активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения химии и наук о материалах РАН «Теоретическое и экспериментальное изучение природы химической связи и механизмов важнейших химических реакций и процессов» и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

### Литература:

1. Д. В. Петров, В. А. Горпинченко, Е. А. Шафикова, Ф. С. Зарудий, Н. Ж. Басченко, Р. Ю. Хисамутдинова, Н. С. Макара, В. А. Вахитов, Ю. В. Вахитова, Чжан Вейму, Р. И. Алимбеков, В. А. Докичев, Ю. В.Томилов, О. М. Нефёдов, Пат. РФ 2281938; Б.И., № 23 (2006).



**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 5-AMINO-EXO-3-AZATRICYCLO[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]DECAN-4-ONE**

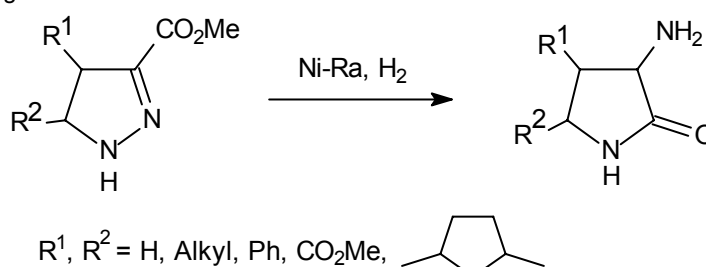
Lozhkin<sup>a</sup> S.S., Gabdrahmanova<sup>a</sup> S.F., Petrov<sup>a</sup> D.V., Dokichev<sup>a</sup> V.A.,  
Tomilov<sup>b</sup> Yu.V., Nefedov O.M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institution of the RAS Institute of Organic Chemistry of Ufa Scientific Centre of the RAS, Ufa, Russia  
e-mail: dokichev@anrb.ru

<sup>b</sup>N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia  
e-mail: tom@ioc.ac.ru

The presence pyrrolidine cycle in a molecule of many natural and synthetic compounds conditions a wide spectrum of their biological activity. The hydrogenation of pyrazolines is a convenient method of the production of 1,3 –propylendiamines, which in the presence of an ester group or lacton cycle transform into pyrrolidin-2-ones. The latter are used for the synthesis of the derivatives of pyrrolidine and analogs of  $\gamma$ -aminobutyric acid – being a main inhibitor of neurotransmitter in central nervous system of mammalian.

To continue our studies of chemistry of nitrogen heterocycles the reduction of a series of substituted pyrazolines was investigated.



It was found, that among the methods widely used for the reduction of C=N and N=N-bonds ( $H_2$ -Raney nickel,  $H_2$ -Pd/C,  $H_2$ -PtO<sub>2</sub>,  $H_2$ -Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, Na-*n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-*i*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH-KOH, Cu(acac)<sub>2</sub>-NaBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>) the hydrogenation with hydrogen in the presence of Raney nickel in methanol (100°C, pressure  $H_2$  7.1 MPa, 5 h) to produce 3-aminopyrrolidines in high yields (87-99%) is the most effective. The hydrogenation of 1*H*-pyrazoline-3-carboxylic acid methyl ester as well as its 4-phenyl- and 5-methoxycarbonylsubstituted analogs on Raney nickel leads correspondingly to 3-aminopyrrolidin-2-one, its 4-phenyl- and 5-methoxycarbonylderivatives, mainly to *trans*-isomers. Under the same conditions 1-amino-4-methoxycarbonylpyrrolidin-2-one was obtained from 3,4-di(methoxycarbonyl)-1*H*-pyrazoline, but 3,4,5-tri(methoxycarbonyl)-1*H*-pyrazoline does not react. On the sample of the hydrogenation of *exo*-3,4-diazatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-4-en-5-carboxylic acid methyl ester using a Gaussian program 98 an analysis of the possible routs of the formation of *trans*- and *cis*-isomers of 3-aminopyrrolidin-2-one and quantum-chemical calculations of standard enthalpies and relative energies of the most stable conformers was carried out.

Among nitrogen heterocycles the compound 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one was revealed, which shows a high anti-inflammatory, analgetic, nootropic and antiarrhythmic activity (ED<sub>50</sub> = 0.28 mg/kg arrhythmia induced with aconitine, LD<sub>50</sub> = 680 mg/kg) and its effectiveness exceeds antiarrhythmic preparation used at present [1]. It should be noted, that *trans*-5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on is more toxic (LD<sub>50</sub> = 352 mg/kg) and does not possess an antiarrhythmic activity.

*This work was financially supported by the Presidium of the Russian Academy of Sciences (Program for Basic Research «Fundamental science to medicine» and «Theoretical and experimental researching of nature chemical bond and mechanisms of major chemical reactions and processes»).*

**References:**

1. D. V. Petrov, V. A. Gorpinchenko, E. A. Shafikova, F. S. Zarudii, N. Zh. Baschenko, R. Yu. Khisamutdinova, N. S. Makara, V. A. Vahitov, Yu. V. Vahitova, Zhang Weimu, R. I. Alimbekov, V. A. Dokichev, Yu. V. Tomilov, O. M. Nefedov, Pat. RF 2281938; B.I., № 23 (2006).



## ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ *SHIGELLA* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТЕКТИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Львов В.Л.,<sup>1</sup> Шехт М.А.,<sup>1</sup> Маркина А.А.,<sup>1</sup> Ледов В.А.,<sup>1</sup> Головина М.Э.,<sup>1</sup> Анкудинов И.В.,<sup>1</sup> Апарин П.Г.,<sup>1</sup> Кондакова А.Н.,<sup>2</sup> Перепелов А.В.,<sup>2</sup> Книрель Ю.А.

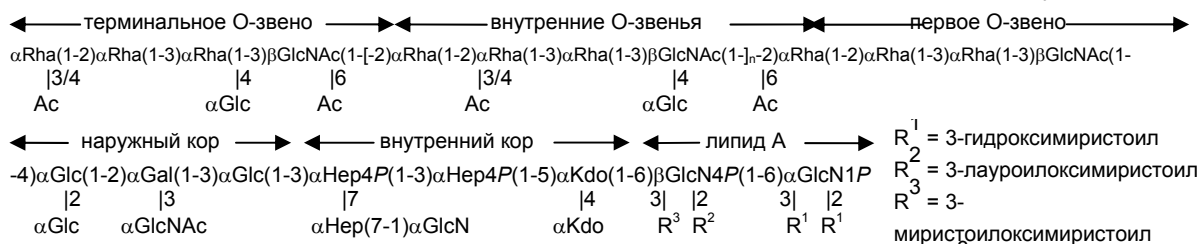
<sup>1</sup>ООО «Гритвак», Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

e-mail: yknirel@gmail.com

Бактерии рода *Shigella* вызывают острое кишечное заболевание шигеллез (бактериальную дизентерию). Профилактика шигеллеза является актуальной проблемой как в индустриально развитых, так и в развивающихся странах, однако до последнего времени вакцинные противошигеллезные препараты отсутствовали. Иммуноспецифичность штаммов *Shigella* определяется О-специфическим полисахаридом (ОПС), построенным из повторяющихся олигосахаридных единиц (О-звеньев). Он входит в состав липополисахарида (ЛПС), расположенного на поверхности бактериальной клетки и являющегося главным углеводным антигеном (О-антигеном) и эндотоксином. Иммунизация ЛПС вызывает в макроорганизме индукцию специфических протективных антител. Однако использованию интактного ЛПС в качестве вакцинного препарата препятствует его высокая пирогенность и токсичность, обусловленные липидной частью ЛПС (липидом А). Для создания эффективных профилактических препаратов нами использован подход, основанный на химической модификации ЛПС для снижения его эндотоксичности без существенного ухудшения протективных свойств.

С помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения мы установили полную структуру ЛПС *S. flexneri* типа 2a – одного из наиболее распространенных возбудителей шигеллеза в России и во всем мире. Он включает ОПС, олигосахаридный кор (наружный и внутренний) и липид А (в основном гексаацильный, а также тетраацильный, лишенный одной из ацилоксиацильных групп):



При фракционировании ЛПС с помощью гель-хроматографии с высоким разрешением выделена фракция высокомолекулярного ЛПС, который по данным гель-электрофореза содержал ОПС, включающий 10-30 О-звеньев. Направленная химическая модификация полученного таким образом пирогенного высокомолекулярного ЛПС привела к низкотоксичному препарату (мЛПС), который при полном сохранении серологической активности обладал пирогенностью на уровне коммерческих полисахаридных вакцин. При иммунизации мышей мЛПС индуцировал высокий уровень специфических иммуноглобулинов классов М и G. Он обеспечивал 70%-ную защиту морских свинок в кератоконъюнктивальном тесте (иммунизация животных мЛПС с последующим нанесением живой культуры с интервалом в две недели на роговицу глаза). Это свидетельствовало о появлении на слизистой индуцированных специфических протективных иммуноглобулинов класса А. В настоящее время проводятся доклинические испытания препарата мЛПС из *S. flexneri* типа 2a.

Аналогичный подход использован при разработке протективных препаратов на основе ЛПС из *Shigella sonnei*, фаза 1. В этом случае наряду с высокомолекулярным мЛПС исследовалась фракция низкомолекулярного мЛПС, содержащего короткий ОПС (1-3 О-звена) или вообще лишенного ОПС. Протективные характеристики высокоиммуногенных образцов мЛПС из *S. sonnei* изучаются в кератоконъюнктивальном тесте.

Интересные результаты получены при исследовании выживаемости мышей, иммунизированных мЛПС *S. sonnei*, в экспериментальной модели эндотоксического шока. Известно, что при попадании в макроорганизм интактный ЛПС через Toll-подобный рецептор TLR4 индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов, при избыточной продукции которых наступают серьезные патологические последствия – септический или эндотоксический шок. При иммунизации мышей мЛПС *S. sonnei*, фаза 1 с последующим введением 4 LD<sub>100</sub> эндотоксина *Escherichia coli* O55 выживаемость составила 40-80% при отчетливо выраженной дозовой зависимости. Выживаемость 80-100% наблюдалась при использовании «D-галактозаминовой» модели, в рамках которой чувствительность животных к эндотоксину повышается более чем в 100 000 раз. Полученные данные показывают, что мЛПС *S. sonnei* может выступать в роли антагониста эндотоксического ЛПС, ингибируя его взаимодействие с рецептором TLR4. Таким образом, этот препарат можно рассматривать в качестве прототипа протившоковой вакцины, способной обеспечить защиту без побочных токсических эффектов.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (проект 2008-2-2.2-05-02-005) и Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки молодых российских ученых (проект МК-641.2008.4).



**CHEMICALLY MODIFIED LIPOPOLYSACCHARIDES OF SHIGELLA AS POTENTIAL PROTECTIVE PREPARATIONS**

L'vov V.L.,<sup>1</sup> Shekht M.A.,<sup>1</sup> Markina A.A.,<sup>1</sup> Ledov V.A.,<sup>1</sup> Golovina M.E.,<sup>1</sup> Ankudinov I.V.,<sup>1</sup> Aparin P.G.,<sup>1</sup> Kondakova A.N.,<sup>2</sup> Perepelov A.V.,<sup>2</sup> Knirel<sup>2</sup> Y.A.

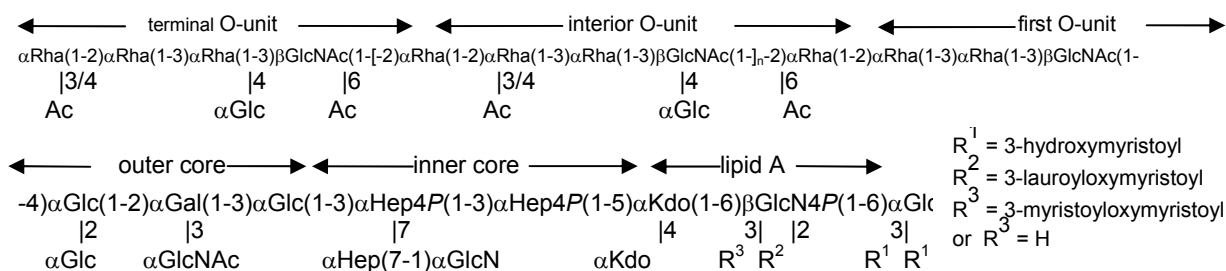
<sup>1</sup>«Gritvak» enterprise, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

e-mail: yknirel@gmail.com

Bacteria *Shigella* cause an acute enteric disease called shigellosis (bacterial dysentery). Prophylaxis of shigellosis is of considerable importance in both developed and developing countries but until recently no vaccine preparations against shigellosis have been elaborated. The immunospecificity of *Shigella* strains is defined by the O-specific polysaccharide (OPS), which is built up of repeating oligosaccharide monomers (O-units). It represents a part of the lipopolysaccharide (LPS), which is located on the cell surface and is the major carbohydrate antigen (O-antigen) and endotoxin. In the macroorganism, immunization with LPS induces production of specific protective antibodies. However, application of the intact LPS as a vaccine preparation is precluded by its high pyrogenicity and toxicity, which are determined by the lipid moiety of LPS called lipid A. Aiming at development of efficient preparations for prophylaxis, we used an approach based on a chemical modification of LPS to reduce its endotoxicity without significant deterioration of the protective properties.

Using NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry, we established the full LPS structure of *S. flexneri* type 2a, one of the most frequent etiologic agent of shigellosis in Russia and worldwide. It includes an OPS, an oligosaccharide core (outer and inner) and lipid A (mainly hexacylated and also tetraacylated lacking one of the acyloxyacyl groups):



Fractionation of the LPS by gel chromatography afforded a high yield of a high-molecular-mass LPS fraction, which, as judged by gel electrophoresis, contains an OPS of 10-30 O-units. A directed chemical modification of the resultant pyrogenic high-molecular-mass LPS resulted in a low-toxic preparation (mLPS), which possessed pyrogenicity at the level of commercial polysaccharide vaccines with the complete retention of the serological activity. Immunization of mice with mLPS induced a high level of specific immunoglobulins M and G. mLPS ensured the 70% protection of guinea pigs in the **keratoconjunctival test** (immunization of animals with mLPS and challenge two weeks after with live *Shigella* culture by inoculation on eye conjunctiva). This finding demonstrated the appearance of the induced specific protective immunoglobulins A on the mucosal surface. At present, a preclinical trial of the mLPS preparation from *S. flexneri* type 2a is conducted.

A similar approach was used in development of protective LPS preparations from *Shigella sonnei* phase 1. In this case, in addition to the high-molecular-mass mLPS, a low-molecular-mass mLPS fraction was investigated, which contained a short OPS of 1-3 O-units or was devoid of any OPS. Protective characteristics of the highly immunogenic mLPS preparations from *S. sonnei* are investigated in the **keratoconjunctival test**.

Interesting results were obtained when the survival of mice immunized with the mLPS from *S. sonnei* was studied in the experimental model of endotoxic shock. It is known that in the macroorganism the intact LPS induces secretion of proinflammatory cytokines by the Toll-like receptor TLR4 signaling pathway, and an excessive production of cytokines results in serious pathologic consequences, including septic or endotoxic shock. After immunization of mice with *S. sonnei* phase 1 mLPS and challenge with 4 LD<sub>100</sub> *Escherichia coli* O55 LPS, 40-80% mice survival rate and dose-dependent protection were registered. In the D-galactosamine model, in which the sensitivity of animals to endotoxin is enhanced by more than six orders of magnitude, the survival of mice was 80-100%. These data show that mLPS from *S. sonnei* may antagonize the endotoxic LPS by inhibition of its interaction with TLR4. Therefore, this preparation can be examined as a prototype anti-shock vaccine capable of ensuring protection without adverse toxic effects.

*This work was supported by the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Fields of Russia's Science and Technology Complex for 2007-2012 (project 2008-2-2.2-05-02-005) and the Council on Grants at the President RF for Support of Young Russian Scientists (project MK-641.2008.4).*





## НОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЦИТОСТАТИКИ РЯДА ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ 3,5-БИС(АРИЛИДЕН)-4-ПИПЕРИДОНОВ

Макаров М.В.,<sup>a</sup> Леонова Е.С.,<sup>a</sup> Рыбалкина Е.Ю.,<sup>b</sup> Тимофеева Т.В.,<sup>c</sup> Одинец<sup>a</sup> И.Л.

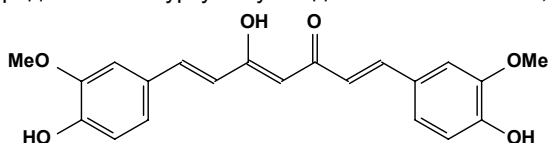
<sup>a</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

<sup>b</sup> Институт канцерогенеза Онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

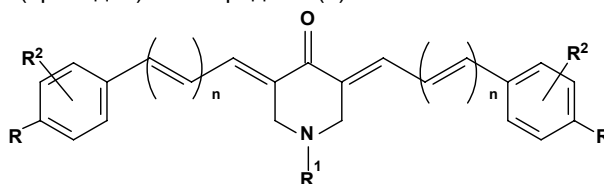
<sup>c</sup> Нью-Мексиканский Хайландский Университет, Лас-Вегас, Нью Мексико, США

e-mail: mihail\_makarov@list.ru

Куркумин (1) – природное биологически активное соединение, обладающее противоопухолевой и антиоксидантной активностью. Множество исследований связано с модификацией его структуры с целью повышения стабильности, повышения биологической активности и расширения спектра возможного применения.<sup>2</sup> Наиболее перспективными кандидатами в поиске новых лекарственных средств среди родственных куркумину соединений являются 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидоны (2).

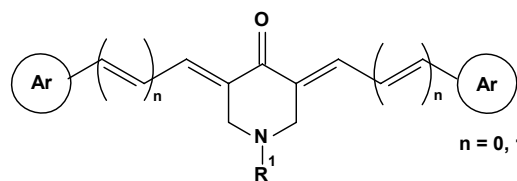


1, Куркумин

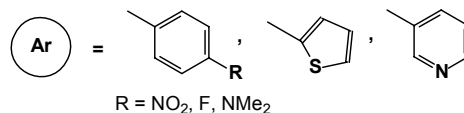


2, R<sup>1</sup> = алкил, ацил, n = 0, 1; R = H, NMe<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>  
R<sup>2</sup> = H, OH

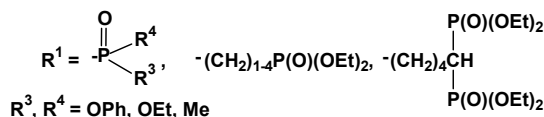
Биологические свойства, в частности цитотоксическую активность, данных соединений можно регулировать либо ведением к атому азота пиперидонового фрагмента различных групп, обладающих собственной биоактивностью, либо варьированием ароматических циклов. Нами также показано, что некоторые 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидоны обладают флуоресцентными свойствами и обнаруживают двухфотонное поглощение, представляя интерес в качестве перспективных кандидатов для фотодинамической терапии.<sup>3,4</sup> Настоящее исследование связано с изучением влияния на биологические свойства данных соединений потенциально биологически активных фосфорсодержащих групп, связанных с пиперидильным атомом азота, а также природы (гетеро)ароматических фрагментов. Соответственно, обсуждаются эффективные подходы к синтезу фосфонатов и бисфосфонатов 3 ряда 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидонов. Исследование цитотоксической активности на раковых клеточных линиях человека (A549, CaOv3, Scov3 и PC3) показало, что фосфорсодержащие соединения 3 действительно обладают большей цитотоксичностью по сравнению с нефосфорилированными аналогами (IC<sub>50</sub> в диапазоне 0.7 – 10 μM). Мы также зафиксировали общую тенденцию: цитотоксичность возрастает с увеличением электроноакцепторных свойств ароматических заместителей, тогда как донорные приводят к появлению флуоресцентных свойств.<sup>3,4</sup> В то же время облучение видимым светом приводит к значительному возрастанию активности пиперидонов 3, содержащих электронодонорные ароматические фрагменты.



n = 0, 1



R = NO<sub>2</sub>, F, NMe<sub>2</sub>



R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = OPh, OEt, Me

Данное исследование демонстрирует значимый потенциал фосфорилированных 3,5-бис(арилиден)-4-пиперидонов для создания противораковых препаратов нового поколения.

Работа поддержана Президентом РФ (грант для поддержки молодых кандидатов наук, проект МК-2464.2008.3) и Программой Отделения химии и наук о материалах РАН.

### Литература:

1. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Ed. Bharat B. Aggarwal et al. в сборнике Advances in Experimental Medicine and Biology. 597, 77-103 (2007).
2. J.R. Dimmock et al. Eur. J. Med. Chem., 42, 71-80 (2007).
3. M.V.Makarov et al. J. Heterocyclic Chem., 45, 729-736 (2008).
4. M.V.Makarov et al. Eur. J. Med. Chem., 44, 2135–2144 (2009).



## NOVEL FLUORESCENT CYTOSTATICS OF PHOSPHORUS-CONTAINING 3,5-BIS(ARYLIDENE)-4-PIPERIDONE SERIES

Makarov M.V.,<sup>a</sup> Leonova E.S.,<sup>a</sup> Rybalkina E.Yu.,<sup>b</sup> Timofeeva T.V.,<sup>c</sup> Odinets<sup>a</sup> I.L.

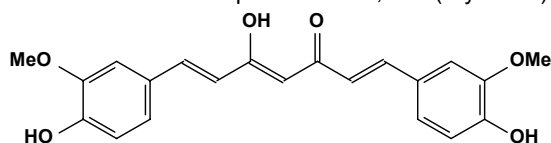
<sup>a</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow, Russia,

<sup>b</sup> Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer research centre RAMS, Moscow, Russia

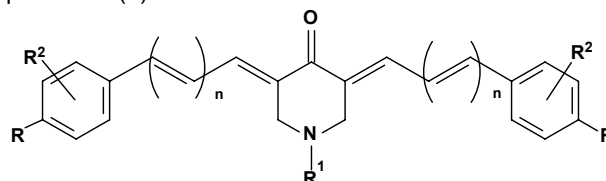
<sup>c</sup> New Mexico Highlands University, Las Vegas, New Mexico, USA

e-mail: mihail\_makarov@list.ru

Curcumin (1) is a naturally occurring biologically active compound possessing a number of valuable properties such as anticancer and antioxidant activities.<sup>1</sup> Many investigations have been targeted towards modification of its structure with the aim of improving stability, enhancing biological activity and extension of spectrum of possible applications.<sup>2</sup> The most prospective candidates for the search of new drugs among curcumin-related compounds are 3,5-bis(arylidene)-4-piperidones (2).



1, Curcumin



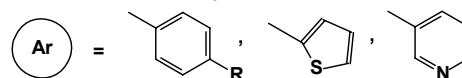
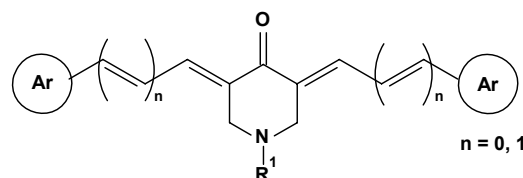
2, R<sup>1</sup> = alkyl, acyl, n = 0, 1; R = H, NMe<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>  
R<sup>2</sup> = H, OH

Biological properties, in particular cytotoxic activity, of these compounds may be adjusted either by insertion of different groups possessing inherent bioactivity to the nitrogen atom of the piperidone moiety or by variation of aromatic rings. Our observations showed also that some 3,5-bis(arylidene)-4-piperidones possess fluorescent properties and reveal two-photon absorption spectra that makes them interesting as promising candidates for photodynamic therapy.<sup>3,4</sup> Therefore, we were motivated to investigate the influence of potentially bioactive phosphorus-containing groups attached to the piperidyl nitrogen atom as well as the nature of (hetero)aromatic moieties on the biological properties of such compounds. Thus, we elaborated facile synthetic approaches to the phosphonates and bisphosphonates **3** of 3,5-bis(arylidene)-4-piperidone series.

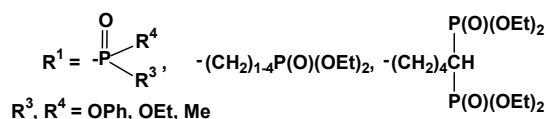
Investigation of cytotoxic activity against human carcinoma cell lines (A549, CaOv3, Scov3, and PC3) has revealed that phosphorus containing compounds **3** do possess higher cytotoxic activity comparing with non-phosphorylated analogues (IC<sub>50</sub> values in the range of 0.7 – 10 μM). We observed also the general tendency: the cytotoxicity increases with the increase of electron withdrawing properties of the aromatic substituents while donor ones resulted in fluorescence properties.<sup>3,4</sup> Moreover, treatment of cell cultures with piperidones **3** comprising electron donating aromatic moieties under visible light irradiation resulted in significant enhancement of the activities.

This study demonstrated the high potential of phosphorylated 3,5-bis(arylidene)-4-piperidones for development of new anticancer drugs.

The financial support of this work by President of Russian Federation (grant for young PhD scientists MK-2464.2008.3) and Program of Chemistry and Material Science Division of RAS is gratefully acknowledged.



R = NO<sub>2</sub>, F, NMe<sub>2</sub>



### References

1. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Ed. Bharat B. Aggarwal et al. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 597, 77-103 (2007).
2. J.R. Dimmock et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 42, 71-80 (2007).
3. M.V.Makarov et al. *J. Heterocyclic Chem.*, 45, 729-736 (2008).
4. M.V.Makarov et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 2135-2144 (2009).



## КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ СПИРАЛЬНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ С АПРОТОННЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

Макшакова О.Н., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А.

Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра РАН, Казань, Россия  
e-mail: makshakova@mail.knc.ru

При разработке полимерных систем фармакологической и диагностической направленности большое значение имеет информация о структуре комплексов полимеров с низкомолекулярными веществами, способными проявлять биологическую активность. Аналогичная информация необходима при разработке средств адресной доставки фармакологических препаратов, аналитических устройств, в которых полимеры используются в качестве носителей и иммобилизаторов сенсорных соединений и других современных приложений.

Устройства на основе полипептидов являются многообещающими, поскольку полипептиды биосовместимы, обладают специфичной биомолекулярной восприимчивостью и способностью к биологическому разложению. Полипептиды идеально подходят для таких приложений, как из-за их биохимической природы, так и ввиду возможности исключительно точного контроля над химической структурой при биотическом синтезе и возможности контроля над формированием вторичной структуры.

Предметом данного исследования было изучение структуры и энергии образования комплексов «спиральный гомополипептид – апротонный органический лиганд» квантово-химическими методами. Поли- $\alpha$ -аланин, поли- $\alpha$ -глутаминовая кислота в протонированной форме и поли- $\gamma$ -бензил- $\alpha$ -глутамат различаются по длине боковых групп, их полярности, способности к образованию водородной связи и др. Наличие вторичной структуры накладывает ограничения на ряд комплексов лигандов с пептидными группами, которые могут образовываться в условиях полной доступности групп остова. Ацетонитрил и диоксан представляют широкий класс апротонных диполярных молекул и могут рассматриваться как модели низкомолекулярных биоактивных веществ. Результаты могут быть экстраполированы на биологически активные вещества более сложной химической структуры. Эти молекулы проявляют протонно-акцепторные свойства, а также имеют довольно объемную гидрофобную часть. Кроме того, ацетонитрил обладает большим дипольным моментом, диоксан имеет квадрупольный момент. Это позволяет ожидать, что при их взаимодействии с полипептидами будет реализовываться широкий спектр нековалентных взаимодействий. Чтобы сравнить результаты с известными системами мы исследовали комплексы полипептидов с молекулой воды.

Методы квантовой химии широко используются для расчета электронной структуры различных соединений. Однако расчет свойств многоатомных систем на высоком уровне теории ограничен высокими требованиями к компьютерным ресурсам. Поэтому важно понимать какой уровень теории дает разумные результаты за разумное время. В данной работе расчет оптимальной геометрии комплексов выполнялся: 1) методом Молекулярной механики в силовом поле CHARMM27, 2) полуэмпирическим методом PM3, 3) методом ONIOM (B3LYP/3-21G:PM3), где расчет области непосредственного контакта лиганда с полипептидом выполнялся методом B3LYP/3-21G, а остальной части комплекса - PM3.

Было обнаружено, что взаимодействие лигандов с полипептидами происходит в среде боковых групп. При этом во многих случаях для образования комплексов необходима подстройка структуры полипептида, в то числе и поворот боковых цепей вокруг своей оси. Геометрия комплексов зависит как от количества полярных центров на полипептиде, так и от таких факторов как длина и гибкость боковых цепей. В комплексах с ацетонитрилом реализуются: диполь-дипольные взаимодействия со спиральным остовом, электростатические взаимодействия, ван-дер-ваальсовы контакты. Диоксан образует водородные связи с участием своих эфирных кислородов и протонно-донорных групп боковых цепей гомополипептида, большой вклад вносят ван-дер-ваальсовы контакты довольно крупной неполярной части молекулы диоксана с боковыми цепями полипептидов. В работе обсуждаются сходства и различия результатов, полученных разными методами расчета.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом РФФИ №09-03-00778*



## QUANTUM CHEMICAL CALCULATION OF THE STRUCTURE OF COMPLEXES BETWEEN HELIX POLYPEPTIDES AND APROTIC ORGANIC LIGANDS

*Makshakova O.N., Fauzullin D.A., Ermakova E.A.*

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics RAS, Kazan, Russia  
e-mail: makshakova@mail.knc.ru

Development of the polymer systems for pharmacological and diagnostic purposes needs understanding of the complex "polymer – bioactive compound" structures on atomic level. The information about ligand-polymer binding is of critical importance to elaboration of the address drug delivery devices, of some analytic devices where the polymers take part as the carriers of the sensory compounds and other up-to-day technical applications. Investigation of such complexes offer prospects to a number of exciting future applications in biomedical diagnostics, research, and discovery.

Polypeptide devices are promising in the applications, which encompass some of the following desirable features: biocompatibility, biodegradability and specific biomolecular sensitivity. Polypeptides are well suited for such applications by virtue of their biochemical nature, the defined chemical structure during biotic synthesis, ability to govern the secondary structure.

We have calculated the geometry and energy of the complexes between "helix homopolypeptide – aprotic organic ligand" by different quantum chemical methods. The system used were poly-L-alanine, poly-L-glutamic acid and poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate which differ in the side chain length, polarity and hydrogen bonding capacity. In turn, the secondary structure impose constraints to ligand binding. Acetonitrile and dioxane represent a broad class of aprotic polar molecules and may be considered as models of low molecular weight bioactive substances. The results can be extrapolated to bioactive compounds of more complicated chemical structure. These ligands possess both proton-acceptor properties and essential hydrophobicity. Besides, acetonitrile has large dipole moment and dioxane possess the quadrupole one. These features imply the different kinds of noncovalent interaction to occur in complexes. For comparative reasons we calculated also the complex of helix homopolypeptide with water.

Quantum chemical methods are in common use to study of the electronic structure of molecules. However estimation of polyatomic systems at a high level of theory is limited by enormous computer requirements. So it is important to define the minimal level one should implement to get reliable information at a reasonable time. The geometry optimizations were carried out by 1) the molecular mechanics method in force field CHARMM27, 2) the semi-empirical method PM3, 3) the ONIOM (B3LYP/3-21G:PM3) method, calculation of the contact area was carried out by the b3lyp/3-21G and the rest was calculated by the PM3.

It was found that the ligands always locate in the side chain domain. At the same time many complexes exhibit rearranging of the polypeptide side chains as well as turning around their axis. The complex energy and geometry depend on the number of polar sites, the length and flexibility of the side chains. In polypeptide-acetonitrile complexes there are noticeable dipole – helix dipole interactions with backbone, charge-charge interactions and Van der Waals contacts. In polypeptide-dioxane complexes the hydrogen bonding between ether oxygen and protic polypeptide side chain prevails and Van der Waals interactions become important due to spacious hydrophobic parts. Similarity and differences of results obtained by different methods are discussed.



## ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫЙ СИНТЕЗ СПИРОЦИКЛИЧЕСКИХ (5,6,7,8-ТЕТРАГИДРО-4Н-ХРОМЕН)-4,3'-ОКСИНДОЛОВ

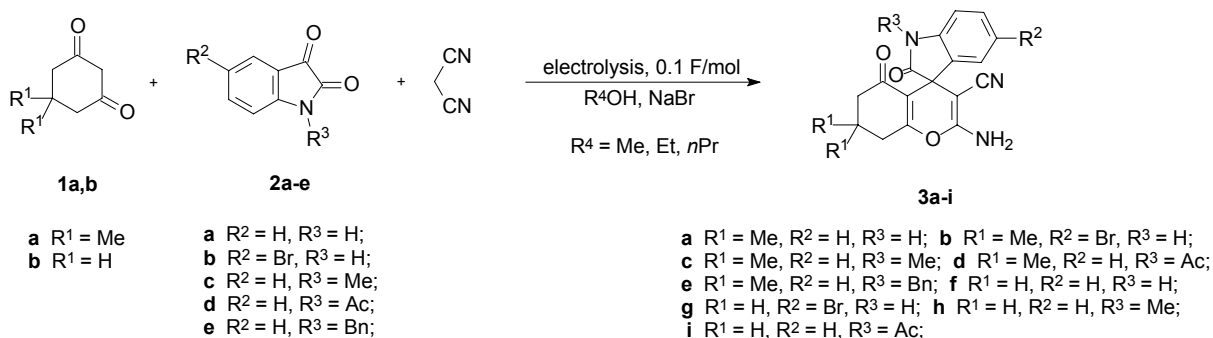
Меркулова В.М., Иловайский А.И., Элинсон М.Н., Никишин Г.И.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН  
Москва, Россия  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Функционально замещенные 4Н-хромены обладают широким спектром биологической активности, в том числе спазмолитической, диуретической, антикоагулянтной и противоопухолевой [1]. В свою очередь, структуры, содержащие спиро(оксиндольный) фрагмент также широко представлены среди природных соединений и лекарственных средств [2].

В настоящей работе предложен удобный и эффективный метод синтеза соединений, содержащих одновременно 4Н-хроменовой и спиро(оксиндольный) фрагменты, что придает данным структурам дополнительный интерес с точки зрения медицинской химии.

Установлено, что электрохимически индуцированная мультикомпонентная трансформация циклических 1,3-дикетонов, изатинов и малонитрила в спиртах в бездиафрагменной ячейке в присутствии бромида натрия в качестве электролита приводит к спироциклическим (5,6,7,8-тетрагидро-4Н-хромен)-4,3'-оксиндолам с выходом по веществу 80 – 98% и выходом по току 800 - 980%:



Роль электрического тока заключается в генерации на катоде каталитических количеств алкогалт-анионов, под действием которых образуется анион малонитрила. Последующий процесс, протекающий в растворе, представляет собой типичную каскадную реакцию Кневенагеля-Михаэля с последующей циклизацией. Полученные спиро[(4Н-хромен)-4,3'-оксиндолы] **3a-i** кристаллизуются непосредственно из реакционной смеси и не требуют дополнительной очистки.

Использование данного электрокаталитического метода позволяет соединить преимущества мультикомпонентной стратегии с экологической безопасностью и простотой бездиафрагменного электрохимического синтеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00003а).

### Литература:

- (a) Skommer, J.; Wlodkowic, D.; Mättö, M.; Eray, M.; Pelkonen, J. *Leukemia Research* **2006**, *30*, 322–331; (b) Yu, N.; Aramini, J. M.; Germann, M. W.; Huang, Z. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6993–6996; (c) Bonsignore, L.; Loy, G.; Secci, D.; Calignano, A. *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, *28*, 517–520; (d) Witte, E. C.; Neubert, P.; Roesch, A. *Ger. Offen. DE* **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 224915f]; (e) Andreani, L. L.; Lapi, E. *Boll. Chim. Farm.* **1960**, *99*, 583–587.
- (a) Williams, R. M.; Cox, R. J. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 127–139; (b) Da Silva, J. F. M.; Garden S. J.; Pinto, A. C. J. *Braz. Chem. Soc.* **2001**, 273–324.



THE ELECTROCATALYTIC MULTICOMPONENT APPROACH TO  
SPIROCYCLIC (5,6,7,8-TETRAHYDRO-4H-CHROMENE)-4,3'-OXINDOLE SYSTEM

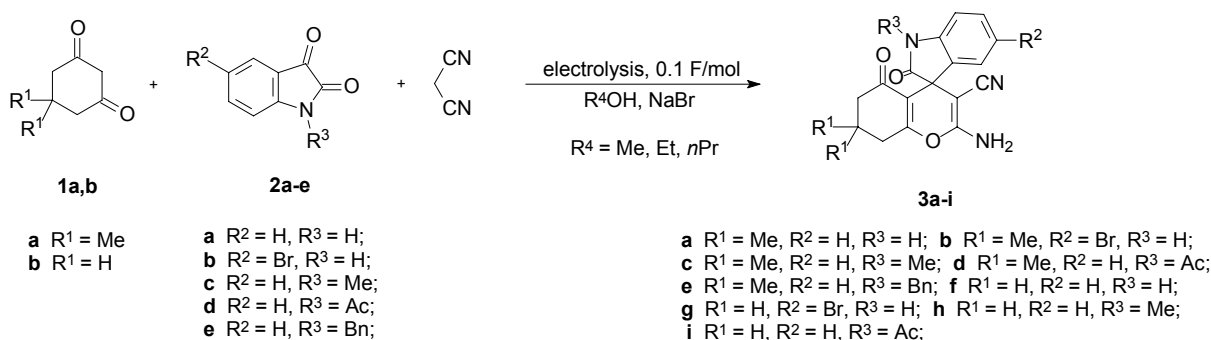
Merkulova Valentina M., Ilovaisky Alexey I., Elinson Michail N., Nikishin Gennady I.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Leninsky prospect 47, 119991 Moscow, Russia  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Functionally substituted 4*H*-chromenes have received considerable attention due to their wide range of useful biological properties, which include spasmolytic-, diuretic-, anticoagulant-, anticancer-, and antianaphylactic activities [1]. The heterocyclic spirooxindole ring system is a widely distributed structural framework present in a number of pharmaceuticals and natural products [2].

Novel electrocatalytic chain process offers an efficient and convenient way to create spirocyclic oxindole systems with fused cyano-functionalized 4*H*-chromene fragment – the hybridized 'privileged drug scaffold' for different biomedical applications.

Electrochemically induced catalytic multicomponent transformation of cyclic 1,3-diketones, isatins and malononitrile in alcohols in an undivided cell in the presence of sodium bromide as an electrolyte results in the formation of spirooxindoles with fused functionalized 5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-chromene system in 83-98% yields and 830-980% current yield:



The initiation step of the reaction begins with the deprotonation of a molecule of alcohol at the cathode, which leads to the formation of an alkoxide anion. The subsequent reaction between the alkoxide anion and malononitrile gives rise to the malononitrile anion. The following process in the solution represents a typical base-promoted cascade Knoevenagel-Michael reaction with further cyclization. After electrolysis, spiro[(4*H*-chromene)-4,3'-oxindoles] **3a-i** were directly crystallized from the reaction mixture; no additional purification is needed.

The application of this efficient electrocatalytic method to the formation of medicinally relevant spirocyclic (4*H*-chromene)-4,3'-oxindoles is beneficial from the viewpoint of diversity-oriented large-scale processes and represents novel, facile and environmentally benign synthetic concept for multicomponent reaction strategy.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 09-03-00003a)

**References:**

- (a) Skommer, J.; Wlodkowic, D.; Mättö, M.; Eray, M.; Pelkonen, J. *Leukemia Research* **2006**, *30*, 322–331; (b) Yu, N.; Aramini, J. M.; Germann, M. W.; Huang, Z. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6993–6996; (c) Bonsignore, L.; Loy, G.; Secci, D.; Calignano, A. *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, *28*, 517–520; (d) Witte, E. C.; Neubert, P.; Roesch, A. *Ger. Offen. DE* **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 224915f]; (e) Andreani, L. L.; Lapi, E. *Boll. Chim. Farm.* **1960**, *99*, 583–587.
- (a) Williams, R. M.; Cox, R. J. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 127–139; (b) Da Silva, J. F. M.; Garden S. J.; Pinto, A. C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 273–324.



**ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫЕ РЕАКЦИИ:  
СИНТЕЗ СПИРО[ИНДОЛ-3,5'-ПИРАНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИНОВ]**

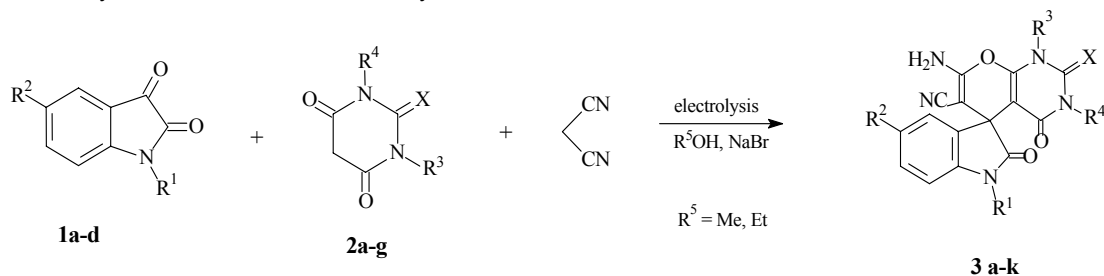
*Меркулова В.М., Иловайский А.И., Элинсон М.Н., Никишин Г.И.*

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН  
Москва, Россия  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Структуры, содержащие спиро(оксиндольный) фрагмент, встречаются во многих природных соединениях и лекарственных средствах, включая цитостатические алкалоиды спиротрипростатины А, В и стрихнофиллин [1]. Необычное строение и выраженная фармакологическая активность делают спиро(оксиндолы) привлекательными объектами для синтеза [2]. В свою очередь, соединения с 1,5-дигидро-2*H*-пирано[2,3-*d*]пиримидин-2,4(3*H*)-дионовым фрагментом также обладают широким спектром полезных биологических свойств, включающих анальгетическую и противосудорожную активность, а также оказывают влияние на вызываемую амфетамином стереотипию и потенцируют действие фенобарбитала натрия [3].

Предложен удобный и эффективный метод синтеза соединений, содержащих одновременно спиро(оксиндольный) и 1,5-дигидро-2*H*-пирано[2,3-*d*]пиримидин-2,4(3*H*)-дионовый фрагменты, что придает данным структурам дополнительный интерес с точки зрения медицинской химии.

Установлено, что электрохимически индуцированная мультикомпонентная трансформация изатинов **1**, барбитуровой кислоты или *N*-алкил барбитуратов **2** и малононитрила в спиртах в бездиафрагменной ячейке в присутствии бромида натрия в качестве электролита приводит к 7'-амино-2,2',4'-триоксо-1,1',2,2',3',4'-гексагидроспиро[индол-3,5'-пирано[2,3-*d*]пиримидин]-6'-карбонитрилам **3** с выходом по веществу 83 – 98% и выходом по току 830 - 1900%:



**a** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H  
**b** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = H  
**c** R<sup>1</sup> = Ac, R<sup>2</sup> = H  
**d** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Br

**a** R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H, X = O  
**b** R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H, X = O  
**c** R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = H, X = O  
**d** R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**e** R<sup>3</sup> = Et, R<sup>4</sup> = Et, X = O  
**f** R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = Ph, X = O  
**g** R<sup>3</sup> = Et, R<sup>4</sup> = Et, X = S

**a** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H, X = O  
**b** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**c** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Ph, X = O  
**d** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = H, X = O  
**e** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**f** R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**g** R<sup>1</sup> = Ac, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**h** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Br, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me, X = O  
**i** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Et, R<sup>4</sup> = Et, X = O  
**j** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = Ph, X = O  
**k** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Et, R<sup>4</sup> = Et, X = S

Полученные спиро[индол-3,5'-пирано[2,3-*d*]пиримидины] **3** кристаллизуются непосредственно из реакционной смеси и не требуют дополнительной очистки. Роль электрического тока заключается в генерации на катоде каталитических количеств алкоголят-анионов, под действием которых образуется анион малононитрила. Последующий процесс, протекающий в растворе, представляет собой типичную каскадную реакцию Кневенегеля-Михаэля с последующей циклизацией.

Использование данного электрокаталитического метода позволяет соединить преимущества мультикомпонентной стратегии с экологической безопасностью и простотой бездиафрагменного электрохимического синтеза.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00003а).*

**Литература:**

1. R.M. Williams, R.J. Cox, Acc. Chem. Res. 36 (2003) 127.
2. P. B. Alper, C. Meyers, A. Lerchner, D.R. Siegel, E.M. Carreira, Angew. Chem., Int. Ed. 38, (1999) 3186 and references cited therein.
3. K. C. Joshi, R. Jain, K. Sharma, J. Indian Chem. Soc. 45 (1988) 202



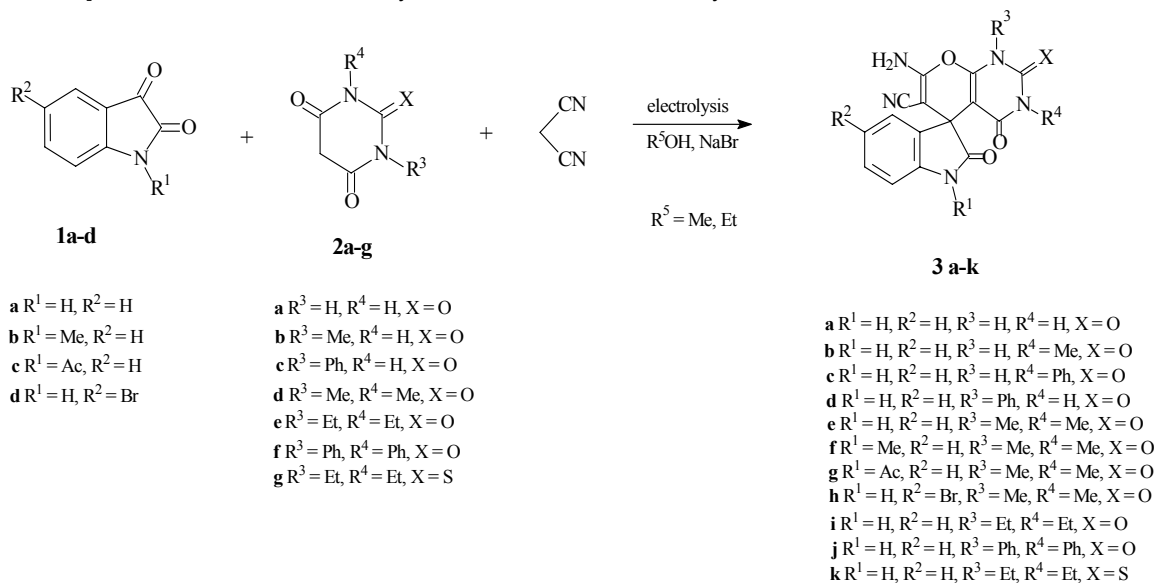
AN EFFICIENT ELECTROCATALYTIC MULTICOMPONENT APPROACH  
TO THE SPIRO[INDOLE-3,5'-PYRANO[2,3-D]PYRIMIDINE] FRAMEWORK

Merkulova V. M., Ilovaisky A.I., Elinson M. N., Nikishin G.I.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Leninsky prospect 47, 119991 Moscow, Russia  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

The heterocyclic spirooxindole ring system is a widely distributed structural framework present in a number of pharmaceuticals and natural products, including such cytostatic alkaloids as spirotryprostatins A, B, and strychnophylline [1]. The unique structural array and the highly pronounced pharmacological activity displayed by the class of spirooxindole compounds have made them attractive synthetic targets [2]. Among the heterocycles fused with spirooxindole ring system, 1,5-dihydro-2*H*-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(3*H*)-dione have received attention due to the wide range of useful biological properties which include analgesic and anticonvulsant activity and the effects against amphetamine induced stereotypy and on potentiation of pentobarbitone sodium hypnosis [3]. This spiro system appears to be of interest because it incorporates indole and pyranopyrimidine moieties which are promising with the respect to biological responses.

Electrochemically induced catalytic multicomponent transformation of isatins **1**, barbituric acid or *N*-alkyl barbiturates **2** and malononitrile in alcohols in an undivided cell results in the formation of substituted 7'-amino-2,2',4'-trioxo-1,1',2,2',3',4'-hexahydrospiro[indole-3,5'-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine]-6'-carbonitriles **3** in 80-95% yield and 830-1900% current yield:



After electrolysis, spiro[indole-3,5'-pyrano[2,3-*d*]pyrimidines] **3** were directly crystallized from the reaction mixture; no additional purification is needed. The initiation step of the reaction begins with the deprotonation of a molecule of alcohol at the cathode, which leads to the formation of an alkoxide anion. The subsequent reaction between the alkoxide anion and malononitrile gives rise to the malononitrile anion. The following process in the solution represents a typical base-promoted cascade Knoevenagel-Michael reaction with further cyclization.

The developed efficient electrocatalytic approach to corresponding spiro[indole-3,5'-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine] system is beneficial from the viewpoint of diversity-oriented large-scale processes and represents a new example of the ecologically pure synthetic concept for electrocatalytic multicomponent reactions strategy.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 09-03-00003a)

**References:**

1. R.M. Williams, R.J. Cox, Acc. Chem. Res. 36 (2003) 127.
2. P. B. Alper, C. Meyers, A. Lerchner, D.R. Siegel, E.M. Carreira, Angew. Chem., Int. Ed. 38, (1999) 3186 and references cited therein.
3. K. C. Joshi, R. Jain, K. Sharma, J. Indian Chem. Soc. 45 (1988) 202





**МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ:  
СИНТЕЗ 2-АМИНО-4-НИТРОМЕТИЛ-4Н-ХРОМЕНОВ**

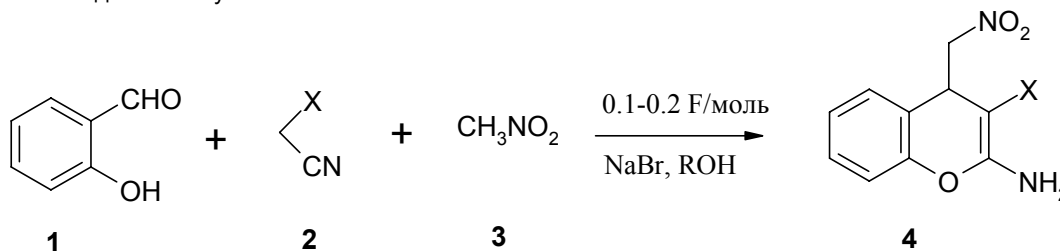
*Меркулова В.М., Иловайский А.И., Элинсон М.Н., Никишин Г.И.*

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН  
Москва, Россия  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Хроменовой фрагмент является важным структурным компонентом многих природных и синтетических биологически активных соединений. В последние годы функционально замещенные хромены играют все возрастающую роль в медицинской химии. В частности, 2-амино-4Н-хромены представляют собой важный класс биологически активных веществ с ярко выраженным спазмолитическим, диуретическим, антикоагулянтным и антианафилактическим действием [1,2]. 2-Амино-4Н-хромены с нитрильным заместителем перспективны для лечения артритов; имеются также сведения о противоопухолевой активности 2-амино-4Н-хроменов, содержащих нитрильную или сложноэфирную группу в третьем положении хроменовой цикла [3].

В настоящей работе впервые получены структурно родственные данным физиологически активным соединениям 2-амино-4Н-хромены, содержащие нитрометильный заместитель.

Электрохимически индуцированная мультикомпонентная трансформация салицилового альдегида, малонитрила (или метилцианоацетата) и нитрометана в спиртах в бездиафрагменной ячейке в присутствии бромида натрия в качестве электролита приводит соответственно к 2-амино-4-нитрометил-4Н-хромен-3-карбонитрилу и метил 2-амино-4-нитрометил-4Н-хромен-3-карбоксилату с выходом по веществу 65-70% и выходом по току 350-700%:



X = CN, COOMe; R = Me, Et

Поскольку при электролизе в бездиафрагменной ячейке создается очень низкая текущая концентрация основания (алкоголят-анионов), которая носит градиентный характер при нейтральности раствора в целом, использованная электрокаталитическая система различает две С–Н кислоты **2** и **3** в соответствии с их реакционной способностью в условиях основного катализа; более кислый малонитрил (или метилцианоацетат) участвует в построении 2-амино-4Н-хроменовой скелета, в то время как менее кислый нитрометан реагирует далее с образованием 4-нитрометилзамещенных 2-амино-4Н-хроменов **4**.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00003а).*

**Литература:**

1. a) R. W. DeSimone, K. S. Currie, S. A. Mitchell, J. W. Darrow, D. A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screening* 2004, 7, 473–493; b) A. A. Patchett, R. P. Nargund, *Ann. Rep. Med. Chem.* 2000, 35, 289–298.
2. a) L. Bonsignore, G. Loy, D. Secci, A. Calignano, *Eur. J. Med. Chem.* 1993, 28, 517–520; b) W. O. Foye, *Principi di Chimico Farmaceutica*, Piccin, Padova, 1991, p. 416; c) E. C. Witte, P. Neubert, A. Roesch, *Ger. Offen. DE 3427985*, 1986 [*Chem. Abstr.* 1986, 104, 224915f]; d) L. L. Andreani, E. Lapi, *Boll. Chim. Farm.* 1960, 99, 583–587.
3. a) D. R. Anderson, S. Hegde, E. Reinhard, L. Gomez, W. F. Vernier, L. Lee, S. Liu, A. Sambandam, P. A. Snider, L. Masih, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 1587–1590; b) J. Skommer, D. Wlodkowic, M. Mättö, M. Eray, J. Pelkonen, *Leukemia Res.* 2006, 30, 322–331, and references therein.



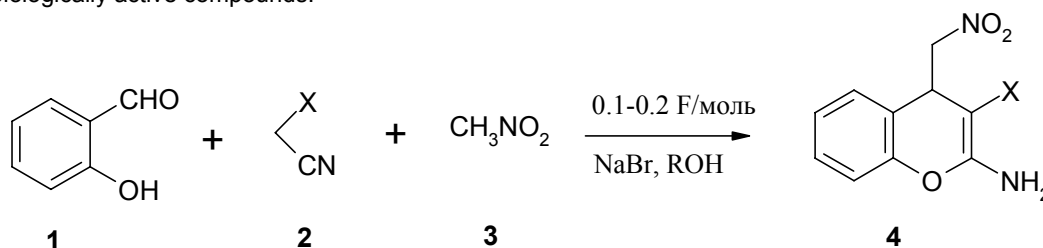
THE MULTICOMPONENT ELECTROCATALYTIC REACTIONS:  
SYNTHESIS OF 2-AMINO-4-NITROMETHYL-4H-CHROMENES

Merkulova Valentina M., Ilovaitsky Alexey I., Elinson Michail N., Nikishin Gennady I

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia  
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

The chromene moiety often appears as an important structural component in both biologically active and natural compounds. Moreover, in recent years functionalized chromenes have played an ever increasing role in the synthetic approaches to promising compounds in the field of medicinal chemistry. Among different types of chromene systems, 2-amino-4H-chromenes are of particular utility as they belong to privileged medicinal scaffolds serving for generation of small-molecule ligands with highly pronounced spasmolytic-, diuretic-, anticoagulant-, and antianaphylactic activities [1,2]. The current interest in 2-amino-4H-chromene derivatives bearing nitrile functionality arises from their potential application in the treatment of rheumatoid and psoriatic arthritis, and in cancer therapy [3].

Here we report the first synthesis of nitromethyl group containing 2-amino-4H-chromenes, structurally similar to these biologically active compounds.



Electrochemically induced multicomponent transformation of salicylaldehyde, malononitrile (or methyl cyanoacetate) and nitromethane in alcohols in an undivided cell in the presence of sodium bromide as an electrolyte led to the formation of 2-amino-4-nitromethyl-4H-chromene-3-carbonitrile or methyl 2-amino-4-nitromethyl-4H-chromene-3-carboxylate in 65-70% yield and 350-700% current yield:

X = CN, COOMe; R = Me, Et

Since the electrolysis in an undivided cell allows for a very low and gradient current concentration of the base (alkoxide anions) generated at the cathode along with a neutral pH of the whole solution, the electrocatalytic system does distinguish two C-H acids **2** and **3** according to their reactivity in the base-catalyzed process, and more acidic malononitrile (or methyl cyanoacetate) serves as a source for the 2-amino-4H-chromene framework while less acidic nitromethane gives rise to the corresponding 4-substituent of 2-amino-4H-chromene **4**.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 09-03-00003a)

**References:**

1. a) R. W. DeSimone, K. S. Currie, S. A. Mitchell, J. W. Darrow, D. A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, 7, 473-493; b) A. A. Patchett, R. P. Nargund, *Ann. Rep. Med. Chem.* **2000**, 35, 289-298.
2. a) L. Bonsignore, G. Loy, D. Secci, A. Calignano, *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, 28, 517-520; b) W. O. Foye, *Principi di Chimico Farmaceutica*, Piccin, Padova, **1991**, p. 416; c) E. C. Witte, P. Neubert, A. Roesch, *Ger. Offen. DE 3427985*, **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, 104, 224915f]; d) L. L. Andreani, E. Lapi, *Boll. Chim. Farm.* **1960**, 99, 583-587.
3. a) D. R. Anderson, S. Hegde, E. Reinhard, L. Gomez, W. F. Vernier, L. Lee, S. Liu, A. Sambandam, P. A. Snider, L. Masih, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1587-1590; b) J. Skommer, D. Wlodkowic, M. Mättö, M. Eray, J. Pelkonen, *Leukemia Res.* **2006**, 30, 322-331, and references therein.



## ВМІСТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ВІРУСІНФІКОВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИНАХ

Мищенко Л. Т., Ховака В.В<sup>1</sup>., Коренева А. А., Тороп В.В., Таран О.П.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

<sup>1</sup>ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка» АМН України, Київ, Україна  
e-mail: korenevochka@mail.ru; lmishchenko@ukr.net

На сьогодні в Україні зареєстровано більше 300 вітчизняних лікарських препаратів рослинного походження, які належать до категорії життєво необхідних. Однак, зараз відчувається гострий дефіцит у вітчизняній лікарській сировині та використовуються імпорتنі ліки, в більшості випадків сумнівної якості (Белова, 2007). Задля підвищення конкурентоспроможності та якості фітопрепаратів, від якої безпосередньо залежить здоров'я населення, необхідним є контроль вмісту в них біологічно активних речовин. Відомо, що вірусні захворювання є серйозною загрозою у вирощуванні лікарських рослин, так як завдають їм подвійної шкоди: викликають суттєве зменшення врожаїв через пригнічений розвиток уражених рослин, а також є причиною значних змін вмісту та складу біологічно активних речовин, що в кінцевому результаті призводить до погіршення якості сировини та лікарських препаратів, виготовлених із неї (Хотин, 1974; Bellardi, 2001).

При обстеженні плантації женьшеню справжнього (*Panax ginseng* C. A. Meyer) виявлено 30 % рослин із симптомами мозаїки, деформації листової пластинки та затримки росту рослин, що були інфіковані вірусами. Вірусні частки локалізувалися у різних частинах рослин: у плодах – нитковидні розміром  $1200 \pm 20 \times 11-12$  нм; у насінні - паличковидні  $460 \pm 10 \times 11-12$  нм; у надземній частині – нитковидні ( $2360 \pm 20 \times 18$  нм,  $525 \pm 30 \times 11$  нм,  $1200 \pm 20 \times 11-13$  нм) та паличковидні віріони ( $95 \pm 10 \times 15$  нм,  $190 \pm 10 \times 20$  нм і  $320 \pm 15 \times 17$  нм). Крім того, вірусні частки також присутні в кореневій шийці інфікованих рослин женьшеню.

Встановлено, що 15% рослини ехінацеї пурпурової (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) уражені вірусом огіркової мозаїки (ВОМ), який представляє собою сферичні частки розміром  $29,5 \pm 0,5$  нм. Захворювання проявляється у вигляді жовтої мозаїки на листках, їх деформації та затримкою росту вегетативних і генеративних органів рослин.

Відомо, що відбір форм лікарських та ароматичних рослин для залучення у селекційний процес необхідно проводити на основі оцінки стійкості лікарських культур до ураження фітопатогенами та їх впливу на фізіолого-біохімічні показники сировини. Вивчення впливу вірусної інфекції на якість сировини лікарських рослин, що вирощуються на території України, не проводилось. Тому актуальною є оцінка впливу вірусів на кількісний вміст біологічно активних речовин у лікарських рослинах.

Основним показником якості сировини з коренів *Panax ginseng* C. A. Meyer є сапоніни. Саме тому вивчали їх вміст у коренях інфікованих рослин. В результаті досліджень встановлено, що вміст сапонінів у коренях інфікованих рослин женьшеню складає 7,7%, що майже вдвічі менше порівняно з контрольними зразками – 12,5%. За стандартами України така сировина залишається придатною для використання у фармакології (вміст сапонінів у сировині женьшеню справжнього не повинен бути менше 3,5 %). Однак, зважаючи на складність вирощування цієї культури в умовах України, таке суттєве погіршення якості сировини може мати катастрофічні наслідки.

Головними показниками якості та стандартизації лікарської сировини з рослин *Echinacea purpurea* (L.) Moench. є похідні гідроксикоричних кислот (ГОКК), із них основним компонентом є цикорієва кислота. Тому в роботі вирішено було визначити вплив ВОМ на кількісний вміст похідних ГОКК у перерахунку на цикорієву кислоту. В результаті встановлено, що у рослинах ехінацеї пурпурової, інфікованих ВОМ, міститься 2,3% ГОКК, а в контролі цей показник вищий – 2,7%. вірусна інфекція знижує якість фармакологічної сировини.

Крім ГОКК, фармакологічно цінним компонентом ехінацеї є полісахариди, активність яких пов'язують з імуностимулюючими властивостями цієї культури. Наші дослідження показали, що кількість полісахаридів у рослинах, уражених ВОМ, становила 5,6 %, що на 2 % нижче порівняно з контролем (7,6%). Відомо, що рослинна сировина ехінацеї, яка містить менше 7% полісахаридів, не відповідає стандарту та не може бути використана у фармацевтичній промисловості. Отже, наші дослідження показали, що інфекція, викликана ВОМ, робить сировину з ехінацеї пурпурової непридатною для використання у фармацевтичній промисловості.

Таким чином, проведені нами дослідження з оцінки впливу вірусної інфекції на вміст біологічно активних речовин у вірусінфікованих рослинах женьшеню та ехінацеї показали, що кількісний вміст сапонінів у женьшені та гідроксикоричних кислот і полісахаридів у ехінацеї знижений. Потрібно наголосити, що дослідження виявили суттєве зменшення вмісту полісахаридів у рослинах ехінацеї, інфікованих вірусом огіркової мозаїки, внаслідок чого така рослинна сировина не є придатною для використання її у виробництві лікарських препаратів. Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України, у розробці препаратів на основі рослинної сировини обов'язковим є тестування її на мікробіологічну чистоту, яка включає в себе перевірку тільки на наявність бактерій та грибів. Тому, зважаючи на отримані результати, що показали суттєве зниження біологічно активних речовин у лікарських рослинах під впливом вірусів, вважаємо за доцільне включити до існуючих технологій виготовлення лікарських фітопрепаратів перевірку сировини на наявність вірусів.



## CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN MEDICINAL PLANTS INFECTED WITH VIRUSES

Mishchenko L. T., Hovaka V. V.<sup>1</sup>, Koreneva A. A., Torop V. V., Taran O. P.

Taras Shevchenko Kyiv National University

<sup>1</sup>V. P. Komisarenko Institute of endocrinology and metabolism, Academy of medical sciences of Ukraine

e-mail: korenevochka@mail.ru; lmishchenko@ukr.net

For today there are more than 300 native drugs made with herbs that belong to category of very important. But there is deficit of native medicinal plant material therefore imported drugs with doubtful quality are widely using today (Belova, 2007). Control of biologically active substances' content (BAS) is necessary for rise of competition and quality of phytopreparations that determining people' health. It is known that viral diseases is a serious problem in growing of medicinal plants causing double damage: yield reduction and changes in content of biologically active substances that goes to worsening of quality of plant material and preparations made with it (Hotin, 1974; Bellardi, 2001).

During our investigation of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) plantations 30 % virus infected plants with symptoms of mosaic and plant dwarfing were detected. Viral particles localized in different plant parts: in fruits - filamentous particles 1200±20x11-12 nm; in seeds - rod-shaped 460±10x11-12 nm; in stems and leaves – filamentous (2360±20x18 nm, 525±30x11 nm, 1200±20x11-13 nm) and rod-shaped virions (95±10x15nm, 190±10x20 nm and 320±15x17 nm). Moreover, virus particles were found in root necks of infected ginseng plants.

It was revealed that 15% echinacea plants (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) are infected with cucumber mosaic virus (CMV) – spherical particles 29,5±0,5 nm in diameter. Symptoms of echinacea viral disease are: yellow mosaic and deformation on the leaves, reducing of vegetative and generative organs.

It is known that selection of medicinal and aromatic plants needs studying of plants stability to infections and their effect on physiologically and biochemical indicators of plant material. Investigation of viruses' effect on quality of medicinal plants which growing in Ukraine is absent today. That's why estimation of virus' effect on biologically active substances' quantity in medicinal plants is actual.

Saponins are main biologically active substances in ginseng plants. Therefore, we were interested in studying of quantity of these substances in virus infected ginseng roots. It was shown that level of saponins in infected ginseng roots was low - 7,7% in contrast to healthy plants (12,5 %). According to standards in Ukraine, such plant material is suitable for using in pharmacology (quantity of saponins in ginseng must be more than 3,5%). However, such reducing of BAS will drive to catastrophic results because ginseng introduction and growing is very difficult in Ukraine.

Hydroxycinnamic acid is indicator of quality of echinacea plants and used in standardization of medicinal material and drugs. Our research showed that echinacea plants infected with CMV have 2,3% hydroxycinnamic acid, healthy plants - 2,7%.

Polysaccharides are pharmacologically active substances in echinacea plants. Our investigations showed that quantity of polysaccharides in CMV infected plants was 5,6 %, that is on 2 % less than in healthy (7,6%). It is known that echinacea plant material that has less 7 % of polysaccharides isn't able to using in pharmaceutical industry in Ukraine. Thus, our research showed that CMV infection make echinacea plant material unfit for using in drugs producing.

So, our studying showed that quantity of saponins in virus infected ginseng, hydroxycinnamic acid and polysaccharides in CMV infected echinacea is lowered. We want to pay attention to fact of reduction of polysaccharides in CMV infected echinacea plants and fact that virus make these plants unfit for using in pharmaceutical industry. According to Pharmacopoeia of Ukraine, testing of plants material on microbiologically clearing is necessary. But it is not include testing plant material on viruses. That's why we think that including of testing of medicinal plant material on viruses in technology of medicinal preparations producing is reasonable.



## СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧНИХ АНАЛОГІВ НЕОФЛАВОНІВ – ПОТЕНЦІЙНИХ БІОРЕГУЛЯТОРІВ РІЗНОЇ ДІЇ

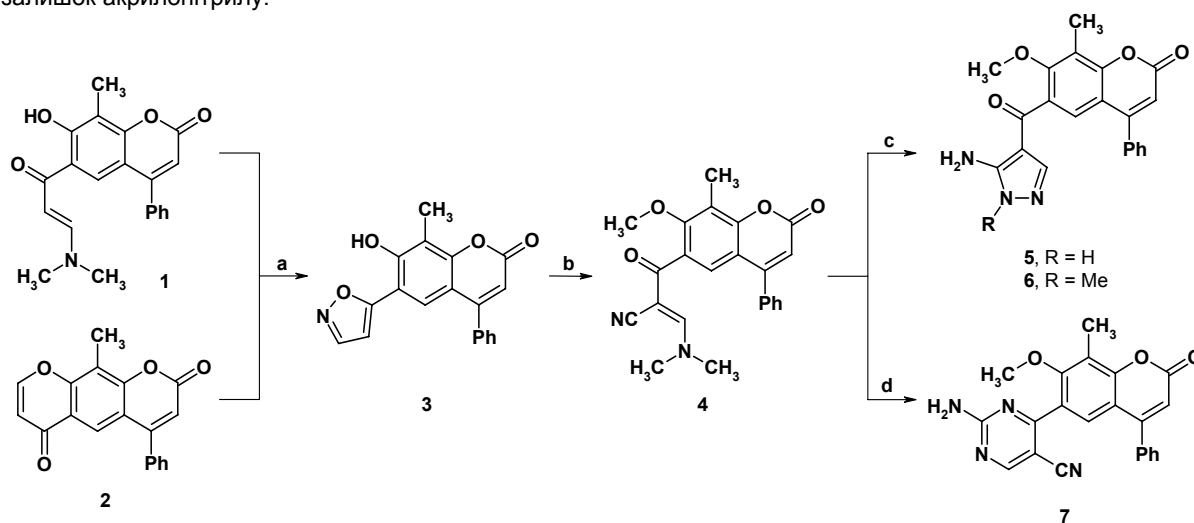
Москвіна В.С., Хиля В.П.

Київський національний університет імені Т. Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: v.moskvina@gmail.com

Похідні неофлавінів – 4-феніл-2*H*-хромен-2-онів – широко розповсюджені в природі та проявляють різноманітну біологічну активність – протиракову, протиконвульсійну, антибактеріальну, антиоксидантну, є інгібіторами протеїнкіназної активності та фосфодіестерази аденозин монофосфату [1].

Продовжуючи роботу із синтезу гетероциклічних сполук – аналогів природних неофлавінів – з такими біогенними фрагментами, як піразол, ізоксазол, амінопіримідин [2], ми отримали нові похідні 4-феніл-2*H*-хромен-2-ону.

Ізоксазолінеофлавін **3** отриманий двома шляхами – обробкою солянокислим гідроксиламіном енамінокетону **1** або піранохромен-2,6-диону **2**. Послідовна обробка сполуки **3** диметилформамідом диметилацеталю привела до утворення цільового неофлавіну **4**, який містить поліфункціональний залишок акрилонітрилу.



**a:**  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , EtOH /  $\text{H}_2\text{O}$ , reflux; **b:** DMFDMA, reflux; **c:**  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  or  $\text{CH}_3\text{NHNH}_2$ , EtOH, reflux; **d:**  $(\text{NH}_2)_2\text{CNH} \cdot \text{HCl}$ , DMF

Взаємодія акрилонітрилу **4** з гідразингідратом, *N*-метилгідразином та гуанідином привела до утворення неофлавінів, які містять амінопіразольний (**5**), *N*-метиламінопіразольний (**6**) та 2-аміно-5-карбонітрил-піримідиновий (**7**) цикли.

Структура нових продуктів дозволяє не лише сподіватися на прояв цікавих фармакологічних властивостей, а й містить достатньо можливостей для подальших перетворень.

### Література:

- Liang, Xiao-Tian; Fang, Wei-Shuo. Medical Chemistry of Bioactive Natural Products. Publisher: John Wiley & Sons, Inc., 2006, 460, ISBN-13 978-0-471-66007.
- Moskvina, V.S.; Khilya, V.P.; Turov, O.V.; Groth, U.M. Synthesis, 2009, in press.



## SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC ANALOGUES OF NEOFLAVONES – POTENTIAL VERSATILE BIOREGULATORS

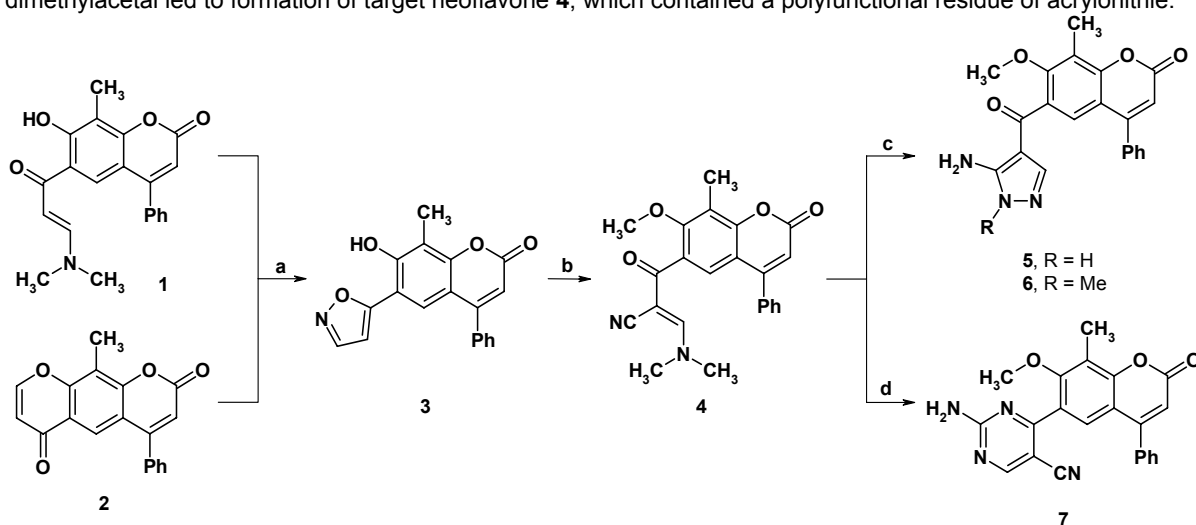
Moskvina V.S., Khilya V.P.

Taras Shevchenko Kyiv National University Kyiv, Ukraine  
e-mail: v.moskvina@gmail.com

Derivatives of neoflavones – 4-phenyl-2*H*-chromene-2-ones – are widespread in nature and exhibit diverse biological activity – such as anticancer, anticonvulsant, antibacterial, antioxidant effects and inhibition of protein kinase and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) phosphodiesterase [1].

Continuing our research on synthesis of heterocyclic analogues of natural neoflavones with biogenic fragments – pyrazole, isoxazole, aminopyrimidine [2], we have obtained a series of new 4-phenyl-2*H*-chromene-2-ones derivatives.

A starting isoxazolylneoflavone **3** was obtained using two approaches - by treating either enaminoketone **1** or pyranochromene-2,6-dione **2** with hydroxylamine hydrochloride. Treatment of **3** with dimethylformamide dimethylacetal led to formation of target neoflavone **4**, which contained a polyfunctional residue of acrylonitrile.



**a:**  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , EtOH /  $\text{H}_2\text{O}$ , reflux; **b:** DMFDMA, reflux; **c:**  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  or  $\text{CH}_3\text{NHNH}_2$ , EtOH, reflux; **d:**  $(\text{NH}_2)_2\text{CNH} \cdot \text{HCl}$ , DMF

Acrylonitrile **4** reacted with hydrazine hydrate, *N*-methylhydrazine, and guanidine, to give neoflavones with aminopyrazole (**5**), *N*-methylaminopyrazole (**6**), and 2-amino-5-carbonitrile-pyrimidine (**7**) rings.

The structure of the new products not only promises a possibility of interesting pharmacological properties, but also possesses a potential for further modifications.

### References:

- Liang, Xiao-Tian; Fang, Wei-Shuo. Medical Chemistry of Bioactive Natural Products. Publisher: John Wiley & Sons, Inc., 2006, 460, ISBN-13 978-0-471-66007.
- Moskvina, V.S.; Khilya, V.P.; Turov, O.V.; Groth, U.M. Synthesis, 2009, in press.



## КЛАТРАТЫ ИЗОСТЕВИОЛА С АРОМАТИЧЕСКИМИ АЛЬДЕГИДАМИ В СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОМ СИНТЕЗЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ

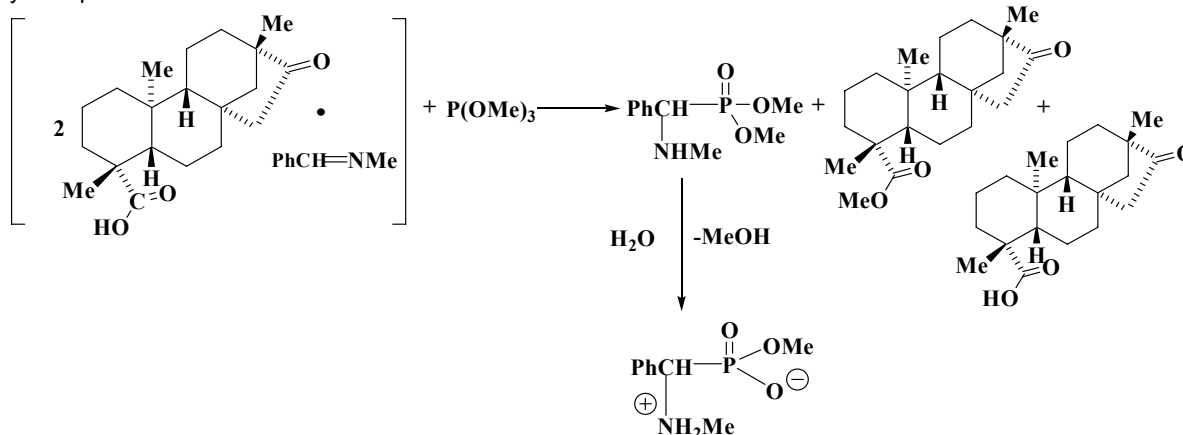
Никитина К.А., Мамедова В.Л., Катаева О.Н., Альфонсов В.А.

Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: alfonsov@iopc.knc.ru

Фосфорилирование природных энантиоцистых соединений может привести к созданию новых типов биологически активных веществ, а также новых реагентов для их энантиоселективного синтеза. В последнее время наши исследования связаны с изучением реакционной способности дитерпеноида изостевиола, легко получаемого из доступного природного сырья – растения *Stevia rebaudiana Bertoni*. Привлекательными свойствами этого соединения являются его 100%-ная энантиомерная чистота, достаточно большое содержание и легкость выделения из природного сырья, наличие реакционноспособных группировок, способных к функционализации, конформационная жесткость и конфигурационная устойчивость хиральных центров. В работах [1,2] нами описаны первые примеры фосфорилирования изостевиола.

Одним из примечательных свойств изостевиола является его способность образовывать молекулярные комплексы с ароматическими соединениями [3]. Нами получена серия клатратов изостевиола с ароматическими альдегидами и азометинами, структура которых доказана методом рентгеноструктурного анализа. Супрамолекулярная структура комплексов характеризуется кристаллографической осью 4 порядка и представляет собой двойную спираль, состоящую из молекул изостевиола, в полостях между которыми расположены молекулы альдегида. В силу асимметрического окружения прохиральные стороны плоских молекул гостя являются диастереотопными.

Исследовано взаимодействие комплексов с триалкилфосфитами, приводящее к получению биологически значимых производных  $\alpha$ -окси- и  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот, изучена стереохимия этих реакций. Показана каталитическая активность изостевиола в реакциях альдегидов и азометиннов с фосфорсодержащими нуклеофилами.



Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант №07-03-00617).

### Литература:

1. Mamedova V.L., et.al. Mendeleev Comm., 2005, № 15, 98.
2. Мамедова В.Л. и др. Изв. АН, Сер.хим., 2009, № 1, 241.
3. Alfonsov V.A., et.al., Mendeleev Comm., 1999, № 6, 227.



**ISOSTEVIOL AND AROMATIC ALDEHYDES CLATHRATES IN THE ENANTIOSELECTIVE SYNTHESIS OF AMINOPHOSPHONIC ACID DERIVATIVES**

*Nikitina K.A., Mamedova V.L., Kataeva O.N., Alfonsov V.A.*

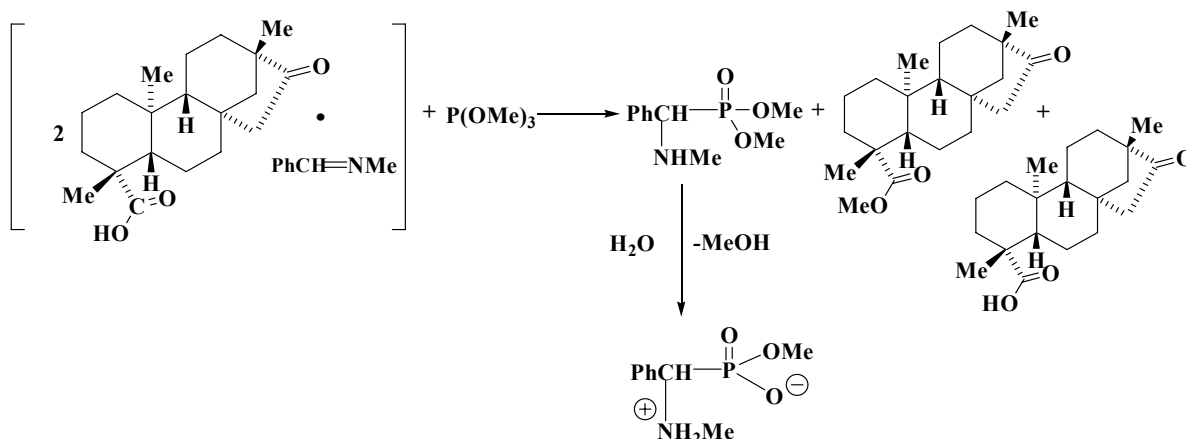
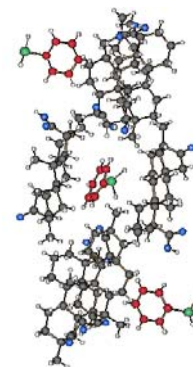
A.E.Arbusov Institute of Organic and Physical Chemistry, KazSC RA S, Kazan, Russian Federation.  
e-mail: alfonsov@iopc.knc.ru

Phosphorylation reactions of naturally occurring chiral enantiopure compounds are a promising way to create new types of bioactive compounds and new reagents for its enantioselective synthesis.

Recently diterpenoid isosteviol attracted our attention as a building block for these aims. This compound is easily available from plant *Stevia rebaudiana Bertoni*, has 100% enantiopurity, conformationally rigid framework with configurationally stable chiral centres and two reactive functional groups. We have shown the first examples of isosteviol phosphorylation in [1,2].

One of the unique properties of isosteviol is its ability to form molecular complexes with aromatic compounds [3]. We obtained a series of clathrates of isosteviol with aromatic aldehydes and Schiff bases. According to the X-ray crystal analysis supramolecular structure of complexes is characterized by a crystallographic axes  $4_3$  and looks like a double helix consisting of isosteviol molecules. The aldehyde molecules are posed in the cavity between the branches of helix. Owing to a asymmetric auxiliary the sides of planar aromatic molecules are diastereotopic.

The interaction of the clathrates with trialkylphosphites results in the formation biologically important  $\alpha$ -oxy- and  $\alpha$ -aminophosphonic acid derivatives. The catalytic activity of isosteviol in reactions of Schiff bases with phosphorus containing nucleophiles has been shown.



*This work was supported by RFBR (Grant № 07-03-00617).*

**References:**

1. Mamedova V.L., et.al. Mendeleev Comm., 2005, № 15, 98.
2. Mamedova V.L., et.al. Russian Chem. Bull., 2009, № 1, 241.
3. Alfonsov V.A., et.al., Mendeleev Comm., 1999, № 6, 227.





## СИНТЕЗ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ БИФЕНИЛОВ

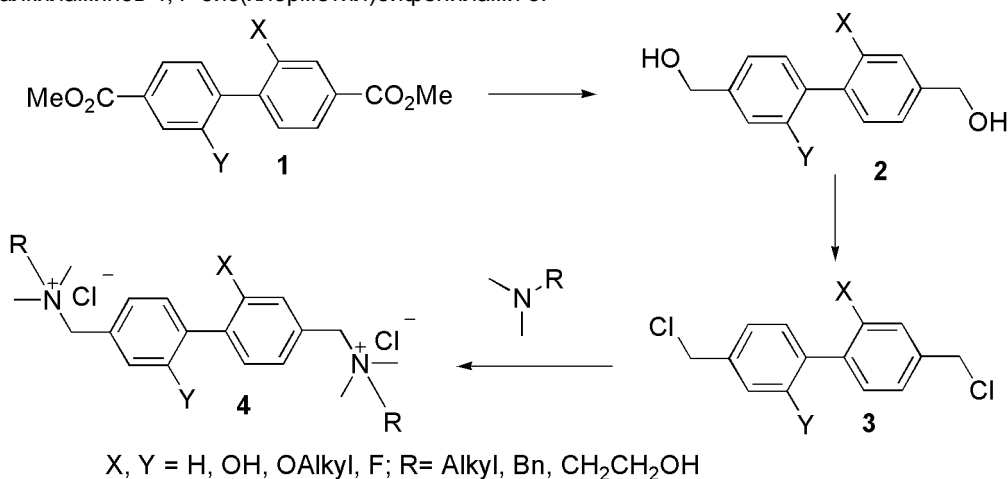
Ольховик В.К., Василевский Д.А., Матвеев Ю.В., Петушок В.Г., Желдакова Р.А. \*, Лысак В.В. \*

Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
\*Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь  
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by

Появление штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью по отношению к применяемым антибиотикам и антисептикам обуславливает необходимость постоянного поиска новых соединений с антимикробной активностью [1]. Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) остаются весьма перспективными в плане создания на их основе высокоэффективных нетоксичных, неагрессивных дезинфицирующих средств. Ретроспективный статистический анализ структурных фрагментов фармакологически активных молекул показал, что бифенильный фрагмент присутствует в 2,1% описанных лекарственных препаратов [2]. В этой связи, ЧАС с бифенильным фрагментом в молекулярной структуре могут представлять большой интерес в качестве бактерицидов, в частности в качестве новых фунгицидных препаратов.

Целью настоящей работы была разработка методов синтеза и поиск новых ЧАС, содержащих в молекуле бифенильный структурный фрагмент и обладающих антимикробной активностью.

Синтез четвертичных аммониевых солей на основе замещенных производных бифенила, имеющих функциональные группы в положении 2 и 2', проводили по приведенной ниже схеме кватернизацией диметилалкиламинов 4,4'-бис(хлорметил)бифенилами **3**.



Последние были получены из эфиров 2- и 2,2'-замещенных 4,4'-бифенилдикарбоновых кислот **1**, синтез которых описан в работе авторов [3]. Восстановление соединений **1** литийалюмогидридом в ТГФ с высокими выходами дало промежуточные диолы **2**, последующая обработка которых тионил хлоридом привела к 4,4'-бис(хлорметил)бифенилам **3**. Кипячение последних с избытком диметиламина в ацетонитриле позволило получить четвертичные аммониевые соли **4** с выходом 90-95%.

Фунгицидная активность всех синтезированных соединений была изучена по отношению к девяти семействам грибов (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Trichoderma*). RF-фактор ингибирования роста мицелия находился в интервале 20-100% при использовании водных растворов ЧАС с концентрацией 100 мкг/мл. Четвертичные аммониевые соли на основе 2-алкокси производных бифенила показали наивысшую, сравнимую с нистатином, активность (RF=80-100% для всех штаммов грибов).

### Литература:

1. Красильников А.П. Справочник по антисептике. г. Минск. Высшая школа. 1995. 367 с.
2. Bemis, G. W.; Murcko, M. J. Med. Chem. 1996, 39, 2887.
3. V.K. Olkhovik, D.A. Vasilevskii, A.A. Pap, G.V. Kalechyts, Y.V. Matveienko, A.G. Baran, N.A. Halinouski, V.G. Petushok. // ARKIVOC – 2008. - Vol. IX. - p. 69-93.



**SYNTHESIS AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF QUATERNARY AMMONIUM SALTS  
BASED ON SUBSTITUTED BIPHENYLS**

Olkhovik V.K., Vasilevskii D.A., Matveienko Y.V., Petushok V.G., Zheldakova R.A. \*, Lysak V.V. \*

The Institute of Chemistry of New Materials National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus

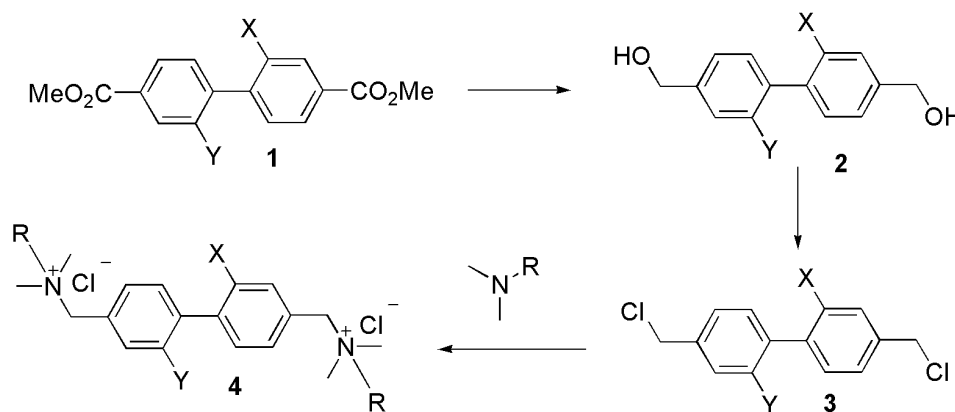
\*Biological Department of Belarusian State University, Minsk, Belarus.

e-mail: slavol@ichnm.basnet.by

The phenomenon of bacterial resistance stimulates a continuous search of new and new antiinfective chemicals [1]. Quaternary ammonium salts (QAS) still have a great potential as high effective, non-toxic, non-aggressive disinfectants. In a retrospective statistical analysis of privileged scaffolds of pharmacologically active molecules, the biphenyl was found to be present in 2.1% of reference drug molecules [2]. Thereupon QAS with biphenyl scaffold in molecular structure could be of very interest as new bactericides, in particular as new fungicides.

The goal of this research work was a search and elaboration of methods of synthesis of new quaternary ammonium salts with high fungicidal activity based on substituted biphenyls.

The QAS on the basis of 2- and 2,2'-substituted biphenyls were synthesized as depicted in the Scheme by reaction of corresponding 4,4'-bis(chloromethyl)biphenyls **3** with dimethylalkylamines.



The above-mentioned were obtained from esters of 2- and 2,2'-substituted 4,4'-biphenyldicarboxylic acids **1** as described in authors's work [3]. The reduction of esters **1** with LiAlH<sub>4</sub> in THF gave intermediate diols **2** with high yields and following treatment of them with thionyl chloride yielded the target bis(chloromethyl)biphenyls **3**. Boiling compounds **3** with excess dimethylalkylamines in acetonitrile gave the corresponding quaternary ammonium salts **4** in 90-95% yields.

The fungicidal activity of all synthesized compounds to nine families of fungi strains (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Trichoderma*) were investigated. The RF-factor of growth inhibition was in 20-100% interval when 100 µg/ml water solutions of QAS were used. Quaternary ammonium salts based on 2-alkoxy derivatives of biphenyl showed the highest, comparable with nystatin, activity (RF=80-100% for all strains).

**References:**

1. Krasilnikov A.P. Spravochnik po antiseptike. r. Minsk, Visshaya shkola. 1995. 367 c.
2. Bemis, G. W.; Murcko, M. J. Med. Chem. 1996, 39, 2887.
3. V.K. Olkhovik, D.A. Vasilevskii, A.A. Pap, G.V. Kalechyts, Y.V. Matveienko, A.G. Baran, N.A. Halinouski, V.G. Petushok. // ARKIVOC – 2008. - Vol. IX. - p. 69-93.



## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИД-ПЕРЕНОСЯЩЕГО ПЕПТИДА ИЗ СЕМЯН ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (*Nigella sativa* L.)

Ощепкова Ю.И.<sup>1</sup>, Рогожин Е.А.<sup>2</sup>, Вешкурова О.Н.<sup>1</sup>, Салахутдинов Б.А.<sup>1</sup>,  
Егоров Ц.А.<sup>2</sup>, Салихов Ш.И.<sup>1</sup>, Гришин Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академика А.С.Садыкова АН РУз, Ташкент, Республика Узбекистан  
e-mail: joshepkova05@rambler.ru

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии имени академиком М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия

В ходе эволюции растения выработали множество защитных механизмов для борьбы с патогенами и насекомыми-вредителями. Антимикробная активность *in vitro* была продемонстрирована для следующих типов соединений: разнообразные органические вещества (фитоалексины и фитоантисипины), PR-белки и антимикробные пептиды (АМП). Известно несколько семейств АМП растений (молекулярная масса менее 10 кДа), различающихся по пространственной структуре и расположению остатков цистеина в молекуле (так называемому «цистеиновому мотиву»). Одной из групп АМП, представляющих несомненный интерес, являются липид-переносящие белки (LTP) с молекулярной массой 8-10 кДа. Полагают, что LTP регулируют транспорт липидов из участков их синтеза в эндоплазматическом ретикулуме к другим органеллам, например, к хлоропластам и митохондриям. LTP содержат восемь остатков цистеина в консервативных положениях, образующих четыре внутрицепочечные дисульфидные связи. LTP являются альфа-спиральными белками, в которых четыре альфа-спиральных участка, соединенные между собой подвижными петлями, образуют гидрофобный карман, обеспечивающий взаимодействие с жирными кислотами и фосфолипидами. LTP играют важную роль в ответе растения на действие патогенов, высокую засоленность, засуху и низкие температуры. В частности, было показано, что LTP ячменя и тионины обладают синергетическим действием при подавлении роста бактериальных и грибных патогенов в инфицированных растениях.

Цель настоящей работы состояла в выделении и характеристике липид-переносящего белка (LTP) – из семян чернушки посевной *Nigella sativa* L. - однолетнего травянистого растения семейства лютиковые (Ranunculaceae). Известно, что растение обладает лекарственными свойствами и используется в пищевой промышленности. Нами была определена биологическая активность данных веществ по отношению к ряду фитопатогенных организмов – грибам и оомицетам. Методом флуоресценции изучено влияние выделенного белка на проницаемость модельных липидных мембран.

Разработана схема выделения методами жидкостной хроматографии нового полипептида, названного Ns-LTP1. Для данного вещества определены число остатков цистеина в молекуле, молекулярная масса, N-концевая аминокислотная последовательность и аминокислотный состав. Поиск гомологов в базе данных UniProt с использованием алгоритма BLAST показал, что данный полипептид относиться к антимикробным пептидам, к подсемейству 9-кДа липид-переносящих белков. Число остатков цистеина в молекуле Ns-LTP1 определяли по разности масс восстановленного и алкилированного (10 440 Да) и нативного белка (9602 Да). Обнаружено, что в молекуле Ns-LTP1 имелось 8 остатков цистеина; при алкилировании невосстановленного белка молекулярная масса LTP не изменилась, что означает, что в белке нет свободных SH-групп, а все 8 сульфгидрильных групп участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей. При исследовании антифунгальной активности Ns-LTP1 установлено, что выделенный белок эффективно подавлял прорастание конидий гриба *Fusarium oxysporum* и зооспорангиев оомицета *Phytophthora infestans* при IC<sub>50</sub> равной 60 мкг/мл и 115 мкг/мл, соответственно. Кроме того, Ns-LTP1 вызывал частичный лизис 8-12% зооспорангиев оомицета *Phytophthora infestans* в концентрации 115 мкг/мл. При исследовании противоопухолевой активности на клетках меланомы мышей КМЛ в культуре тканей, по включению H<sup>3</sup>-тимидина в ДНК клеток было обнаружено, что Ns-LTP1 подавляет рост меланомы мышей на 32%.

Для изучения влияния Ns-LTP1 на проницаемость модельных липидных мембран были сформированы липосомы, нагруженные флуоресцентным зондом, содержащим 8-аминонафталин-1,3,6-трисульфоновую кислоту (ANTS); и тушителем флуоресценции бромистым *l*-килол-бис-пиридином (DPX). При этом амплитуда флуоресценции полностью подавлялась тушителем, и на экспериментальной кривой не наблюдался пик испускания ANTS при его возбуждении в контрольном эксперименте, когда нет внешнего воздействия. Однако при добавлении Ns-LTP1, при наличии у них сродства к фосфолипидам, проницаемость липосом по отношению к ANTS может измениться и флуоресцентные молекулы, вытекая из липосом, разбавляются во внешней среде, что приводит к росту сигнала флуоресценции, поскольку уменьшается вероятность столкновения с молекулами тушителя. Согласно литературным данным Ns-LTP1 из различных источников не могут индуцировать увеличение проницаемости липосом по отношению к ANTS, инкапсулированных в липосомы, сформированных из цвиттер-ионных фосфолипидов, таких как ФХ. В то же время индуцируют проницаемость липосом, сформированных анионными фосфолипидами, такими как фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилглицерол (ФГ) или их смеси с ФХ, по отношению к флуоресцентной метке. Величина утечки липосом зависит как от структурных особенностей исследованного Ns-LTP1, так и от липидного состава сформированных липосом.

Исследованный Ns-LTP1, в зависимости от соотношения концентраций пептида к липиду (м/м) индуцирует проводимость липосом по отношению к флуоресцентному зонду.



## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА СКОРЛУПЫ ОРЕХА ГРЕЦКОГО (*JUGLANS REGIA*), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В КАЗАХСТАНЕ

Рахмадиева С.Б., Байсалова Г.Ж.

Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан  
e-mail: rakh.sluken@mail.ru

Одним из перспективных путей получения новых биологически активных веществ является выделение соединений из растений и их химическая модификация. В настоящее время исследования в этой области активно развиваются и направлены на поиск перспективных биологически активных природных соединений.

Представляют значительный научный и практический интерес растения рода орех (*Juglans L.*) семейства ореховые (*Juglandaceae*), имеющие 6 родов и около 60 видов, распространенных по всему свету, главным образом, в умеренных и субтропических областях северного полушария. В диком виде распространены на Кавказе и в Средней Азии. Растут по ущельям и речным долинам отдельно или группами, реже встречаются в виде небольших рощ. В СНГ из семейства *Juglandaceae* встречаются основных 4 вида – орех грецкий (*J. regia*), орех маньчжурский (*J. manschurika*), орех айлантолистный или Зибольда (*J. ailantifolia*), орех черный (*J. nigra*), в Казахстане произрастает только 2 вида: Орех обманчивый (*Juglans fallax Dode.*), орех грецкий (*J. regia*).

Растения рода *Juglans L.* издавна применялись в народной медицине для лечения желудочно-кишечных, туберкулезных, воспалительных заболеваний. Настой листьев и зрелые орехи полезны при склерозе мозговых и сердечных сосудов, для улучшения обмена веществ и снижения сахара в крови, профилактики и лечения атеросклероза, артериальной гипертензии, тахикардии, неврозах сердца.

Препараты ореха обладают бактерицидным, общеукрепляющим, противосклеротическим, вяжущим, противопаразитарным, слабительным, умеренно сахароснижающим, кровоостанавливающим, противовоспалительным, противоглистным, ранозаживляющим и эпителизирующим действием. В научной медицине применяют орех грецкий при геморрое, маточных, легочных, носовых и желудочно-кишечных кровотечениях. Препарат юглон (мази, суспензии, растворы) из ореха грецкого применяют при туберкулезе кожи, для уничтожения грибковой флоры, для лечения экземы, пародонтозе, воспалении лимфатических узлов, мышечных болях на почве ушибов и переломов. Экстракты, настои всех частей грецкого ореха в виде ванн назначают при истерии; эффективен он также при дизентерии, выпадении прямой кишки и отравлении ядовитыми растениями.

Орех грецкий (*J. regia*), широко произрастает и обладает достаточными запасами в регионах Южного Казахстана. Все органы растения содержат большое количество биологически активных веществ: кора - тритерпеноиды, стероиды, алкалоиды, дубильные вещества; листья- альдегиды, эфирное масло, алкалоиды, витамины С, РР, каротин, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды, антоцианы, хиноны, ароматические углеводороды; околоплодник – органические кислоты, витамин С, каротин, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, кумарины и хиноны. В зеленых орехах найдены витамины С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, РР, каротин. Лекарственным сырьем служат околоплодники, листья, зеленые и зрелые орехи.

Для исследования выбрана скорлупа грецкого ореха, являющаяся отходом пищевого производства. На основе скорлупы грецких орехов созданы высокоэффективные сорбенты, обладающие высокой сорбционной способностью и обеспечивающие непрерывную сорбцию по отношению к ионам кадмия 96%, меди 98%, никеля 60% и кобальта 86%. По химическому составу скорлупы ореха сведений в литературе нет.

Из результатов качественного анализа следует, что основными группами биологически активных веществ скорлупы грецкого ореха (*Juglans regia L.*) являются дубильные вещества гидролизуемого типа, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, кумарины. Для определения доброкачественности растительного сырья – скорлупы грецкого ореха нами были определены такие показатели, как потеря в массе при высушивании, зольность, экстрактивные вещества, примеси по методикам Государственной Фармакопеи XI издания. В зольном остатке методом атомно-абсорбционной спектроскопии определены микроэлементы и тяжелые металлы. В скорлупе ореха очень большое количество К, затем Са, Mg, Na, Fe.

С применением методов ГЖХ установлены аминокислотный и жирнокислотный составы исследуемых растений. Растение *Juglans regia L.* содержит 18 аминокислот, из которых в наибольшем количестве содержатся глутамин, аспарагин, аланин, пролин, лейцин, серин, аргинин и валин.

Качественный состав кислот (12 кислот в орехе) большей частью в орехе представлен линоленовой, олеиновой, стеариновой и пальмитиновой кислотами (85,3%), остальные кислоты являются минорными компонентами.

Были разработаны условные препараты из БАВ ореха, для которых выявлена антибактериальная, цитотоксическая (Научно-исследовательский центр химии (г. Карачи, Пакистан) и антиоксидантная (КТМА, г. Астана) активности.



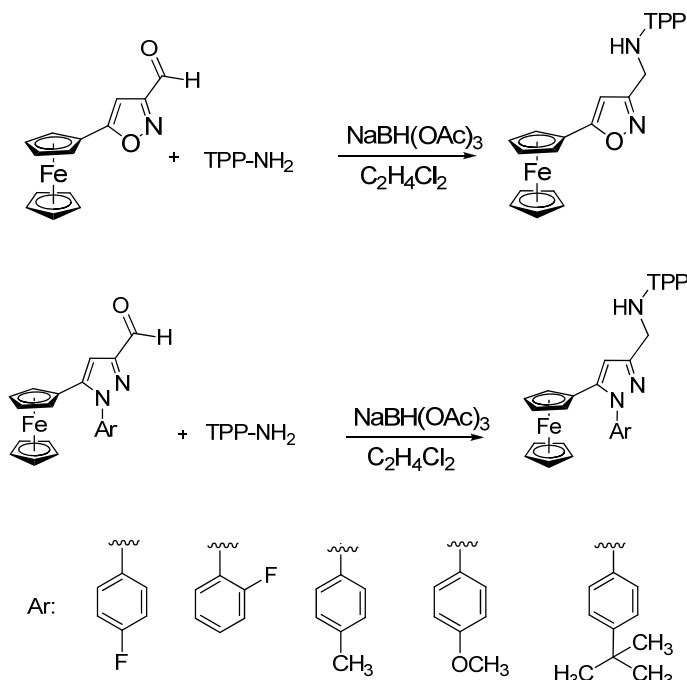
### СИНТЕЗ ФЕРРОЦЕНСОДЕРЖАЩИХ ПОРФИРИНОВ

Осипова<sup>1</sup> Е.Ю., Родионов<sup>1</sup> А.Н., Сименел<sup>1</sup> А.А., Качала<sup>2</sup> В.В.

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук, <sup>2</sup>Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского Российской академии наук, Москва, Российская Федерация  
e-mail: anel-86@mail.ru; alexsim@ineos.ac.ru

Известно, что соединения на основе пиразола проявляют различную биологическую (противоопухолевую, антибактериальную, противомикробную) активности. В то же время известно свойство порфиринов накапливаться в раковых клетках. Поэтому целью данной работы является синтез ферроценсодержащих порфиринов, для получения которых была использована реакция прямого восстановительного аминирования ферроценилформилпиразолами аминокпорфирина.

В качестве исходных ферроценовых соединений были выбраны формильные производные ферроценилизоксазола и ферроценилпиразолов. В качестве аминокпорфирина использовали аминоктетрафенилпорфирин (TPP-NH<sub>2</sub>).



Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума Российской академии наук «Поддержка молодых ученых», «Фундаментальные науки – медицине» и Отделения химии наук о материалах Российской академии наук «Биомолекулярная и медицинская химия» (проект 10 ОХ) и грант РФФИ № 06-03-32219.

#### Литература:

- Gribble G.W. Reactions of sodium borohydride in acidic media. Selective reduction of aldehydes with sodium triacetoxyborohydride / G.W. Gribble, D.C. Ferguson // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1975. – P. 535.
- Nutaitis C.F. Chemoselective reduction of aldehydes with tetra-*n*-butylammonium triacetoxyborohydride/ C.F. Nutaitis, G.W. Gribble // Tetrahedron Lett. – 1983. – Vol. 24. – P. 4287.
- C. P. Kordik Pyrazolecarboxamide Human Neuropeptide Y5 Receptor Ligands with In Vivo Antifeedant Activity / C. P. Kordik, Chi Luo, B. C. Zanoni, T. W. Lovenberg, S. J. Wilson, A. H. Vaidya, J. J. Crooke, D. I. Rosenthal and A. B. Reitz // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2001. – Vol. 11. – P. – 2287.



### THE SYNTHESIS OF FERROCENE CONTAINING PORPHYRINES

*Osipova*<sup>1</sup> E.Yu., *Rodionov*<sup>1</sup> A.N., *Simenel*<sup>1</sup> A.A., *Kachala*<sup>2</sup> V.V.

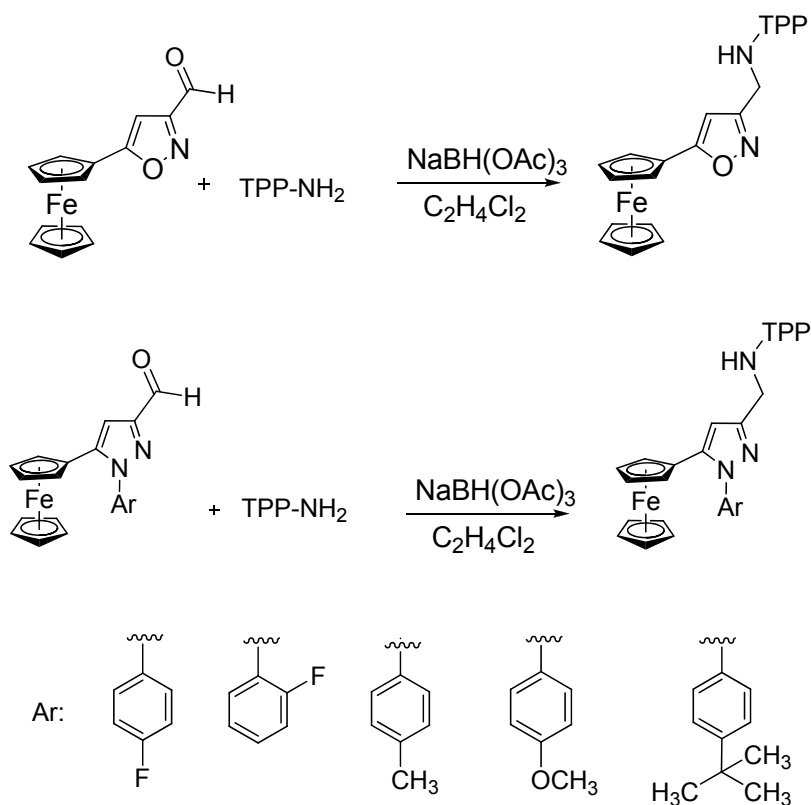
<sup>1</sup>A. N. Nesmeyanov Institute of OrganoElement Compounds, Russian academy of Sciences, Moscow, Russian federation

<sup>2</sup>N.D.Zelynski Institute of Organic Chemistry, Russian academy of Sciences, Moscow, Russian federation

e-mail: anel-86@mail.ru; alexsim@ineos.ac.ru

Pyrazole containing compounds are known to exhibit wide range of biological activity (antitumor, antibacterial, antimicrobial). At the same time various porphyrines easily accumulate in cancer cells. Thus, the aim of this work was to synthesize ferrocene containing porphyrines by reaction of reduction amination between ferrocenecarbaldehydes of porphyrinamine.

Formyl derivatives of ferrocenylisoxazole and ferrocenylpyrazoles were chosen as starting materials. Tetraphenylporphyrinamine (TPP-NH<sub>2</sub>) was used as aminocompound. Products of the reaction of reduction amination were obtained in moderate to high yields.



This work was partially supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Programms "Support for Young Scientists" and "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the department of Chemistry and Materials science (Project OX-09).

#### References:

- Gribble G.W. Reactions of sodium borohydride in acidic media. Selective reduction of aldehydes with sodium triacetoxyborohydride / G.W. Gribble, D.C. Ferguson // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1975. – P. 535.
- Nutaitis C.F. Chemoselective reduction of aldehydes with tetra-*n*-butylammonium triacetoxyborohydride/ C.F. Nutaitis, G.W. Gribble // Tetrahedron Lett. – 1983. – Vol. 24. – P. 4287.
- C. P. Kordik Pyrazolecarboxamide Human Neuropeptide Y5 Receptor Ligands with In Vivo Antifeedant Activity / C. P. Kordik, Chi Luo, B. C. Zanoni, T. W. Lovenberg, S. J. Wilson, A. H. Vaidya, J. J. Crooke, D. I. Rosenthal and A. B. Reitz // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2001. – Vol. 11. – P. – 2287.



## ОБРАЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ НА ОБЛУЧЕННОЙ МИНЕРАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

*Отроценко В. А.<sup>\*</sup>, Ткачевская Е. П.<sup>\*\*</sup>, Васильева Н. В.<sup>\*</sup>, Степина И. Е.<sup>\*\*</sup>*

<sup>\*</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

<sup>\*\*</sup>Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: elenatkachevskaya@yandex.ru

Вопросы изучения синтеза сложных биологически активных молекул из низкомолекулярных предшественников на твёрдой неорганической поверхности (минеральной матрице) привлекают внимание исследователей в связи с изучением абиогенного синтеза биополимеров (как одного из этапов добиологической эволюции), а также могут иметь практическое значение для разработки способов твёрдофазного синтеза соединений из классов олигонуклеотидов, пептидов и др.

Механизм конденсации нуклеотидов или аминокислот на облучённой твёрдой поверхности минералов до настоящего времени окончательно не выяснен, предполагается каталитическое воздействие кристаллической матрицы за счёт перераспределения в ней энергии, полученной при облучении и возможно, при участии радикалов, образующихся при распаде перекиси водорода, которая, в свою очередь, возникает при облучении молекул связанной воды в кристаллической решетке минеральной матрицы/

В настоящей работе была предложена и изучалась следующая модельная система процесса синтеза на облучённой минеральной матрице олигонуклеотидов и пептидов из мономеров нуклеозидмонофосфатов и аминокислот, соответственно. В качестве твёрдофазного минерального сорбента применяли вулканический пепел (извержение камчатского вулкана Толбачик, 1975-1976 гг.), химический состав которого представлен, в основном, алюмосиликатами. Облучение пепла проводилось в диапазоне 254-365 нм (лампа ДРЛ-400).

Проведено изучение адсорбционной способности нуклеозидфосфатов и аминокислот (на примере АМФ и фенилаланина) на вулканическом пепле в условиях предварительного облучения сорбента. Отмечено, что аминокислота фенилаланин сорбировалась на вулканическом пепле хуже АМФ. Исследования условия реакций конденсации, хроматографический и спектрометрический контроль продуктов позволили сделать вывод об образовании сложных молекул олигонуклеотидной и пептидной природы, которое катализируется как энергетическим переносом в облучённой минеральной матрице, так и активированными продуктами, образовавшимися при облучении из перекиси водорода.

Введение в модельную систему таких компонентов, как белки, ферменты, фотосенсибилизаторы проводилось с целью выявления механизма активации реакции конденсации (образования биополимеров). Обработка поверхности минеральных частиц каталазой, предварительно облученных УФ, (с использованием альбумина в качестве контроля) позволила предположить, что существенную роль в образовании молекул биологически активных соединений могла играть связанная вода. Поскольку фотосенсибилизатор тетрапиррольной природы, тетрафенилпорфирин (ТФП), не оказывал интенсифицирующего воздействия на процесс образования олигомеров на минеральной поверхности вследствие своей очень плохой адсорбции, то можно предположить, что вклад активных форм кислорода и других активных частиц, продуцируемых им в наших условиях, в механизмы протекания абиогенного синтеза был несущественен.



**FORMATION OF OLIGOMERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES  
ON IRRADIATED MINERAL SURFACE**

*Otroshchenko V.A. \*, Tkachevskaya E.P. \*\*, Vasilyeva N.V. \*, Stepina I.E. \*\**

\*A.N.Bach Institute of Biochemistry RAS

\*\*M.V.Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology,  
Department of Chemistry and Technology of Bioactive Substances  
e-mail: elenatkachevskaya@yandex.ru

Synthesis of biologically active molecules from low molecular precursors on solid mineral surface (mineral template) study draws attention of the researchers in accordance with biopolymer abiogenic synthesis study (as it is one of the prebiotic evolution stages). This study may also be of practical use to elaborate methods for solid-phase synthesis of compounds from oligonucleotides and peptides etc.

Nucleotides or amino acids condensation on irradiated mineral surface mechanism remains to be seen up to the present; it is assumed to conduct crystal template catalytic impact by means of its energy redistribution which is obtained by the process of active particles irradiation and/or interference. These active particles may for example originate on basis of peroxide that in return forms from water localized on the surface of mineral template while it is being irradiated.

The present report describes the following model system of oligonucleotides and peptides from nucleoside monophosphates and amino acids monomers synthesis process on irradiated mineral template. Volcanic ash (Kamchatka volcanic mountain Tolbachek eruption in 1975-1976) was used as solid-phase mineral sorbent as its chemical composition is described mainly by aluminosilicates. Radiation treatment was conducted in range 254-365 nm (DRL-400 lamp).

The research of nucleoside phosphates and amino acids (by the example of adenosine monophosphate and phenylalanine) adsorptive capacity on volcanic ash under the conditions of preliminary sorbent irradiation was conducted. Amino acid phenylalanine sorbed on volcanic ash inferior to adenosine monophosphate. The results of condensation conditions, chromatographic and spectrometric product control made it possible to draw a conclusion about the formation of compound oligonucleotides and peptides molecules that catalyze both by energy transferal in irradiated mineral template and activated products originated from irradiated peroxide.

In order to identify the activation condensation mechanism (biopolymer formation) such components as proteins, enzymes and photosensitizers were introduced into the model system. The process of mineral particles (preliminary irradiated by UV) surface dressing by catalase (using albumin to check) has allowed to assume that the associated water may have played an essential role in biologically active molecules formation. As the tetrapyrrolic photosensitizer, tetraphenylporphyrin (TFP), did not have a stimulating influence on the process of biologically active oligomer formation on the mineral surface then it may be assumed that the input of reactive oxygen species and other active particles produced by photosensitizer into the mechanisms of abiogenic synthesis progress was unessential.





## СТАБИЛЬНЫЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

Пархач М.Е. \*, Ольховик В.К., Матвеев Ю.В., Желдакова Р.А. \*

Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
\*Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь  
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by

Средства для дезинфекции и стерилизации, содержащие водорода пероксид (ВП), безопасны, экологичны, обладают хорошей очищающей способностью. Растворы ВП обладают свойством разрушать вещества белковой природы (кровяные и гнойные экссудаты, слизь, элементы некротических тканей и пр.), поэтому используются также в качестве средств предстерилизационной очистки различных поверхностей и изделий медицинского назначения от белковых загрязнений. Вместе с тем широкое их применение сдерживается низкой стабильностью: при длительном хранении и воздействии катализаторов ВП быстро разлагается, теряя «активный кислород», который, по-существу, и обуславливает дезинфицирующую и очищающую функцию.

Цель настоящей работы - поиск соединений, не только усиливающих антимикробные и очищающие свойства раствора водорода пероксида, но и замедляющих процесс разложения ВП при хранении. Четвертичные аммонийные соли (ЧАС), в частности на основе замещенных бифенилов, могут быть перспективными соединениями такого рода. Являясь катионными поверхностно-активными веществами, ЧАС концентрируются на мембране микроорганизмов и связываются с фосфатидными группами составляющих ее липидов, подавляя, таким образом, жизнедеятельность микроорганизмов. Как правило ЧАС хорошо растворимы в воде, обладают высоким моющим действием и представляло интерес изучение стабильности их композиций с ВП.

Исследование проводили на модельной реакции разложения ВП в водных растворах. Модельные смеси содержали ВП в концентрации 3% и добавки ЧАС различных концентраций. В условиях модельной реакции нами исследованы {2'-метокси-4'-[(триметиламмоний)метил][1,1'-бифенил]-4-ил}-N,N,N-триметилметанами-ниума дихлорид, N-[(4'-[диметил(октил)аммоний)метил][1,1'-бифенил]-4-ил)метил]-N,N-диметил-1-октанаминиума дихлорид, N-[(4'-[диметил(октил)аммоний)метил]-2'-метокси[1,1'-бифенил]-4-ил)метил]-N,N-диметил-1-октанаминиума дихлорид, 1-[4'-(1-пиридиiniumилметил)[1,1'-бифенил]-4-ил]метилпиридиiniumа дихлорид. В качестве растворов сравнения использовали раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> без добавок. Кинетические параметры реакции разложения ВП в модельных растворах представлены в таблице.

Кинетические параметры разложения ВП (3%) в присутствии ЧАС (0,05%)

ЧАС	Кинетические параметры разложения ВП			
	Период индукции (т), ч, 60°C	Константа скорости реакции по окончании периода индукции, ч <sup>-1</sup>		Энергия активации, кДж/моль
		к*10 <sup>4</sup> , 60°C	к*10 <sup>5</sup> , 50°C	
{2'-метокси-4'-[(триметиламмоний)метил][1,1'-бифенил]-4-ил}-N,N,N-триметилметанами-ниума дихлорид	672	0,604	1,49	94,1
N-[(4'-[диметил(октил)аммоний)метил][1,1'-бифенил]-4-ил)метил]-N,N-диметил-1-октанаминиума дихлорид	672	0,711	2,13	88,92
N-[(4'-[диметил(октил)аммоний)метил]-2'-метокси[1,1'-бифенил]-4-ил)метил]-N,N-диметил-1-октанаминиума дихлорид	840	0,555	0,853	129,45
1-[4'-(1-пиридиiniumилметил)[1,1'-бифенил]-4-ил]метилпиридиiniumа дихлорид	840	0,555	0,853	129,45
ВП без добавок (контроль)	отсутствует	2,31	12,16	57,32

Все исследованные ЧАС ингибируют процесс разложения ВП: в их присутствии наблюдается период индукции, значение энергии активации существенно больше энергии активации контрольного раствора. С целью оптимизации составов потенциальных дезинфицирующих средств была определена зависимость процесса разложения ВП от концентрации ЧАС. Установлено, что для соединений, ингибирующих разложение ВП, концентрационная зависимость не является однородной. Так, при увеличении концентрации ЧАС от 0% до 0,005% скорость разложения ВП возрастает в сравнении с контрольным раствором и достигает максимального значения при 0,005%, что характеризует процесс как каталитический. При дальнейшем увеличении концентрации ЧАС скорость разложения ВП уменьшается и достигает минимума при 0,05%.



### STABLE DISINFECTING COMPOSITIONS BASED ON HYDROGEN PEROXIDE AND QUATERNARY AMMONIUM SALTS

*Parhach M.E. \*, Olkhovik V.K., Matveienko Y.V., Zheldakova R.A. \**

The Institute of Chemistry of New Materials National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus.

\*Belarusian State University, Minsk, Belarus.

e-mail: slavol@ichnm.basnet.by

Disinfection and sterilization tools basis of hydrogen peroxide (HP) are safety, non-toxic, ecological pure and have good detergent ability. Solutions of HP possess to destruct albumens (blood, purulent effluent, mucus, elements of necrotic tissues, etc.) and therefore use as a tool of pre-sterilization treatment of different medical surfaces and instruments to remove protein contaminants. At the same time their large-scale application is restrained because of low stability of HP solutions and short shelf time.

The object of this work is a search of new compounds, which not only reinforce disinfection and cleanability of HP water solutions but also reduce the speed of HP decomposition during storing. Quaternary ammonium salts (QAS), in particular quaternary ammonium salts on basis of substituted biphenyls could be used as such kind agents. Being cationic surface-active materials QAS concentrate on cell membranes of bacterium, bind to phosphatide groups of membrane's lipids and in this way inhibit vital functions of microorganisms. As a rule, QAS are good soluble in water, have a strong cleanability and it was of interest to examine stability of their compositions with HP, which could be new strong disinfectants.

The investigations of QAS were carried out on the model reaction of decomposition of HP in water solutions. The model mixtures contained 3% of HP and 0,05% QAS. We tested N-[(4'-[dimethyl(octyl)ammonio]methyl-2'-methoxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl]-N,N-dimethyl-1-octanaminium dichloride, 2'-methoxy-4'-[(trimethylammonio)methyl][1,1'-biphenyl]-4-yl-N,N,N-trimethylmethanaminium dichloride, N-[(4'-[dimethyl(octyl)ammonio]methyl[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl]-N,N-dimethyl-1-octanaminium dichloride, 1-[4'-(1-pyridiniumylmethyl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methylpyridinium dichloride as QAS and 3% solution of HP in water without any additives as a control solution. The kinetic parameters of HP decomposition in model solutions are summarized in a table.

The kinetic parameters of HP decomposition in 3% water solution in presence of 0,05% QAS

QAS	The kinetic parameters of HP decomposition			
	Induction period ( $\tau$ ), h, 60°C	Reaction constant, h <sup>-1</sup>		Activation energy, kJ/mol
		k*10 <sup>4</sup> , 60°C	k*10 <sup>5</sup> , 50°C	
2'-methoxy-4'-[(trimethylammonio)methyl][1,1'-biphenyl]-4-yl-N,N,N-trimethylmethanaminium dichloride	672	0,604	1,49	94,1
N-[(4'-[dimethyl(octyl)ammonio]methyl[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl]-N,N-dimethyl-1-octanaminium dichloride	672	0,711	2,13	88,92
N-[(4'-[dimethyl(octyl)ammonio]methyl-2'-methoxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl]-N,N-dimethyl-1-octanaminium dichloride	840	0,555	0,853	129,45
1-[4'-(1-pyridiniumylmethyl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methylpyridinium dichloride	840	0,555	0,853	129,45
HP 3% (control)	Is absent	2,31	12,16	57,32

All investigated QAS were found to inhibit the process of HP decomposition in water solutions. The induction period and the activation energy of HP decomposition were essentially higher than for control. To optimize a composition of new potential disinfectants a concentration dependence of HP decomposition process was established. It was found that nature and speed of HP decomposition strongly depend on a concentration of QAS in solution. The speed of HP decomposition rose with the rise of QAS concentration in range of 0-0,005% that characterizes the HP decomposition within this concentration range as a catalytic process. The farther rise of QAS concentration produced a decrease of decomposition speed, which achieved minimum at 0,05%.



## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАД К ПИЩЕ "ЛЕЦИТИН В ТЮЛЕНЬЕМ ЖИРЕ"

*Петрова М.С., Боева Н.П.*

ФГУП "ВНИРО" Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,  
Москва, Россия e-mail: bav@vniro.ru

Известно, что тюлений жир и лецитин являются продуктами с широким спектром лечебно-профилактического действия. Физиологическая активность тюленьего жира определяется составом биологически активных полиненасыщенных омега-3 жирных кислот, способствующих снижению уровня холестерина в крови человека, профилактике и лечению гипертонии, атеросклероза, инсультов и инфарктов. Лечебный эффект лецитина связан с тем, что он является важным структурным элементом клеток мозга, ответственным за выработку ацетилхолина в организме человека. Показания к применению данного продукта являются: функциональные нарушения нервной деятельности, мозгового кровообращения, заболевания печени и почек, сердечно-сосудистые заболевания и атеросклероз.

В связи с этим, ФГУП "ВНИРО" была разработана биологически активная добавка (БАД) к пище на основе жира из подкожного сала тюленей с добавлением лецитина из мозга тюленя. Предполагается, что сочетание этих продуктов в определенной композиции будет способствовать расширению лечебно-профилактического эффекта жира из покровного сала и лецитина из мозга тюленей.

Нами разработана технология поэтапной экстракции лецитина из мозга тюленя, новизна которой подтверждена патентом РФ № 2309757 от 18.08.2007г и низкотемпературный способ получения жира из покровного сала тюленей.

Из-за невозможности смешивания лецитина с тюленьим жиром, предложено перевести тюлений жир в форму этиловых эфиров жирных кислот. В результате чего, получена БАД "Лецитин в тюленьем жире" со следующим содержанием компонентов: лецитина от 24 до 26%; эфиры жирных кислот из тюленьего жира от 74 до 76%, по внешнему виду представляющая собой маслянистую жидкость желтого цвета со слабым специфическим запахом, свойственным лецитину.

Жирнокислотный состав БАД (рис.1) представлен до 23% насыщенными кислотами, до 46% мононенасыщенными и до 30% полиненасыщенными жирными кислотами, из них свыше 18% биологически активные омега-3 жирные кислоты и свыше 5% эссенциальные жирные кислоты (витамин F). В составе основных жирных кислот БАД «Лецитин в тюленьем жире» в значимых количествах присутствуют кислоты (% от суммы кислот): олеиновая – свыше 17, пальмитолеиновая – свыше 16, докозагексаеновая – свыше 11, стеариновая – свыше 9, эйкозеновая – свыше 7, пальмитиновая – свыше 9, эйкозапентаеновая – свыше 7. Следует отметить, что значительное содержание ПНЖК омега -3 и пальмитолеиновой кислоты свидетельствует о высокой биологической ценности полученной БАД к пище.

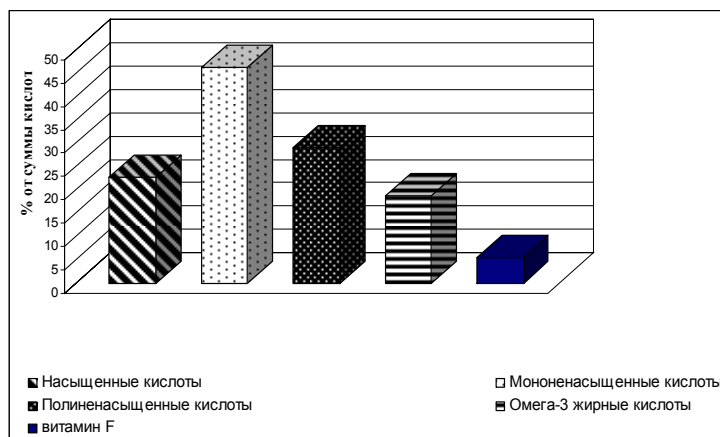


Рис. 1. Жирнокислотный состав БАД к пище "Лецитин в тюленьем жире"

Были изучены показатели безопасности и качества БАД к пище "Лецитин в тюленьем жире", которые соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 п. 173, 1.7.8.

БАД к пище "Лецитин в тюленьем жире" прошла в РАМН ГУ Медицинском радиологическом научном центре биологическое испытание на гемостимулирующую и радиозащитную активность.

Полученные результаты обосновывают перспективность применения протестированной БАД у онкологических больных после проведения курсов лучевой и химиотерапии для ускорения восстановления поврежденных клеточной и иммунной систем, а также для работающих в условиях производственных вредностей или значительного стресса.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### TECHNOLOGY FOR OBTAINING FOOD BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES " LECITHIN IN SEAL FAT "

*Petrova M.S., Boeva N.P.*

VNIRO, Moscow, Russia

e-mail: bav@vniro.ru

It is known that seal fat and lecithin are products with a wide spectrum of medicinal and prophylactic action. Physiological activity of seal fat is defined by a composition of biologically active polyunsaturated fatty acids Omega-3 promoting a decrease in the level of cholesterol in human blood, prophylaxis and treatment of hypertension, atherosclerosis, insults and heart attacks. Medical effect of lecithin is shown to be an important structural element of brain cells, responsible for the development of acetylcholine in the human organism. Indications for the application of given product are as follows: functional infringements of nervous activity, brain blood circulation, diseases of liver and kidneys, cardiovascular diseases and an atherosclerosis

In this connection scientists of VNIRO have developed food biologically active additives on the basis of fat from seal blubber with addition of lecithin from seal brain. It is expected that the combination of these products in a definite ratio will promote further expansion of the prophylactic effect of fat from seal blubber and lecithin from its brain.

Technology for obtaining lecithin from seal brain was developed and novelty its confirmed by patent 2309757 dated 18.08.2007.

Was as it impossible to mix lecithin with seal fat it was offered to transfer seal fat in to the form of ethyl ethers of fat acids. As a result the composition of food biologically active additives was received with the following structure: 24÷26% of lecithin and 74÷76% of ethers of fat acids from seal fat resembling in appearance oily liquid of yellow color with a weak specific smell characteristic to lecithin.

While studying composition of fatty acids in received food biologically active additives an increased content of oleinic, palmitoleic and docosahexaenic acids, was revealed, as well as a high content of polyunsaturated fatty acids over 30% from the total sum of acids, including up to 18% of biologically active acids Omega-3, suggesting a high biological value of food biologically active additives on the basis of fat of seal blubber with lecithin from its brain.



## **ДЖЕМЫ ИЗ LAMINARIA JAPONICA С ДОБАВЛЕНИЕМ СУКРАЛОЗЫ И ХРОМА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДИЕТИЧЕСКИЙ ПРОДУКТ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА**

*Петруханова А.В., Абрамова Л.С., Гершунская В. В.*

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ВНИРО)  
Россия, Москва  
e-mail: protein@vniro.ru

Бурая водоросль *Laminaria japonica* представляет собой естественный накопитель макро- и микроэлементов, избирательно поглощаемых из морской воды и аккумулируемых в тканях, содержит большое количество полисахаридов и органического йода. Полезные свойства ламинарии могут быть существенно усилены введением в её состав различных биологически активных веществ, способных оказывать профилактическое и лечебное действие. Однако анализ литературных данных показывает, что пищевых продуктов на основе ламинарии, обогащенных различными микронутриентами, и способных помимо профилактического эффекта удовлетворять запросам потребителя по вкусовым качествам, предложено не было.

Сахарный диабет - это заболевание, связанное с нарушением обмена веществ. Высокая частота этого заболевания в нашей стране определяет повышенный интерес медицинской общественности к проблемам его профилактики и лечения. Как известно, правильное диетическое питание при сахарном диабете имеет важнейшее значение. Так как большим сахарным диабетом необходимо ограничение легкоусвояемых углеводов, при изготовлении диетических продуктов для этой категории людей используют заменители сахара и подсластители. Также большую роль в регуляции углеводного и липидного обмена играет микроэлемент хром, который поддерживает нормальную толерантность к глюкозе и образует комплексное соединение с инсулином, более активное, чем свободный инсулин. Суточная потребность человека в хrome 50 – 200 мкг в сутки.

Для диетического питания больных сахарным диабетом разработан джем на основе ламинарии с добавлением подслащивающих веществ и хрома, в котором сочетаются биологически-активные вещества морской капусты (пищевые волокна, микронутриенты) и добавки, традиционно используемые в питании диабетиков.

Основным сырьем для приготовления джема служила сушёная или варёно-мороженая ламинария, отвечающая всем требованиям по показателям безопасности. Для улучшения вкусовых и ароматических свойств готовой продукции рекомендовано использование клюквы. В качестве подслащивающих веществ предложены неусвояемый синтетический подсластитель сукралоза, получаемый из сахара, а также натуральный экстракт травы стевии стевиозид и стевиозид с добавлением хелата хрома. Эти подсластители были выбраны, так как они не влияют на углеводный обмен, имеют приятный сладкий вкус, хорошо растворяются в воде и устойчивы при кулинарной обработке. Профиль вкуса интенсивных подсластителей не полностью совпадает с профилем вкуса сахара: сладость может наступать позже или раньше, сохраняться дольше или исчезать почти сразу, иметь более сильные или слабые, чем у сахара, горьковатый, солёный или другие оттенки вкуса. Поэтому для приближения профиля сладости в реальных продуктах используют смеси подсластителей с минимальным количеством сахара (не более 5 %). Хром был добавлен в продукт в виде комплекса хрома с гидролизатом молочного белка в количестве, соответствующем суточной потребности организма человека в хrome.

В лабораторных условиях были изготовлены образцы джемов с использованием выбранных подсластителей с различной концентрацией их в продукте. По органолептическим показателям, лучшим признан образец, содержащий 0,1 % сукралозы, 0,1 % хромсодержащей добавки, 5 % сахара и 1 % лимонной кислоты. Опытная партия джема, изготовленная в промышленных условиях, передана для проведения биологических испытаний в Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### **JAM FROM LAMINARIA JAPONICA WITH SUCRALOSE AND CHROMIUM IS A PROMISING DIATERY PRODUCT FOR PREVENTIVE TREATMENT OF DIABETIS**

*Petruhanova A.V., Abramova L. S., Gershunskaya V. V.*

«All-Russia fishery and oceanography scientific research institute» (AFOSRI)

Moscow, Russia

e-mail: [protein@vniro.ru](mailto:protein@vniro.ru)

The dietary product, which is intended for prevention and treatment of the diabetes, was created on the basis of the brown seaweed *Laminaria japonica* with unabsorbed sweetener sucralose, and also enriched by chromium microelement, necessary for the patients with this disease. In the course of study there were tested together with sucralose a natural extract of stevia steviasid plant and steviasid with helat chromium. Chromium was added in the product as a complex of chromium with hydrolysates of dairy protein in the quantity corresponding to the daily requirement of a body in chromium. In order to improve the flavor and aromatic properties of the product it was recommended to use cranberry. There was created an experimental batch of jam for dietary nutrition. At present this jam is being biologically tested.



## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОТИАЗОЛИЛ-1,2,4-ОКСАДИАЗОЛОВ

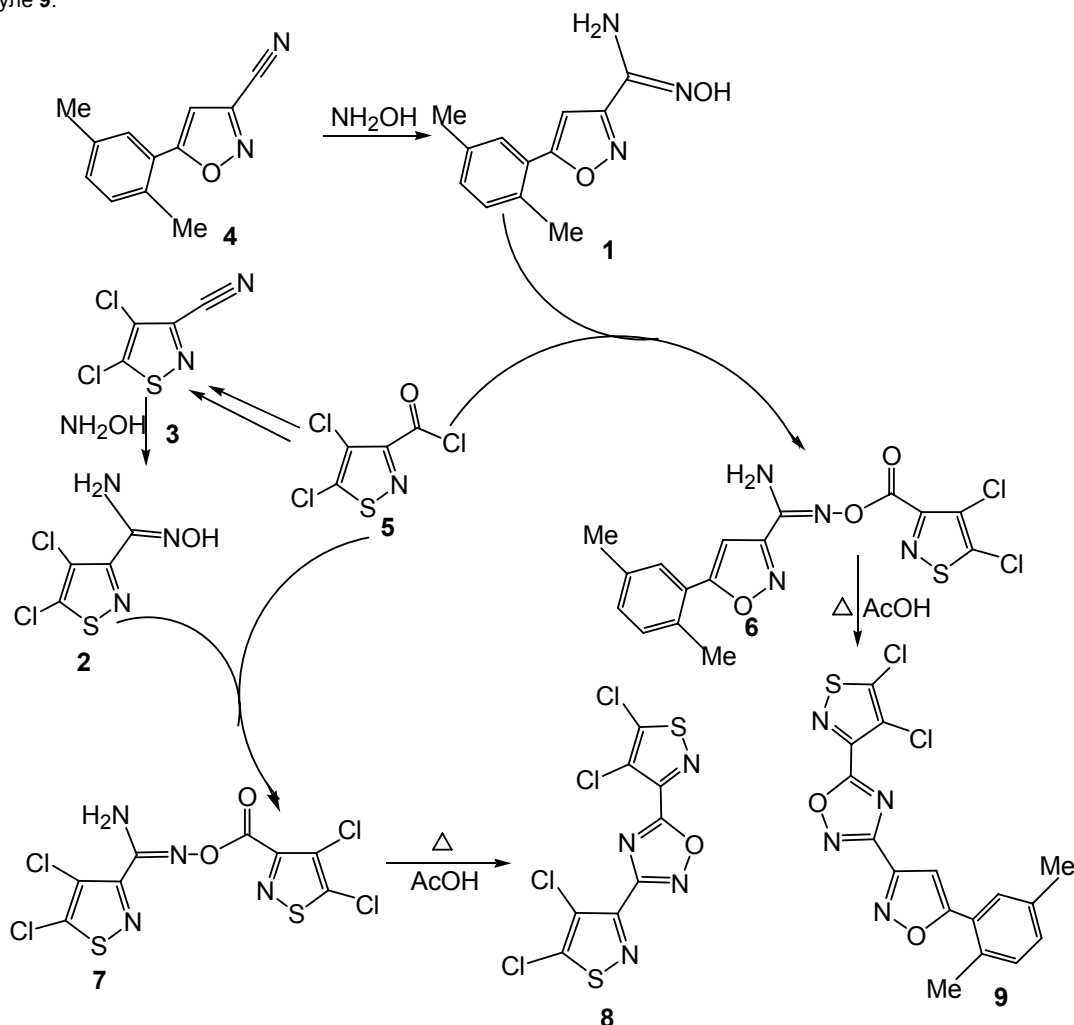
Поткин<sup>1</sup> В.И., Петкевич<sup>1</sup> С.К., Зубенко<sup>1</sup> Ю.С., Шилай<sup>1</sup> А.Г., Быховец<sup>2</sup> А.И.,  
Золотарь<sup>2</sup> Р.М., Гончарук<sup>2</sup> В.М.

<sup>1</sup> Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: bychow@iboch.bas-net.by

Изотиазольный и 1,2,4-оксадиазольный гетероциклы входят в состав большого числа биомолекул, что стимулирует устойчивый интерес к исследованиям в области синтеза новых производных этого класса веществ. Перспективными объектами для изучения биологического действия являются соединения, содержащие оба эти гетероцикла в одной молекуле.

Нами разработаны удобные методы синтеза замещенных изотиазолил-оксадиазолов. Был выбран подход к построению 1,2,4-оксадиазольного гетероцикла по схеме, включающей первоначальный синтез амидоксима изоксазольного **1** или изотиазольного рядов **2**. Синтез амидоксимов осуществляли взаимодействием соответствующих нитрилов **3,4** с гидросиламином. Амидоксимы ацилировали хлорангидридом 4,5-дихлоризотиазолкарбоновой кислоты **5**, и полученные соединения **6,7** далее подвергали гетероциклизации в уксусной кислоте. Таким образом были синтезированы изотиазолил-1,2,4-оксадиазолы **8,9**, в том числе содержащие 3 различных гетероцикла в одной молекуле **9**.



Ряд синтезированных соединений, их предшественников и производных проявил фунгицидную активность в отношении фитофтороза томатов и антракноза огурцов. Некоторые производные изотиазола обладали синергетическим действием в отношении колорадского жука в комбинациях с современными инсектицидами.



**SYNTHESIS AND THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF FUNCTIONALLY SUBSTITUTED  
ISOTHIAZOLYL-1,2,4-OXADIAZOLES**

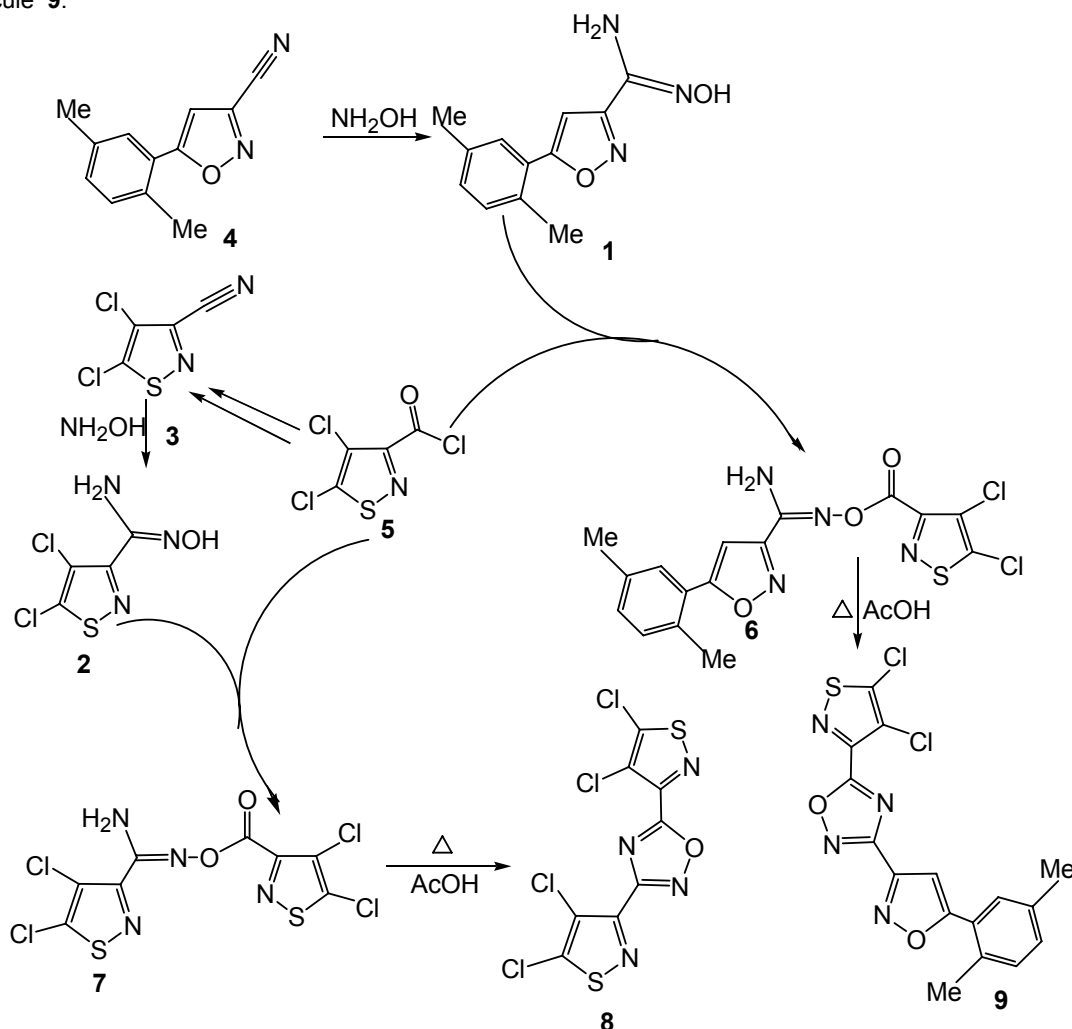
Potkin<sup>1</sup> V.I., Petkevich<sup>1</sup> S.K., Zubenko<sup>1</sup> Yu.S., Shilay<sup>1</sup> A.G., Bykhovets<sup>2</sup> A.I., Zolotar'<sup>2</sup> R.M., Goncharuk<sup>2</sup> V.M.

<sup>1</sup> Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of the Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

<sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of the Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
e-mail: bychow@iboch.bas-net.by

Isothiazole and 1,2,4-oxadiazole heterocycles form of the large number of biomolecules, which stimulates steady interest in investigations of the synthesis of new derivatives this class of substances. Important objects for studying the biological effect are the compounds containing both these of heterocycle in one molecule.

We developed the convenient methods for synthesis of substituted isothiazolyl-oxadiazoles. For the construction of 1,2,4-oxadiazole heterocycle the pathway was selected including the initial synthesis of amidoxime isoxazole **1** or isothiazol **2**. The synthesis of amidoximes was realized by interaction of corresponding nitriles **3,4** with hydroxylamine. Then amidoximes were acylated by of 4,5-dichloroisothiazol carboxylic acid **5** chloride. Compounds **6,7** obtained were further subjected heterocyclization in acetic acid. By such way the isothiazolyl-1,2,4-oxadiazoles **8,9** were synthesized, including those containing 3 different heterocycles in one molecule **9**.



A number of the compounds synthesized, their precursors and derivatives has shown the fungicidal activity with respect to the tomatoes phytophthora and cucumbers anthracnose. Some derivatives of isothiazole possessed synergism in the mixtures with the contemporary insecticides with respect to Colorado beetle.





## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОНДЕНСИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ НА ОСНОВЕ ФЕРРОЦЕНИЛПИРАЗОЛОВ

<sup>a</sup>Родионов А.Н. , <sup>a</sup>Сименел А.А. , <sup>b</sup>Качала В.В.

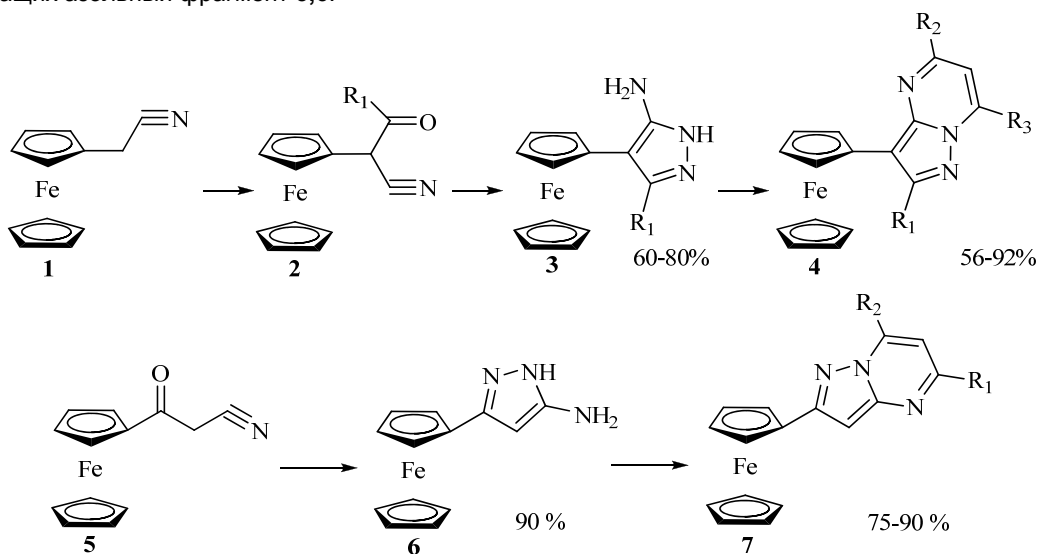
<sup>a</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

<sup>b</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

e-mail: rodalex@ineos.ras.ru

Соединения, содержащие ферроцен, являются новым перспективным классом биомолекул. Ферроцен в них может быть биомаркером, хромофорной группой, редокс меткой, а также каталитическим центром. Ферроценилпирозолы обладают противомикробной[1], антипаразитарной[2] и противоопухолевой активностями[3].

Целью работы является синтез новых, потенциально биологически активных ферроценилконъюгатов, содержащих азольный фрагмент **3,6**.



Структура полученных соединений была установлена методом ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , а также при использовании гетероядерной корреляции на ядрах  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ .

Планируется использование этих компонентов в качестве биологических добавок.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума Российской академии наук «Поддержка молодых ученых», «Фундаментальные науки – медицине» и Отделения химии наук о материалах Российской академии наук «Биомолекулярная и медицинская химия» (проект 10 ОХ) и РФФИ № 06-03-32219*

### Литература:

1. L.V. Snegur, Yu.S. Nekrasov, N.S. Sergeeva, Zh.V. Zhilina, V.V. Gumenyuk, ZA. Starikova, A.A. Simenel, N.B. Morozova, I.K. Sviridova, V.N. Babin, Appl. Organomet. Chem., 2008, 22, 139.
2. L. Cecchi, F. Melani, G. Palazzino, G. Filacchioni, G.C. Porretta, Farmaco, 1984, 39, 888.
3. A.A. Bekhit, H.T.Y. Fahmy, S.A.F. Rostom, A.M. Baraka, Eur. J. Med. Chem., 2003, 38, 27.



## SYNTHESIS AND PROPERTIES OF CONDENSED HETEROCYCLES FROM FERROCENYLPYRAZOLES

Rodionov<sup>a</sup> A.N., Simenel<sup>a</sup> A.A., Kachala<sup>b</sup> V.V.

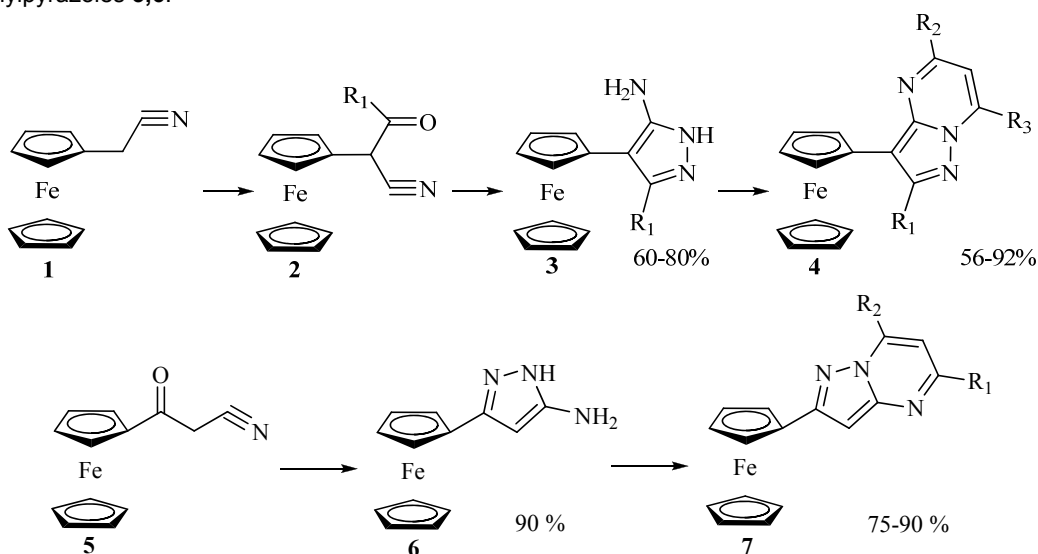
<sup>a</sup>A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia.

<sup>b</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry of Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia.

e-mail: rodalex@ineos.ras.ru

Ferrocene containing compounds are the novel perspective class of biomolecules. Ferrocene serves as biomarker, redox-marker or catalytic centre. Ferrocenepyrazole derivatives exhibit various bioactivity (antibacterial [1], anti-parasitic [2] and antitumor[3])

The aim of this work is the synthesis of new potentially bioactive ferroceneconjugates on the basis of ferrocenylpyrazoles **3,6**.



The structures of compounds have been assigned on the basis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C heteronuclear correlations.

We are planning to investigate these compounds as biologically active components.

*This work has been partially supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Programs "Support for Young Scientists" and "Fundamental sciences – for medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Project 10), by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 06-03-32219).*

### References:

1. L.V. Snegur, Yu.S. Nekrasov, N.S. Sergeeva, Zh.V. Zhilina, V.V. Gumenyuk, Z.A. Starikova, A.A. Simenel, N.B. Morozova, I.K. Sviridova, V.N. Babin, *Appl. Organomet. Chem.*, 2008, 22, 139.
2. L. Cecchi, F. Melani, G. Palazzino, G. Filacchioni, G.C. Porretta, *Farmaco*, 1984, 39, 888.
3. A.A. Bekhit, H.T.Y. Fahmy, S.A.F. Rostom, A.M. Baraka, *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38, 27.



## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *PORPHYRIDIUM CRUENTUM* (Näg) CNM-AR-01 В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ЭЙКОСАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Рудь Л.Б., Чепой Л.Е., Кожокарь А.И., Кельменчук В.Б., Дони В.А.

Институт микробиологии и Биотехнологии Академии наук Молдавии, Кишинев, Молдавия  
e-mail: microbiotech@yahoo.com

Полиненасыщенные жирные кислоты (эйкосапентаеновая 20:5n-3 (ЭПК) и арахидоновая 20:4n-6 (АРК)) являются перспективными для использования в пищевой и фармацевтической промышленности. Так, ЭПК обладает защитными свойствами в случае патологий сердечнососудистой системы и метаболических отклонений. В последнее время опубликовано много научных работ посвященных использованию микроводорослей в качестве источников полиненасыщенных жирных кислот. *Porphyridium cruentum* является перспективным источником полиненасыщенных жирных кислот, в частности эйкосапентаеновой. Цель настоящей работы состояла в разработке способов стимулирования синтеза ЭПК штаммом *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01, хранящимся в Молдавской Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов. Разработанные технологии основаны на сочетании химических и физических факторов, стимулирующих накопление полиненасыщенных жирных кислот. В качестве химических стимуляторов синтеза полиненасыщенных жирных кислот микроводорослью порфиридиум были использованы некоторые координационные соединения Zn(II) с аминокислотами. Температурный фактор был применен в качестве модификатора активности десатуразы и направления биосинтеза в сторону накопления ЭПК.

Было доказано, что сокращение времени культивирования позволяет получить обогащенную эйкосапентаеновой кислотой биомассу порфиридиума. Другим путем увеличения количества полученной ЭПК является увеличение продуктивности микроводоросли, биомасса которой содержит стандартное количество этого компонента.

В качестве стимуляторов были использованы координационные соединения Zn(II) с  $\alpha$  – изомерами глицина, аланина и серина типа  $[Zn(A)_2]$  и  $[Zn(A,B)]$ .

Полученные результаты доказывают возможность применения координационных соединений цинка с аминокислотами в биотехнологии культивирования порфиридиума. Соединения, которые обеспечивают максимальный уровень продуктивности и липидогенеза у микроводоросли, обеспечивают получение ЭПК двумя путями: усилением синтеза ЭПК и увеличением продуктивности объекта. Соединения, усиливающие липидогенез без увеличения продуктивности порфиридиума, могут быть использованы в целях получения биомассы с высоким содержанием арахидоновой кислоты.

Стимулирующий эффект химических соединений, используемых в целях усиления синтеза биологически активных веществ, зависит от многих внешних факторов, таких как температура, радиация, продолжительность культивирования и др.

Разработанные технологии направленного синтеза эйкосапентаеновой кислоты основываются на следующих постулатах:

Возможность увеличения количества ЭПК в биомассе за счет арахидоновой, путем снижения температуры культивирования, которая запускает механизмы десатурации;

Возможность увеличения процентного содержания ЭПК в биомассе за счет остановки процесса культивирования на фазе экспоненциального роста в целях предотвращения процесса накопления арахидоновой кислоты.

Были разработаны два способа направленного синтеза ЭПК порфиридиумом. Согласно первому способу культивирование микроводоросли проводится в среде с 2,5 мг/л  $[Zn(D,L-ala)_2]$  при температуре 20°C в течение 96 часов. Применение данного способа позволяет получить около 5 г/л биомассы, содержащей 1,23% ЭПК. По второму способу культивирование порфиридиума проводится в течение 72 часов на среде с 13,25 мг/л  $[Zn(D-ala)_2]$ . В результате получаемая биомасса содержит 1,18% ЭПК.

Следует отметить, что разработанные технологии культивирования *Porphyridium cruentum* позволяют увеличить положительный эффект координационных соединений цинка на 32-34%, а получаемое содержание эйкосапентаеновой кислоты практически в 2 раза больше, чем в случае применения традиционной технологии.

Таким образом, можно сказать, что исследуемые координационные соединения цинка с аминокислотами проявляют стимулирующее действие на продуктивность и липидогенез у *Porphyridium cruentum*. Одновременное увеличение этих двух показателей свидетельствует об увеличении содержания компонентов фотосинтетических мембран клетки. Соединения с D,L – аланином способствуют увеличению продуктивности и уровня липидогенеза, накоплению эйкосапентаеновой кислоты. Эти же соединения способствуют биосинтезу арахидоновой кислоты - предшественника ЭПК и дают дополнительные возможности увеличения содержания активного вещества в биомассе порфиридиума.



**BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF UTILIZATION OF RED ALGAE PORPHYRIDIUM CRUENTUM (NAG) CNM-AR-01 AS A SOURCE OF EICOSAPENTAENOIC ACID**

Rudi L., Cepoi L., Cojocari A., Chelmenciuc V., Doni V.

Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM  
e-mail: microbiotech@yahoo.com

Polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic acid, 20:5n-3 (EAP) and arachidonic acid, 20:4n-6 (ARA) have perspective for use in the food and pharmaceutical industries. So, ARA has protective properties in the case of cardiovascular diseases and metabolic aberrations. Recently published scientific researches contain the information on the use of microalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Porphyridium cruentum* microalgae is a potential source of polyunsaturated fatty acids, in particular EPA. The scope of effectuated investigation was the elaboration of some methods of stimulating the EPA synthesis by strain *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 included in the Moldovian National Collection of Non-Pathogenic Microorganisms. The elaborated technologies are based on the combination of chemical and physical factors for the stimulation of polyunsaturated fatty acids biosynthesis. The some coordination compounds of Zn (II) with amino acids have been used as chemical stimulators for polyunsaturated fatty acids biosynthesis. The thermic factor has been used as a modifier of desaturase activity and redirection of EPA synthesis.

It was demonstrated that cultivating time reducing goes to obtaining of the *Porphyridium cruentum* biomass enriched in eicosapentaenoic acid.

Another way of increasing of EPA quantity is the stimulation of *Porphyridium cruentum* productivity, which in one's part goes to eicosapentaenoic acid accumulation.

The coordination compounds of Zn(II) with glycine and alanine and serine  $\alpha$ -stereoisomers of  $[Zn(A)_2]$  and  $[Zn(A,B)]$  types were investigated as stimulators.

It was demonstrated that coordination compounds of Zn(II) with aminoacids could be used in the biotechnology of *Porphyridium cruentum* cultivation. Compounds which assure maximal increasing of productivity and lipidogenesis have been used for biomass with high content of EPA obtaining by 2 ways: the increasing of eicosapentaenoic acid synthesis and increasing of productivity of biomass in which EPA is on optimal level. Compounds stimulators of lipids accumulation without productivity increasing could be utilized for the scope of *Porphyridium cruentum* biomass obtaining with high content of arachidonic acid.

Experiments with biotechnological objects very often demonstrate the stimulator effect of utilized compounds with the aim to increase bioactive remedies synthesis which depends on other factors, like temperature, irradiance, cultivating duration etc.

The elaborated procedures of EPA direct synthesis are going from the following:

Possibility to increase of eicosapentaenoic acid quantity in biomass in the base of arachidonic acid by the reducing of cultivating temperature, which induces desaturation.

Possibility to obtain a high percent of EPA in the base of processes stopping in the exponential growth phase for the scope to prevent arachidonic acid depositing.

Two procedures of stimulation of EPA accumulation have been elaborated. Thus, one of the elaborated methods includes the supplementation of cultivating medium with  $[Zn(D,L-ala)_2]$  compound in concentration of 2,5 mg/l, cultivating temperature 20°C and cultivating time 96 hours. The application of this method permits to obtain 5,19 g/l of biomass with content of EPA - 1,23%. Other method of *Porphyridium cruentum* cultivating presupposes the supplementation of cultivating medium with  $[Zn(D-ala)_2]$  compound in concentration 13,25 mg/l and cultivating time reducing up to 72 hours. During this method using was obtained the biomass with 1,18% of EPA.

As conclusion must be mentioned that application of biotechnological procedures for *Porphyridium cruentum* cultivation can assure the obtaining of microalgal biomass with high content of EPA that is 32-74% more than the stimulator effect of coordination compounds used separately; and the level of eicosapentaenoic acid is practice two times more in comparison with control samples.

So, coordination compounds of zinc with amino acids manifest the stimulator effect on productivity and lipidogenesis of *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01. Simultaneously increasing of both data determinates of acids quantity increasing in photosynthetic membranes composition. The compound with D,L- alanine led to the increase of productivity, lipidogenesis and eicosapentaenoic acid quantity. Parallel mentioned compound intensifies the biosynthesis of precursor - arachidonic acid, and offers in such way the possibility of the increasing of active products quantity.



## СИНТЕЗ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ КАРБОРАНОВ

Рудаков<sup>1</sup> Д.А., Дикусар<sup>1</sup> Е.А., Поткин<sup>1</sup> В.И., Ювченко<sup>2</sup> А.П., Бей<sup>2</sup> М.П.,  
Козлов<sup>1</sup> Н.Г., Зверева<sup>1</sup> Т.Д., Желдакова<sup>3</sup> Р.А.

<sup>1</sup>Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: evgen\_58@mail.ru

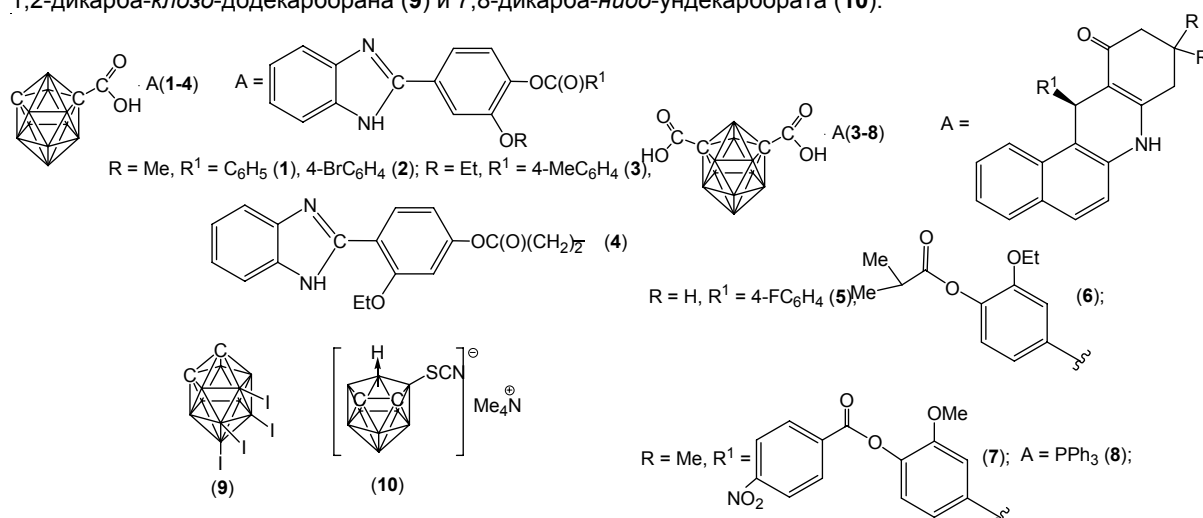
<sup>2</sup>Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: mixa@ichnm.basnet.by

<sup>3</sup>Белгосуниверситет, Минск, Беларусь

Азотсодержащие производные карборанов представляют интерес для фармакокинетических исследований в области борнейтронозахватной терапии опухолевых заболеваний, радионуклидной диагностики и терапии - новой технологии лучевой терапии опухолевых заболеваний. Эта технология разработана для избирательного воздействия на опухоль и является бинарной технологией, использующей тропные к опухоли препараты, содержащие нуклиды (<sup>10</sup>B или <sup>157</sup>Gd и другие), которые, поглощая нейтроны, образуют вторичное излучение, губительное для опухолевых клеток. В отличие от традиционной лучевой терапии, наведение на цель выполняется, прежде всего, избирательной концентрацией препаратов в опухоли, а не нацеливанием нейтронного пучка. Поиск путей синтеза широкой серии карбораносодержащих соединений, пригодных для этих целей, стимулирует исследования в этом направлении [1,2].

Нами синтезированы аминовые соли *m*-карборан-*C*-карбоновой- (1-4) и *m*-карборан-1*C*,7*C*-дикарбоновой кислот (5-8) и некоторых гетероциклических азотсодержащих соединений (1-7), а также производные

1,2-дикарба-клого-додекарборана (9) и 7,8-дикарба-нидо-ундекарбората (10).



Синтезированные борсодержащие кластеры, представляют интерес в качестве перспективных противоопухолевых препаратов. Они также были исследованы и на фунгицидную активность. Эти соединения полностью ингибируют или существенно замедляют рост мицелия штаммов грибов *Alternaria alternate*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*, *Penicillium lividum*, *Trichoderma viridae* при концентрации 100 мкг/мл. Кроме того, соединение (10) проявило значительную противомикробную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* и *Mycobacterium smegmatis*.

### Литература:

- Soloway A. H., Tjarks W., Barnum B. A., Rong F.-G., Barth R. F., Codogni I. M., Wilson J. G. *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. N 4. P. 1515.
- Hawtorne M..F., Maderna A. *Chem. Rev.* 1999. Vol. 99. N 12. P. 3421.



## SYNTHESIS AND THE FUNGICIDAL ACTIVITY OF DERIVED CARBORANES

Rudakov<sup>1</sup> D.A., Dikumar<sup>1</sup> E.A., Potkin<sup>1</sup> V.I., Yuvchenko<sup>2</sup> A.P., Bey<sup>2</sup> M.P.,  
Kozlov<sup>1</sup> N.G., Zvereva<sup>1</sup> T.D., Zheldakova<sup>3</sup> R.A.

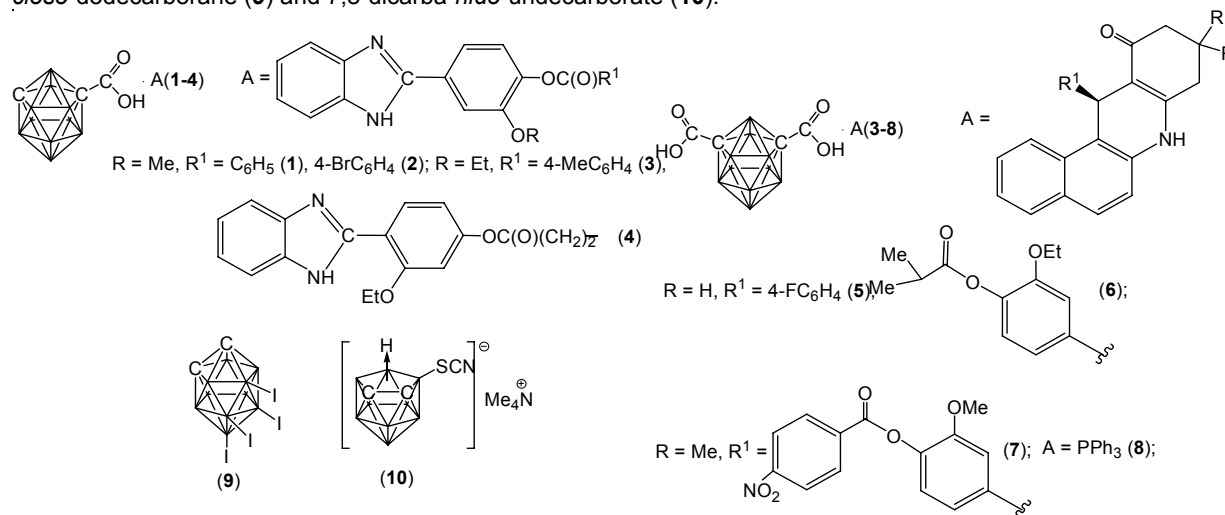
<sup>1</sup>Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of the Sciences of Belarus', Minsk, Belarus  
e-mail: evgen\_58@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Chemistry of the New Materials of the National Academy of the Sciences of Belarus', Minsk, Belarus e-mail:  
mixa@ichnm.basnet.by

<sup>3</sup>Belgosuniversitet, Minsk, Belarus

The nitrogen-containing derivatives of carboranes present interest for pharmacokinetic studies in the field of the bor-neutron capture therapy of tumor diseases, radionuclides diagnostics and therapy - the new technology of the radiation therapy of tumor diseases. This technology is developed for the selective action on the tumor and is the binary technology, which uses the tropic to the tumor preparations, which contain the nuclides (<sup>10</sup>B or <sup>157</sup>Gd, etc.), which, absorbing neutrons, form secondary radiation, disastrous for the tumor cells. In contrast to the traditional radiation therapy, the guidance to the target is carried out, first of all, by the selective concentration of preparations in the tumor, but not by aiming neutron beam. The search for the ways of the synthesis of a wide series of the carborane-containing compounds, suitable for these purposes, stimulates studies in this direction [1,2].

We synthesized amine salts of *m*-carborane-*C*-carboxylic- (1-4) and *m*-carborane-1*C*,7*C*-dicarboxylic acids (5-8) and of some heterocyclic nitrogen-containing compounds (1-7), and also the derivatives of 1,2-dicarba-closo-dodecarborane (9) and 7,8-dicarba-*nido*-undecarborate (10).



The synthesized boron-containing clusters, are of interest as the promising anti-tumor preparations. They were also investigated also to the fungicidal activity. These compounds completely inhibit or significantly slow down an increase in the mycelium of the strains of fungi *Alternaria alternate*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*, *Penicillium lividum*, *Trichoderma viridae* with the concentration 100 µg/ml. Furthermore, compound (10) appeared significant antimicrobial activity with respect to strains *Staphylococci saprophyticus*, *Staphylococci aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* and *Mycobacterium smegmatis*.

### Literature:

- Soloway A. H., Tjarks W., Barnum B. A., Rong F.-G., Barth R. F., Codogni I. M., Wilson J. G. *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. N 4. P. 1515.
- Hawtorne M..F., Maderna A. *Chem. Rev.* 1999. Vol. 99. N 12. P. 3421.



## ГЕОМЕТРИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ АНАЛИЗА 3D СТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В ЗАДАЧАХ «СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ»

Рыжов А.Н., Смоленский Е.А., Маслова Л.К., Чуваева И.В.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
Москва, Россия  
e-mail: antryzh@narod.ru

Предложен новый способ («метод треугольников») описания 3D структуры молекул, а также твердых поверхностей с учетом их пространственной геометрии, различающий конформационные изомеры и стереоизомеры. Новые формулы позволяют использовать известные подходы к решению задач «структура-свойство» и «структура-активность» для больших молекул. Кроме того, они открывают новые возможности для описания твердых каталитических поверхностей и решения задач «структура-каталитическая активность». Формулы основываются на учете всех пространственно-ориентированных троек атомов  $(i, j, k)$ , определяющих треугольник. Рассмотрим вершину треугольника  $i$  и векторы  $\vec{V}_{ij} = \vec{V}_i - \vec{V}_j$  и  $\vec{V}_{ik} = \vec{V}_i - \vec{V}_k$ , являющиеся элементами  $i$ -ой строки матрицы геометрических расстояний (МГР). Можно перейти к описанию геометрии молекулы в терминах матрицы треугольников:

$$\left\{ \bar{\Delta}_{ijk} \right\}_{i \neq j \neq k} : \bar{\Delta}_{ijk} = \frac{1}{2} [\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}] = \Delta_{ijk} \bar{n}_{ijk}; \Delta_{ijk} = \frac{1}{2} |\vec{V}_{ij}| |\vec{V}_{jk}| \sin \gamma; \bar{n}_{ijk} = \frac{[\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}]}{|\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}|}$$

Поскольку треугольник определяется векторным произведением, это автоматически предполагает ориентацию плоскости треугольника в пространстве, т.е. существует 3 набора индексов с одним направлением вектора нормали  $\bar{n}_{ijk}$  и 3 набора с противоположным. Из матрицы треугольников можно выбрать внешние или внутренние треугольники согласно следующему правилу. Рассмотрим все атомы  $m \neq i, j, k$ : треугольник  $\bar{\Delta}_{ijk}$  - внешний, если  $\forall m \neq i, j, k$  и  $\ell = i, j, k$ :  $(\bar{n}_{ijk} \vec{V}_{\ell m}) < 0$ ; для троек атомов, расположенных на одной прямой,  $\bar{n}_{ijk}$  определяется как вектор, перпендикулярный этой прямой, на которой расположен его конец, а начало которого находится в центре масс молекулы.

Заменяя в матрице  $\left\{ \bar{\Delta}_{ijk} \right\}$  внутренние треугольники нулями, мы получим матрицу внешних треугольников  $\left\{ \bar{\Delta}_{ijk}^{ex} \right\}$ . В эту матрицу один и тот же внешний треугольник  $(i, j, k)$  входит уже 3 раза. Таким образом, мы определяем геометрическую структуру поверхности. Обычно активность молекулы определяется небольшим участком, комплементарным субстрату. Этот участок (к-комплекс) состоит из  $k$  взаимориентированных треугольников. Выделить треугольники, входящие в к-комплекс, можно

рассматривая матрицу размером  $\left[ M \times \sum_{m=1}^M C_{N_m}^k \right]$  чисел вхождения  $a_{lm}$  каждого типа треугольников к-комплекса в соединения выборки активных и неактивных веществ  $P_m$  ( $m \in (1, M)$ ), где  $a_{lm}$

( $m \in (1, M)$ ,  $l \in (1, \sum_{m=1}^M C_{N_m}^k)$ ) – число вхождения к-комплекса с номером  $l$  в  $m$ -ое соединение (с учетом конформационной изомерии),  $M$  – число соединений,  $N_m$  – число треугольников,  $L_m$  в  $m$ -ом

соединении, общее число треугольников:  $N = \sum_{m=1}^M N_m$ . При этом следует руководствоваться правилом:

ни один треугольник того же типа, что и содержащийся в неактивном соединении, не может входить в состав к-комплекса. Оставшиеся немногочисленные треугольники (предположительно, входящие в состав к-комплекса; число их, как показано на выборке из каштаносперминов, протестированных на антиспидовую активность [G.W.J. Fleet et al. FEBS Letters. 1988. V. 237. № 1-2. P. 128-132], как правило, меньше числа активных соединений) используются для построения аддитивной схемы расчёта биологической активности.


**GEOMETRICAL APPROACH FOR ANALYZING 3D STRUCTURES OF ACTIVE BIOMOLECULES IN  
«STRUCTURE-ACTIVITY» PROBLEM**

Ryzhov A.N., Smolenskii E.A., Maslova L.K., Chuvaeva I.V.

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry (ZIOC RAS),  
Moscow, Russia  
e-mail: antryzh@narod.ru

We suggest a new way ("the method of triangles") to describe 3D molecule structures and solid surfaces with account their spatial geometry making the difference between stereo and conformational isomers. The new formulas allow using well-known procedures of the "structure-property" and "structure-activity" problems for large molecules. Furthermore, the method clears the novel ways of circumscribing solid surfaces and in "structure-catalytic activity" problems. The approach is based on taking into account every of the spatial-orientated atom triples  $(i, j, k)$ , designating triangle. Let us to consider vertex  $i$  of the triangle and vectors  $\vec{V}_{ij} = \vec{V}_i - \vec{V}_j$ ,  $\vec{V}_{ik} = \vec{V}_i - \vec{V}_k$  being the entries of the  $i$ -row of the Matrix of Geometrical Distances (MGD). And now we proceed to description in terms of the triangles matrix:

$$\left\{ \vec{\Delta}_{ijk} \right\}_{i \neq j \neq k} : \vec{\Delta}_{ijk} = \frac{1}{2} [\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}] = \Delta_{ijk} \vec{n}_{ijk}; \Delta_{ijk} = \frac{1}{2} |\vec{V}_{ij}| |\vec{V}_{jk}| \sin \gamma; \vec{n}_{ijk} = \frac{[\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}]}{[\vec{V}_{ij} \times \vec{V}_{jk}]}$$

Since a vectors product determines the triangle, it automatically means an orientation of the triangle surface in space. There are 3 sets of indexes with the same direction of normal vectors  $\vec{n}_{ijk}$  and 3 ones in opposite. One can selects internal or external triangles from the triangle matrix by following rule: triangle  $\vec{\Delta}_{ijk}$  is external, if  $\forall m \neq i, j, k$  and  $\ell = i, j, k$ :  $(\vec{n}_{ijk} \vec{V}_{\ell m}) < 0$ ; for triples of atoms placed on one line  $\vec{n}_{ijk}$  is determined as vector that is perpendicular to and finished on this line and started from the mass center of molecule.

Changing internal triangles in the matrix  $\left\{ \vec{\Delta}_{ijk} \right\}$  by zeros, we get the external triangles matrix  $\left\{ \vec{\Delta}_{ijk}^{ex} \right\}$ . This matrix contains the same external triangle  $(i, j, k)$  three times. Thus, we define geometrical structure of a molecule. Usually a biomolecule activity is defined by small site being complimentary to its natural substrates. The site ("k-complex") is consisted of  $k$  inter-oriented triangles. One can selects the triangles of k-complex considering the matrix  $\left( M \times \sum_{m=1}^M C_{N_m}^k \right)$  dimension) of entry numbers  $a_{lm}$  for every type of the k-complex triangles in each compound of the set  $P_m$  ( $m \in (1, M)$ ) of active and non-active substances. Here  $a_{lm}$  ( $m \in (1, M)$ ,  $l \in (1, \sum_{m=1}^M C_{N_m}^k)$ ) is the entry number of k-complex with number  $l$  in  $m$ -compound, taking into account conformational isomerism,  $M$  - the number of compounds,  $N_m$  - the number of triangles in  $m$ -compound,  $N = \sum_{m=1}^M N_m$  - the general number of triangles in all substances. Here we must using rule: any triangle being among type of triangles contained in inactive substances cannot be contained in k-complex. Remaining triangles (approximately, they are contained in k-complex; their number, as show on example of set of castanospermines tested by anti-HIV activity [G.W.J. Fleet et al. FEBS Letters. 1988. V. 237. № 1-2. P. 128-132], as a rule, less than number of active compounds) is used for making of additive scheme for calculating of biological activity.





## 2-(2-АМИНОАРИЛ)-5-АРИЛАМИНО-1,3,4-ОКСАДИАЗОЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ТУБУЛИНА

Самет<sup>с</sup> А.В., Семёнова<sup>б</sup> М.Н., Киселёв<sup>а</sup> А.С., Семёнов<sup>с</sup> В.В.

<sup>а</sup>deCODE Chemistry, 2501 Davey Road, Chicago, USA

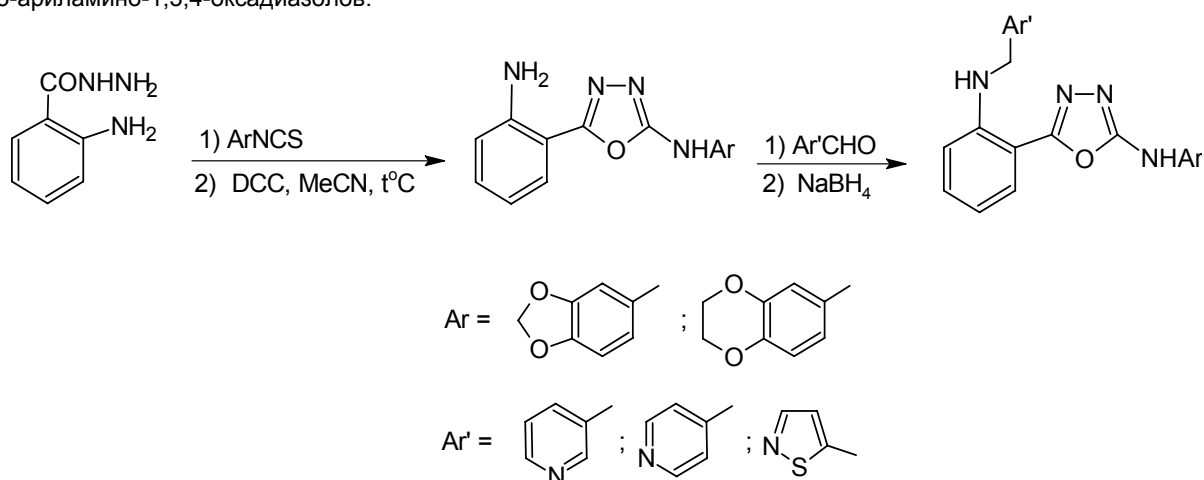
<sup>б</sup>Институт биологии развития РАН, Москва, Россия

<sup>с</sup>Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

e-mail: sametav@server.ioc.ac.ru

Правильное распределение хромосом в процессе клеточного деления происходит благодаря функционированию митотического веретена, основным структурным компонентом которого являются микротрубочки - полимеры белка тубулина. Соединения, подавляющие пролиферацию клеток за счет дестабилизации микротрубочек митотического веретена, представляют интерес как потенциальные лекарственные средства для лечения злокачественных новообразований.

Нами разработан подход к синтезу нового перспективного класса таких соединений - 2-(2-аминоарил)-5-ариламино-1,3,4-оксадиазолов.



Антимитотическая активность полученных веществ в ряде случаев заметно превосходит таковую для известных соединений этого класса, таких как колхицин или комбретастатин (ниже указана пороговая концентрация вещества, при которой наблюдается нарушение деления клеток):

Структура	EC (μM)
	0.001
	0.001
	0.0005
Колхицин	50
Комбретастатин А-4	0.005



## 2-(2-AMINOARYL)-5-ARYLAMINO-1,3,4-OXADIAZOLES AS PROMISING TUBULIN INHIBITORS

Samet<sup>c</sup> A.V., Semenova<sup>b</sup> M.N., Kiselyov<sup>a</sup> A.S., Semenov<sup>c</sup> V.V.

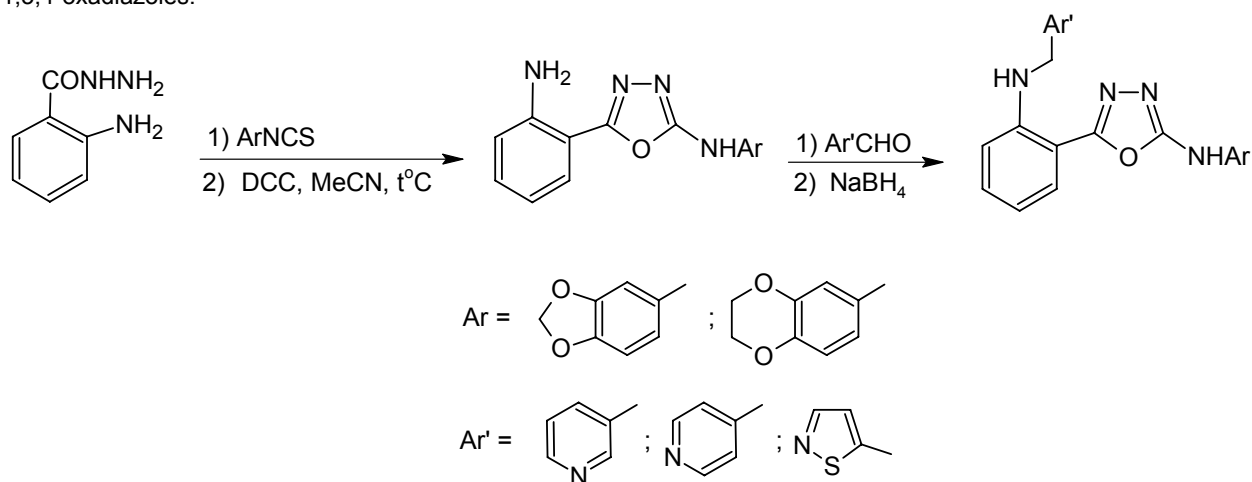
<sup>a</sup>deCODE Chemistry, 2501 Davey Road, Chicago, USA

<sup>b</sup>Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>c</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: sametav@server.ioc.ac.ru

A correct chromosome distribution during mitosis is due to the existence of a mitotic spindle. Microtubules consisting of a protein tubulin are principal structural components of this spindle. Thus, compounds, which suppress cell proliferation by destabilizing tubulin microtubules, are of interest as promising anti-tumor agents. Herein we describe an approach to a novel promising class of such compounds - 2-(2-aminoaryl)-5-arylamino-1,3,4-oxadiazoles:



Antimitotic activity of the compounds thus prepared is in some cases markedly higher than that of known compounds, such as colchicine or combretastatin (given below is a threshold concentration which result in cell division alteration):

Structure	EC ( $\mu$ M)
	0.001
	0.001
	0.0005
Colchicine	50
Combretastatin A-4	0.005



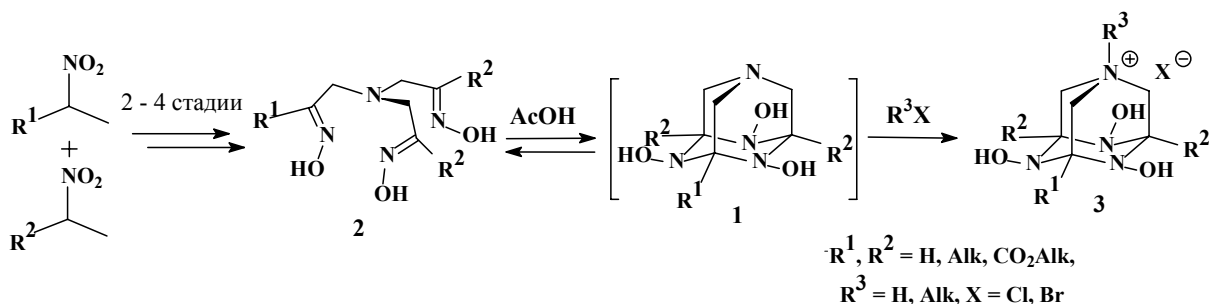
### 1,4,6,10-ТЕТРААЗААДАМАНТАНЫ: НОВЫЙ КЛАСС АЗААДАМАНТАНОВ

Семакин А. Н., Сухоруков А. Ю., Лесив А. В., Иоффе С. Л.

Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Россия, Москва, Россия  
e-mail: artyomsemakin@mail.ru

Азотистые производные адамантанов – аминоксадамантаны и азаадамантаны – находят широкое применение в современной медицине. Хорошо известны препараты на основе адамантанов, обладающие противовирусной, иммунопротекторной, антикаталептической и цитотоксической активностью и как ингибиторы дофамина [1а-1с]. Пожалуй, наиболее известен 1,3,5,7-тетраазаадамантан (гексаметилентетрамин, уротропин), являющийся одним из самых первых синтетических лекарственных препаратов. Однако, его структурный изомер – 1,4,6,10-тетраазаадамантан – или же какие-нибудь его производные на настоящий момент неизвестны, поэтому их синтез представляется актуальной задачей. Нами впервые разработан метод синтеза 4,6,10-тригидрокси-1,4,6,10-тетраазаадамантанов **1** из алифатических нитросоединений через промежуточное получение трис(β-оксиминоалкил)аминов **2** [2]. Происходящая при формировании адамантанового каркаса обратимая внутримолекулярная циклотримеризация оксиминогрупп в **1** является новым, ранее не известным для оксимов процессом.

Схема 1



В ходе исследований выявлено влияние структуры субстрата и условий (различных электрофильных и нуклеофильных активаторов) на протекание реакции тримеризации оксиминовых групп в трис(β-оксиминоалкил)аминов **2** и разработаны подходы к синтезу замещенных 4,6,10-тригидрокси-1,4,6,10-тетраазаадамантанов и разнообразных их производных **3**.

В настоящий момент проводится изучение биологической активности полученных 4,6,10-тригидрокси-1,4,6,10-тетраазаадамантанов **1** и **3**.

#### Литература:

- (а) Морозов, И. С., Петров, В. И., Сергеева, С. Л., «Фармакология адамантанов», Волгоград, ВМА, 2001; (д) D. P. Becker, D. L. Lynn, R. L. Shone, G. Gullikson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 22, 2004, 5509 – 5512; (с) M. Morita, N. Yoshida, J. Kobayashi, *JOC*, 64, 19, 1999, 7208 – 7212.
- A. N. Semakin, A. Yu. Sukhorukov, A. V. Lesiv, Yu. A. Khomutova, S. L. Ioffe, K.A. Lyssenko, *Synthesis*, 2007, 2862.



### 1,4,6,10-TETRAAZAADAMANTANES: A NEW CLASS OF AZAADAMANTANES

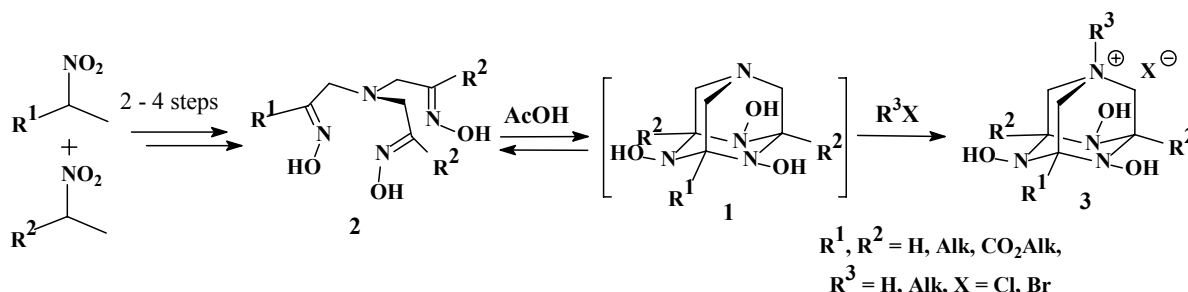
Semakin A. N., Sukhorukov A. Yu., Lesiv A. V., Ioffe S. L.

N. D. Zelinsky Institute of organic chemistry, Moscow, Russia  
e-mail: artyomsemakin@mail.ru

Nitrogen-containing derivatives of adamantane – aminoadamantanes and azaadamantanes – are widely applied in modern medicine. Such adamantane-based drugs possess antiviral, immunoprotecting, anticataleptic and antimietic activity [1a-1c]. Perhaps, the best known among these compounds is 1,3,5,7-tetraazaadamantane (methenamine), which is one of the oldest synthetic therapeutic agents. However its isomer – 1,3,5,7-tetraazaadamantane – or any of its derivatives are unknown in literature. Since these azaadamantanes may possess interesting biological activity their synthesis represents a challenging task.

In the present research the first synthesis of 4,6,10-trihydroxy-1,4,6,10-tetraazaadamantanes **1** from aliphatic nitro compounds *via* tris( $\beta$  – oximinoalkyl)amines **2** [2] has been realized (Scheme 1). The key step in the synthesis – an intramolecular cyclotrimerization of oximino groups leading to the formation of azaadamantane cage – is an unprecedented reaction in oxime chemistry.

Scheme 1



The influence of a substrate structure and reaction conditions on the cyclization of **2** was studied and approaches to the synthesis of substituted 4,6,10-trihydroxy-1,4,6,10-tetraazaadamantanes and their derivatives **3** were developed.

Studies of the biological activity of obtained 4,6,10-trihydroxy-1,4,6,10-tetraazaadamantanes **1** and **3** are now in progress.

**References:**

- (a) Morozov, I. S., Petrov, V. I., Sergeeva, S. L., "Pharmacology of adamantanes", Volgograd, VMA, 2001; (b) D. P. Becker, D. L. Lynn, R. L. Shone, G. Gullikson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 22, 2004, 5509 – 5512; (c) M. Morita, N. Yoshida, J. Kobayashi, *JOC*, 64, 19, 1999, 7208 – 7212.
- A. N. Semakin, A. Yu. Sukhorukov, A. V. Lesiv, Yu. A. Khomutova, S. L. Ioffe\*, K.A. Lyssenko, *Synthesis*, 2007, 2862.

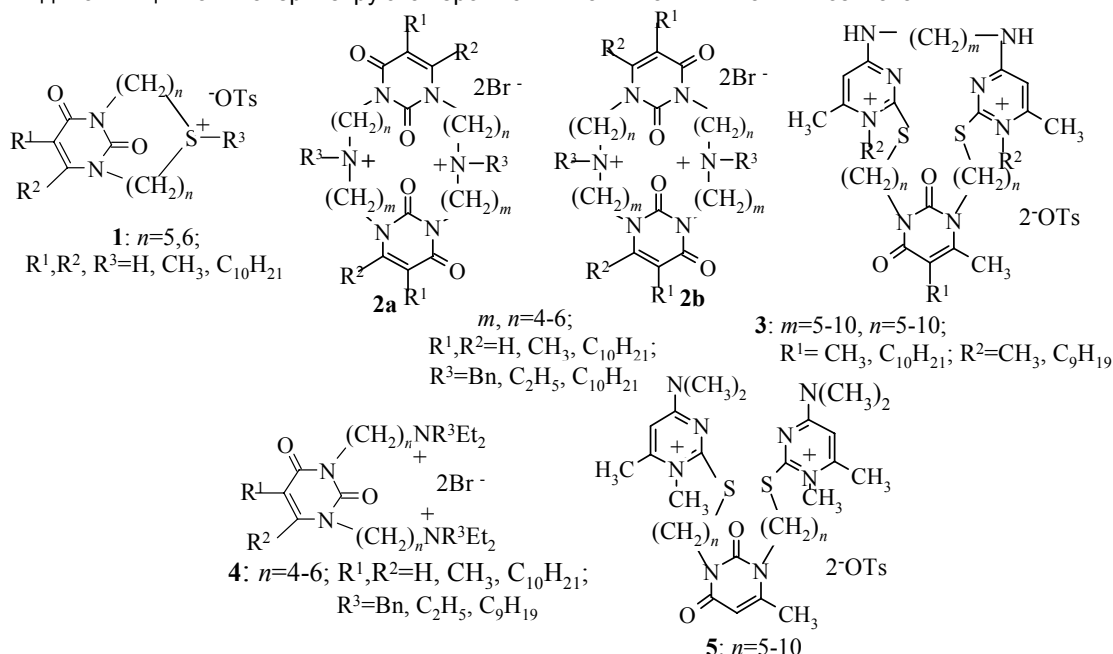


## АМФИФИЛЬНЫЕ ПИРИМИДИНОФАНЫ И ИХ АЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ: СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

Семенов В.Э., Гиниятуллин Р.Х., Михайлов А.С., Николаев А.Е., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Зобов В.В., Резник В.С.

Учреждение Российской академии наук Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань, Российская Федерация  
e-mail: sve@iopc.knc.ru

Макроциклические соединения, содержащие пиримидиновые фрагменты, соединенные друг с другом углеводородными мостиками, по аналогии с циклофанами получили название пиримидинофаны. Рассматриваются синтез и биологическая активность, в частности антимикробная активность амфифильных пиримидинофанов различного строения **1-3**, содержащих урациловые фрагменты, и их ациклических аналогов – соединений **4** и **5**. Пиримидинофаны **1-3** - новый класс биологически активных макроциклов. Описывается стратегия их получения - как пиримидинофаны, так и их ациклические аналоги синтезируются исходя из N(1),N(3)-бис(ω-бромалкил)урацилов, в которых концевые атомы Br замещаются соответствующими фрагментами [1,2]. Далее гетероатомы в составе мостиков или в составе пиримидиновых циклов кватернизируются бромистыми алкилами или алкилтозилатами.



Макроциклические и ациклические соединения **1-5** протестированы в терминах минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на бактериостатическую активность по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий и фунгистатическую активность по отношению к некоторым грибам. Имеет место общая тенденция для соединений различного строения - уменьшение МИК с увеличением числа метиленовых групп ( $m, n$ ) в составе соединительных цепочек. Выявлена селективность пиримидинофанов по отношению к *Staphylococcus aureus* - МИК наиболее активных макроциклов составляет 0.2-1.0 мкг/мл [2]. При этом по отношению к другим бактериям, как грамположительным, так и грамотрицательным, а также грибам макроциклы **1-3** или значительно менее активны, или неактивны вообще. У ациклических аналогов пиримидинофанов – соединений **4** и **5** такая селективность отсутствует, они активны как по отношению к бактериям, так и грибам. При этом фунгистатическая активность соединений **4** и **5** по отношению к *Aspergillus niger* и *Candida Albicans* значительно превосходит фунгистатическую активность пиримидинофанов сходного строения.

Таким образом, синтезирован новый класс поверхностно-активных веществ – водорастворимые амфифильные пиримидинофаны, содержащие урациловые фрагменты, и являющиеся первыми описанными в литературе примерами макроциклических амфифилов на основе негликозидных аналогов нуклеозидов. Полученные макроциклические ПАВ болаформного и геминального строения обладают высокой антибактериальной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-03-00392), программы №6 и 9 ОХНМ РАН и программы №18 Президиума РАН.

### Литература:

- L. Galiullina, A. Nikolaev, V. Semenov, V. Reznik, Sh. Latypov, Tetrahedron. 2006, 62, 7021-7033.
- V. E. Semenov, A. D. Voloshina, E. M. Toroptzova, N. V. Kulik, V.V. Zobov, R. Kh. Giniyatullin, A. S. Mikhailov, A. E. Nikolaev, V. D. Akamsin, V. S. Reznik, Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 1093-1101.

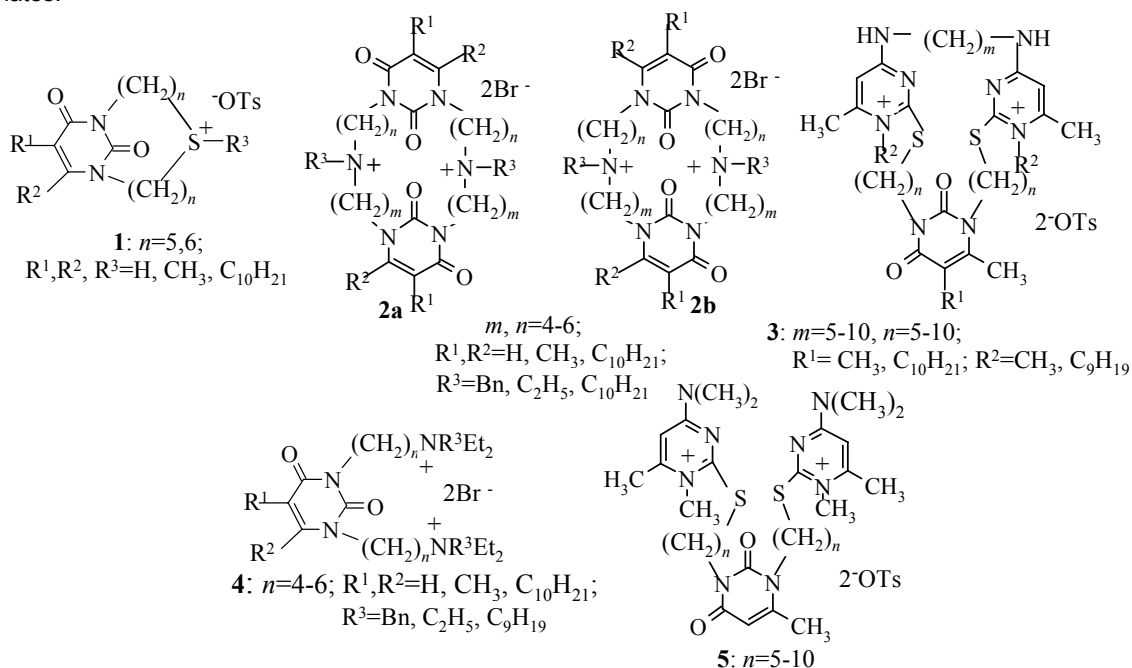


## SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AMPHIPHILIC MACROCYCLES AND THEIR ACYCLIC COUNTERPARTS

Semenov V.E., Giniyatullin R.Kh., Mikhailov A.S., Nikolaev A.E., Voloshina A.D.,  
Kulik, N.V. Zobov V.V., Reznik V.S.

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Kazan, Russian Federation  
e-mail: sve@iopc.knc.ru

Molecules with aromatic ring bridged by an aliphatic chain have been called cyclophanes and pyrimidinophanes are the cyclophanes containing pyrimidine bases as the aromatic ring. Herein amphiphilic pyrimidinophanes with uracil moieties **1-3** and their acyclic counterparts **4** and **5** have been studied. Amphiphilic pyrimidinophanes **1-3** is a new type of biologically active macrocycles. Strategy of their preparation is described. The idea is that the macrocyclic and acyclic compounds with different structure have been synthesized based on N(1),N(3)-bis( $\omega$ -bromoalkyl)uracils substituting terminal atoms of Br by appropriate fragments [1,2]. The next stage is the quarterization of heteroatoms in spacers and N atom in pyrimidine rings with alkyl bromides or alkyl tosylates.



The macrocyclic and acyclic compounds **1-5** were screened for their antibacterial and antifungal activity in terms of minimal inhibitory concentration (MIC) against several representative Gram-negative and Gram-positive bacteria, moulds and yeast. There is a general trend for pyrimidinophanes and their acyclic counterparts. Increase of the polymethylene chain length ( $m, n$ ) causes the decrease of MICs. For pyrimidinophanes **1-3** the remarkable selectivity against *Staphylococcus aureus* was found. The more active macrocycles exhibit bacteriostatic activity with MIC 0.24-0.98  $\mu\text{g/mL}$  [2], while they are significantly less active or not active at all against other Gram-positive and Gram-negative bacteria, moulds and yeast. The acyclic compounds **4** and **5** don't exhibit the same selectivity. These compounds are active against bacteria and fungi. It should be noted that fungistatic activity of the acyclic amphiphiles **4** and **5** against *Aspergillus niger* and *Candida Albicans* is higher than fungistatic activity of their macrocyclic amphiphilic counterparts.

In conclusion, a new type of surfactants have been synthesized. These surfactants represent the water-soluble amphiphilic pyrimidinophanes with uracil moieties, and they are the first macrocyclic amphiphiles based on nonglycoside analogues of nucleosides. The obtained bolaform and gemini macrocyclic surfactants exhibit high antimicrobial activity.

This work was supported by the Basic Research Programs of the Russian Academy of Sciences and RFBR grant (07-03-00392).

### References:

1. L. Galiullina, A. Nikolaev, V. Semenov, V. Reznik, Sh. Latypov, Tetrahedron. 2006, 62, 7021-7033.
2. V. E. Semenov, A. D. Voloshina, E. M. Toroptzova, N. V. Kulik, V.V. Zobov, R. Kh. Giniyatullin, A. S. Mikhailov, A. E. Nikolaev, V. D. Akamsin, V. S. Reznik, Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 1093-1101.



## СИНТЕЗ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗ

*Шарко О.Л., Кисель М.А.*

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: Sharko@iboch.bas-net.by

Амидные производные жирных кислот широко распространены в природе. Они входят в состав церамидов, гликофинголипидов, N-ацилированных липидов и бактериальных липопротеинов [1]. Недавно у млекопитающих были найдены амиды арахидоновой кислоты с  $\gamma$ -аминомасляной кислотой, дофамином, серином и аланином, обладающие высокой биологической активностью [2-5]. Участие амидов и этаноламидов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в биорегуляции в качестве эндогенных биоэффektorных липидов установлено и доказано работами последних нескольких лет. Эти достаточно простые по структуре соединения способны действовать как высокоактивные нейромодуляторы (анандамид, олеамид), а так же как регуляторы процессов в периферических органах и тканях (анандамид, N-пальмитоилэтаноламин, эрукамид). Высокая биологическая активность, рецепторный механизм действия, наличие систем синтеза и деградации указанных амидов позволяют рассматривать их в качестве родоначальников нового класса биорегуляторов.

Нами синтезированы амиды арахидоновой кислоты с аминокислотами и аминокспиртами, пальмитиновой кислоты с амиаком, этаноламином, гидроксиламином, гидразином, диметиламином, анилином. Синтезированы также амиды и этаноламиды ряда жирных кислот, отличающихся функционализацией и степенью ненасыщенности углеводородного фрагмента. Синтезированные соединения были исследованы в качестве модуляторов липолитической активности фосфолипаз  $A_2$  и D. Установлено, что арахидоноламиды ингибируют фосфолипазу D, самыми сильными ингибиторами являются арахидоноилфенилаланин и арахидоноил- $\gamma$ -аминомасляная кислота. Хотя фосфолипазы  $A_2$  из яда змеи и поджелудочной железы свиньи относят к одному классу согласно классификации [6], в большинстве случаев они проявили противоположный ответ на действие одних и тех же модуляторов. Исследование производных пальмитиновой кислоты с различной амидной составляющей и амидов с различной длиной и функционализацией жирнокислотной цепи в качестве модуляторов липолитической активности показало, что ключевым фактором в проявлении эффektorного действия является длина и функционализация углеводородного фрагмента. В случае проявления модулирующего действия соединениями с данным типом ацильного фрагмента, эффект зависит от аминокислотной составляющей.

*Работа поддержана грантами БРФФИ Х08М-133 и Б08МЛД-026.*

### **Литература:**

1. Muthing, J., Maurer, U., Sostaric, K., Neumann, U., Brandt, H., Duvar, S., Peter-Katalinic, J., Weber-Schurholz, S., J. Biochem., 1994, 115, 248.
2. Безуглов В. В. Бобров М. Ю. Арчаков А. В. Биохимия, 1998, вып.1, 27.
3. Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L., Gretskeya N.M., Frumkina L.E., Khaspekov L.G., Bezuglov V.V., Neurosci Lett. 2008, 431, 6.
4. Huang S.M., Bisogno T., Petros T.J., Chang S.Y., Zavitsanos P.A., Zipkin R.E., Sivakumar R., Coop A., Maeda D.Y., De Petrocellis L., Burstein S., Di Marzo V., Walker J.M., J. Biol. Chem., 2001, 276, 42639.
5. Bradshaw H.B., Walker J.M., British J. Pharmacol. 2005, 144, 459.
6. Six D.A., Dennis E.A. Biochim. Biophys. Acta. 2000, 1488, 1.



## SYNTHESIS FATTY ACID AMIDES AND THEIR EFFECT ON PHOSPHOLIPASE ACTIVITY

*Sharko O.L., Kisel M.A.*

The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
Sharko@iboch.bas-net.by

Amide derivatives of fatty acids are widely spread in nature, being parts of ceramides, glycosphingolipids, N-acylated lipids and bacterial lipoproteins [1]. Recently arachidonic acid amides with  $\gamma$ -aminobutyric acid, dophamine, serine and alanine were found in mammals and shown to possess high biological activity [2-5]. Role of amides and ethanolamides of saturated and unsaturated fatty acids in bioregulation as endogenous bioeffector lipids is ascertained and proved by recent research works. These substances with rather simple structure are able to act as active neuromodulators (anandamide, oleamide) and as regulators of processes in peripheral organs and tissues (anandamide, N-palmitoylethanolamine, erucamide). High biological activity, receptor mechanism of action, existence of synthesis and degradation systems of the substances concerned allows them to be considered as founders of the new class of bioregulators.

We synthesized arachidonic acid amides with amino acids and amino alcohols, palmitic acid amides with ammonia, ethanolamine, hydroxylamine, hydrazine, dimethylamine, aniline. Besides, amides and ethanolamides of fatty acids, differing in chain length and functionalization, are synthesized. These amides were investigated as modulators of phospholipase D and phospholipase  $A_2$  activity. It was ascertained that arachidonoylamides inhibit phospholipase D, the best inhibitors being N-arachidonoyl- $\gamma$ -aminobutyric acid and N-arachidonoyl-L-phenylalanine. Although phospholipases  $A_2$  from snake venom and porcine pancreas belong to the same group according to classification [6], they showed in most cases an opposite response to the action of arachidonoylamides. The investigation of palmitic acid derivatives with different amino component and amides, differing in acyl chain length, saturation and functionalization as lipolytic activity modulators revealed that main contribution to the enzyme modulation is provided by the length of acyl chain, its functionalization and degree of saturation. When the modulation is exhibited by the amide with the certain acyl type, effect depends on the amine group structure of the amide.

*This research was supported by the Belorussian foundation for fundamental research grants X08M-133 and B08MЛД-026.*

### References:

- [1] Muthing J., Maurer U., Sostaric K., Neumann U., Brandt H., Duvar S., Peter-Katalinic J., Weber-Schurholz, S., J. Biochem., 1994, 115, 248.
- [2] Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Арчаков А.В., Biochemistry (Mosc.), 1998, 63, 22.
- [3] Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L., Gretskaya N.M., Frumkina L.E., Khaspekov L.G., Bezuglov V.V., Neurosci Lett. 2008, 431, 6.
- [4] Huang S.M., Bisogno T., Petros T.J., Chang S.Y., Zavitsanos P.A., Zipkin R.E., Sivakumar R., Coop A., Maeda D.Y., De Petrocellis L., Burstein S., Di Marzo V., Walker J.M., J. Biol. Chem., 2001, 276, 42639.
- [5] Bradshaw H.B., Walker J.M., British J. Pharmacol. 2005, 144, 459.
- [6] Six D.A., Dennis E.A. Biochim. Biophys. Acta. 2000, 1488, 1.





**ЯДЕРНО-ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ СИНТОНОВ ДЛЯ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Щепина<sup>1</sup> Н.Е., Аврорин<sup>2</sup> В.В., Бадун<sup>3</sup> Г.А., Александрова<sup>1</sup> Г. А., Бойко<sup>4</sup> И.И., Махмудов<sup>1</sup> Р.Р.

<sup>1</sup> Естественнаучный институт Пермского государственного университета, Пермь, Россия

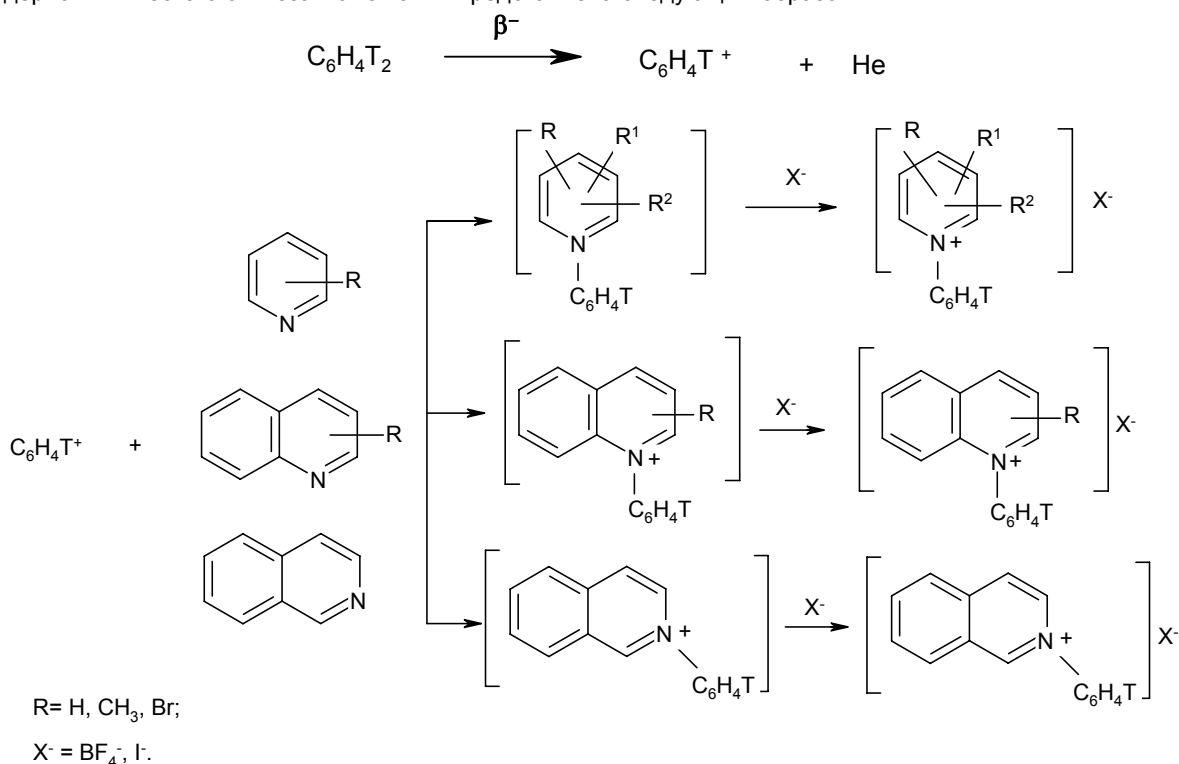
<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет, Москва, Россия

<sup>4</sup> ООО «Технолог», Переславль-Залесский, Россия

e-mail: neshchepina@mail.ru

Арсенал современных лекарственных веществ невозможно представить без различных четвертичных пиридиниевых производных. К сожалению, вследствие невозможности прямого фенилирования атома азота в производных пиридина, методы синтеза данных солей являются крайне трудоемкими, а зачастую и не выполнимыми. Ядерно-химический метод дает уникальную возможность прямого фенилирования атома азота нуклеогенными фенил-катионами и, соответственно, простой и одностадийный синтез труднодоступных N-фенильных соединений замещенного пиридиния, меченных тритием. Свободные фенил-катионы генерируются при  $\beta^-$ -распаде трития в составе двукратно меченного бензола. Схема ядерно-химического синтеза может быть представлена следующим образом:



Разработанным ядерно-химическим методом в одну стадию были синтезированы неизвестные N-фенильные производные пиридиния, хинолиния и изохинолиния, меченные тритием.

Проведенные биологические испытания показали, что большинство исследованных N-фенилзамещенных соединений являются перспективными антибактериальными средствами как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Причем производные со стерически затрудненными заместителями в пиридиновом кольце показывают более высокий ингибирующий эффект в отношении грамположительных микроорганизмов. Детальные исследования противомикробных свойств солей бензохинальдиния выявили их эффективность в отношении широкого спектра культур (*E. coli*, *Salmonella spp.*, *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-03-00881.



NUCLEAR-CHEMICAL METHOD FOR PREPARATION OF TRITIUM LABELED SYNTONES FOR  
BIOLOGICAL AND MEDICAL INVESTIGATIONS

Shchepina<sup>1</sup> N.E., Avrorin<sup>2</sup> V.V., Badun<sup>3</sup> G.A., Alexandrova<sup>1</sup> G.A., Boiko<sup>4</sup> I.I., Makhmudov<sup>1</sup> R.R.

<sup>1</sup> Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russia

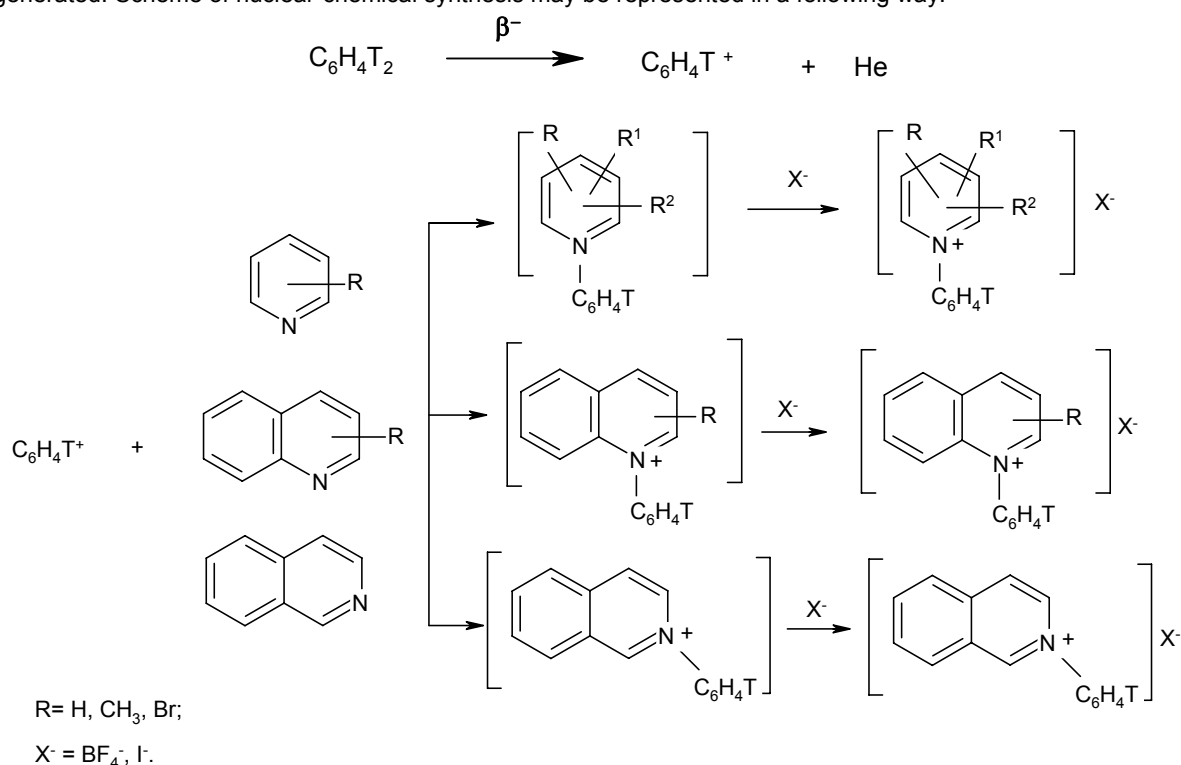
<sup>2</sup> St-Petersburg State University, S.Pb., Russia

<sup>3</sup> Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> OOO "Technolog", Pereslavl-Zalessky, Russia

e-mail: neshchepina@mail.ru

Modern arsenal of medical compounds is impossible to present nowadays without wide range of quaternary pyridinium derivatives. Unfortunately due to the absence of nitrogen atom direct phenylation reaction in pyridine derivatives methods of synthesis of such compounds are extremely difficult and often impossible to fulfill. Nuclear-chemical method gives unique opportunity to conduct direct phenylation of nitrogen atom by nucleogenic phenyl cations and, consequently, to carry out easy and single-stage synthesis of tritium labeled hardly available N-phenyl substituted pyridinium derivatives. By tritium  $\beta$ -decay in double labeled benzene free phenylium ions are generated. Scheme of nuclear-chemical synthesis may be represented in a following way:



Unknown tritium labeled N-phenyl pyridinium, quinolinium and isoquinolinium derivatives have been synthesized in one step by elaborated nuclear-chemical method.

Undertaken biological screening has showed that most investigated N-phenyl substituted compounds were perspective antimicrobial substances towards both gram-positive and gram-negative bacterium. It is necessary to mention that steric hidden substituents in pyridine ring cause higher inhibitory effect towards gram-positive microorganisms. Detail investigations of benzoquinolindinium salts revealed their effectiveness towards wide spectrum of pathogens (*E. coli*, *Salmonella spp.*, *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*).

The undertaken research has been carried out under the support of RFBR, grant № 07-03-00881.



## **АНАЛИЗ СМЕСЕЙ С ПОМОЩЬЮ ВЭХЖ-ЯМР/МС И СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ**

*Шпрауль М., Айххофф У.*

Брукер Биоспин ГмбХ, Райнштеттен, Германия  
e-mail: uwe.eichhoff@bruker.de

ЯМР в течение многих лет стал основным методом для определения молекулярной структуры в химии. Более высокие магнитные поля и многомерная ЯМР-Фурье-спектроскопия повысили чувствительность и открыли новые области применения. Полная автоматизация эксперимента повысила пропускную способность.

Для химика основной задачей ЯМР осталась определение структуры одного изолированного соединения. Анализ смесей с помощью ЯМР требует другого подхода. В смеси каждое соединение обладает своим ЯМР-спектром, которые все друг на друга накладываются. В этих спектрах наблюдается иногда больше тысячи линий и с помощью ЯМР их можно анализировать двумя способами.

Первый – сочетание ВЭХЖ с ЯМР, иногда вместе с МС. ЯМР сам по себе является нечувствительным методом по сравнению с оптической и масс-спектроскопией, но зато самым информативным и специфичным для молекулярной структуры. Первая задача состояла в повышении чувствительности ЯМР. Специальные ВЭХЖ/ЯМР-интерфейсы, микро- и криодатчики, режим остановленной струи и твердофазная экстракция повышают чувствительность на два порядка и позволяют использовать весь арсенал новых информативных методов многомерной ЯМР. С криодатчиками на высоких полях область пикограм становится доступным для низкомолекулярных соединений.

Второй метод для анализа смесей с помощью ЯМР - это использование специального программного обеспечения с использованием библиотеки спектров. Мы разработали программу AMIX для анализа одно- и многомерных спектров смесей. На его основе созданы рутинные методы анализа смесей для сельского хозяйства, пищевой и фармацевтической промышленности.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### NMR MIXTURE ANALYSIS USING HYPHENATION TECHNIQUES AND STATISTICAL EVALUATION SOFTWARE

*Spraul Manfred, Eichhoff Uwe*

Bruker Biospin GmbH  
D76287 Rheinstetten, Germany  
e-mail: uwe.eichhoff@bruker.de

NMR over many years has developed into the main tool for structure elucidation in chemistry. Higher magnetic field strengths, one- and multidimensional Fourier Spectroscopy have significantly increased the sensitivity and the field of applications. New methods of sample handling and automation shortened the measuring time and increased the sample throughput.

For the chemist using NMR the main task always was to determine the molecular structure of single carefully isolated pure compound. Mixture analysis by NMR needs a completely different approach. In a mixture each component has its own NMR spectrum which overlap into a mixture spectrum containing more than thousand NMR lines. There are two ways of analysing those mixtures by NMR.

*The first is the combination of HPLC with NMR (LCNMR) or even with NMR and MS (LCNMRMS).* Over the last ten years these methods have been significantly improved. NMR in itself is has a rather low sensitivity as compared to optical and MS methods, but is very structure-specific. Thus the first task was to increase sensitivity. Special coupling devices and flow-through microprobeheads have been developed. Stop flow and solid phase extraction lead to a sensitivity increase of almost two orders of magnitude and allow to use all the informative and sensitive methods of multidimensional NMR Fourier spectroscopy. With high magnetic fields and cryoprobeheads the range of picograms becomes accessible for low molecular compounds.

*The second method for mixture analysis is the use of specialized software* for statistical evaluation together with spectral databases. We have developed a mixture analysis program *AMIX* for one- and multidimensional spectra. This has evolved to an easy to use routine method for agriculture, food- and pharmaceutical industry.



## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЕРРОЦЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛА И ИНДОЛА

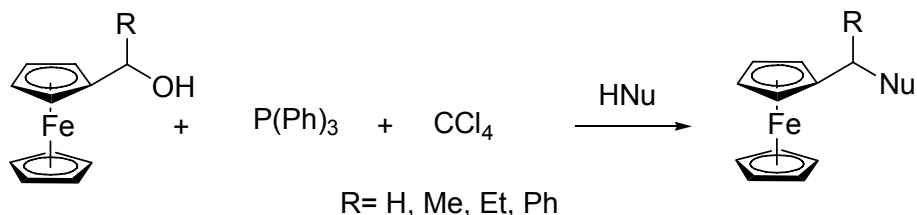
Сименел А. А., Жеребкер К. Я., Зыкова С.И.

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН  
Москва, Россия  
e-mail: alexsim@ineos.ac.ru

Ранее было показано, что ферроценсодержащие гетероциклы проявляют противоопухолевую активность в сочетании с низкой токсичностью. Так, например, ферроценилметилбензимидазол вызывает торможение роста опухоли на 70% (*in vivo* эксперименты, модели солидных опухолей – аденокарцинома 755, меланома В16 и карцинома легких Льюиса). Установлено, что максимально переносимая доза составляет 400 мг/кг.

Наиболее распространенным методом введения ферроценилалкильной группы в молекулы нуклеофилов является реакция ферроценилкарбинолов в водно-органических средах. Однако при кислотном катализе не удается осуществить ферроценилалкилирование основных гетероциклов, например имидазола  $pK_a$  которого составляет 7.00. Целью работы является разработка методов ферроценилалкилирования основных гетероциклов и изучение их биологической активности.

В настоящей работе предложен новый метод введения ферроценилалкильных групп в гетероциклы при взаимодействии ферроценовых спиртов, трифенилфосфина и четыреххлористого углерода в присутствии внешнего нуклеофила. Смесь эквимольных количеств реагентов перемешивалась в хлористом метиле в течение суток. Имидазолы, бензимидазолы, индолы и аденин были использованы в качестве нуклеофилов. Ферроценилалкилированные гетероциклы были синтезированы с высокими выходами.



Строение соединений установлено на основании ЯМР спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , а также  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  гетероядерных корреляций (HSQC, HMBC).

В дальнейшем планируются биологические испытания полученных соединений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума Российской академии наук «Поддержка молодых ученых», «Фундаментальные науки – медицине» и Отделения химии наук о материалах Российской академии наук «Биомолекулярная и медицинская химия» (проект 10 ОХ) и РФФИ № 06-03-32219*



## NEW METHOD OF SYNTHESIS OF ANTITUMOR ACTIVE FERROCENYLALKYLAZOLES

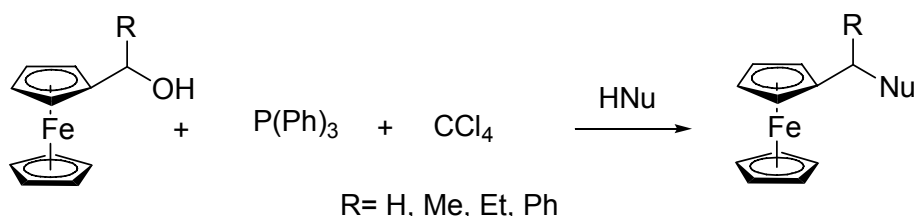
Simenel A.A. , Zhrebker K.Ya. , Zykova S.I.

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Academy of Sciences of Russia,  
Moscow, Russian Federation  
e-mail: alexsim@ineos.ac.ru

Earlier it was found that some of the ferrocene containing heterocycles displayed high antitumour activity in combination with low toxicity. For example ferrocenylmethylbenzimidazole inhibit tumor growth up to 70% (*in vivo* investigations, models of solid tumors - adenocarcinoma Ca755, melanoma B16 and Lewis lung carcinoma). The maximal over-come dose (MD) was found to be 400 mg/kg.

The acid-catalyzed ferrocenylalkylation reaction using  $\alpha$ -ferrocenylcarbinols in aqueous-organic is one of the most convenient methods for introducing ferrocenylalkyl groups into nucleophilic substrates. However, under acidic conditions ferrocenylalkylation of imidazole was not realized because of the protonation of his N-basic center (basic  $pK_a$  7.00). Therefore, it was important to synthesize ferrocene derivatives of various basic heterocycles in order to study potential ferrocene containing drugs.

In the present work we propose a new method for the introducing of ferrocenylalkyl groups into heterocycles by the interaction between ferrocenylcarbinols, triphenylphosphine and tetrachloromethane in the presence of outside nucleophile. The mixture of equimolar amounts of reactants in methylene dichloride was stirred for 1 day. Imidazoles, benzimidazoles, indoles, pyrazoles and adenine were used as nucleophiles. Ferrocenylalkylated heterocycles were synthesized in high yields.



The structures of compounds have been assigned on the basis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  heteronuclear correlations.

We are planning to investigate these compounds as biologically active components.

*This work has been partially supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Programs "Support for Young Scientists" and "Fundamental sciences – for medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Project 10), by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 06-03-32219).*

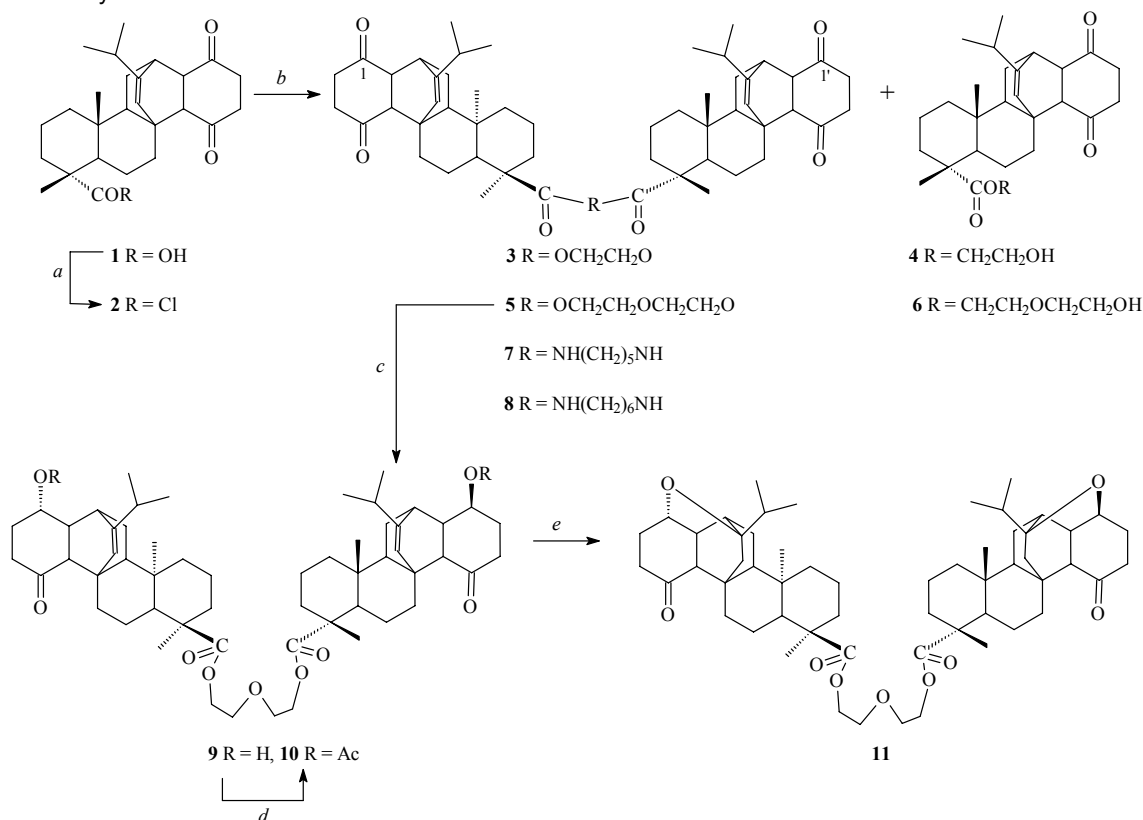


### СИНТЕЗ И МОДИФИКАЦИЯ ДИТЕРПЕНОИДОВ С ДВУМЯ КАРКАСАМИ ДИГИДРОХИНОПИМАРОВОЙ КИСЛОТЫ

Смирнова И. Е., Третьякова Е. В., Казакова О. Б., Спирихин Л. В., Толстиков Г. А.

УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: obf@anrb.ru

В течение последних лет одним из актуальных направлений органической химии стал синтез соединений, содержащих в своем составе несколько карбоциклических каркасов, интерес к которым обусловлен тем фактом, что незначительные изменения их строения существенно изменяют биологическую активность.



Условия: *a.* (COCl)<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>; *b.* (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> или O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> или NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub> или NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (сух), Δ;  
*c.* NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 22 °C; *d.* Ac<sub>2</sub>O, Py, Δ; *e.* HCl, MeOH, Δ.

В данной работе мы представляем первый синтез диэфиров и диамидов, содержащих два дитерпеноидных каркаса дигидрохинопимаровой кислоты (ДХПК) **1** и ее производных. При взаимодействии хлорангидрида ДХПК **2** с диолами (этиленгликоль, диэтиленгликоль) и диаминами (1,5-пента- и 1,6-гексаметилендиаминами) в соотношении 2:1 кипячением в хлороформе в присутствии Et<sub>3</sub>N синтезированы производные **3-8** с выходами 29-65% после хроматографической очистки. Соединение **5**, в котором два каркаса ДХПК соединены диэтиленгликолевым спейсером, было модифицировано по положениям C(1, 1'). Восстановлением **5** NaBH<sub>4</sub> в метаноле получено бисгидроксипроизводное **9**, охарактеризованное также в виде ацетата **10**. При кипячении соединения **9** в метаноле в присутствии HCl было получено производное **11** с количественным выходом. Структура полученных соединений установлена спектральными методами.

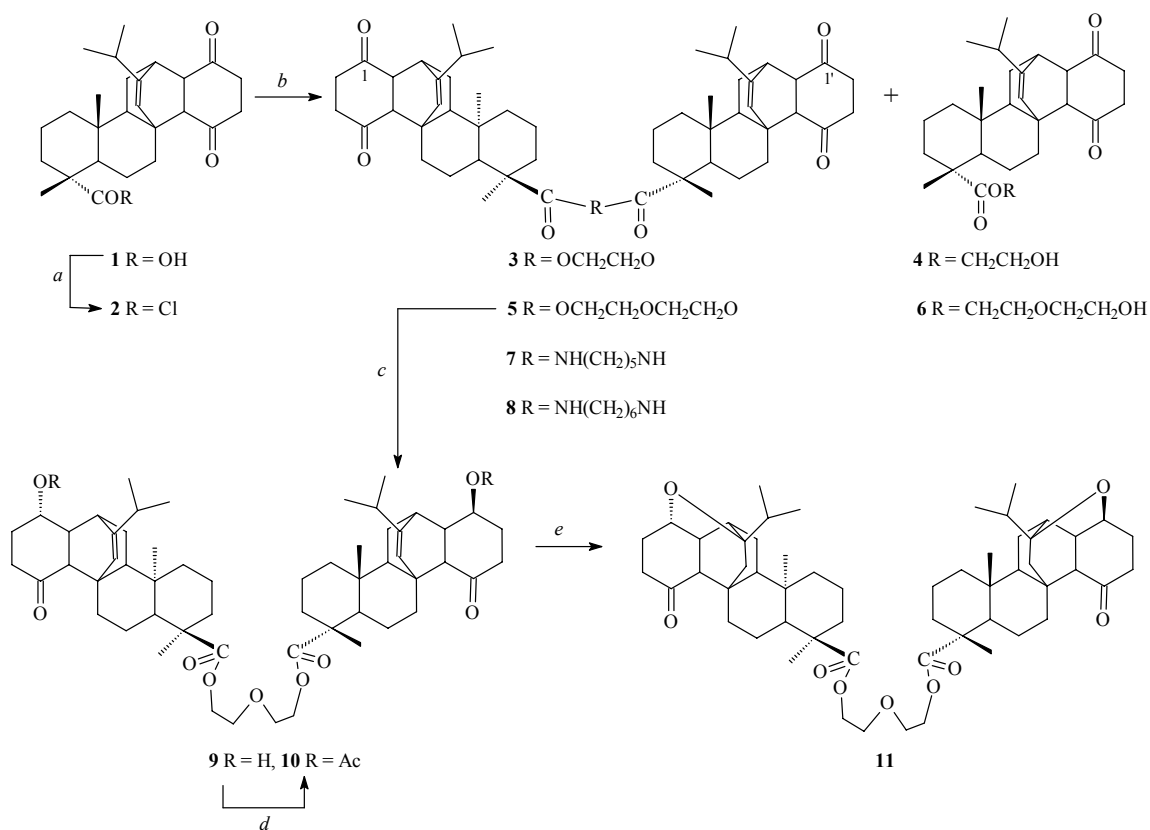


SYNTHESIS AND MODIFICATION OF DITERPENOIDS WITH TWO MOETIES  
OF DIHYDROQUINOPIMARIC ACID

Smirnova I.E., Tretyakova E. V., Kazakova O. B., Spirikhin L. V., Tolstikov G. A.

URAS Institute of organic chemistry Ufa Research Centre of the RAS, Ufa, Russian Federation.  
e-mail: obf@anrb.ru

At the last years one of the most actual direct of organic chemistry is synthesis of derivatives containing several carbocyclic moeties. Such compounds are interesting due to fact that even minor changes in the structure considerably influence on biological activity.



Conditions: a. (COCl)<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>; b. (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> or O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> or NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub> or NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Δ;  
c. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 22 °C; d. Ac<sub>2</sub>O, Py, Δ; e. HCl, MeOH, Δ.

For the first time we present synthesis of diesters and diamides with two diterpenoid moieties of dihydroquinopimaric acid **1** and its derivatives. Interaction of dihydroquinopimaric chloride **2** with diols (ethyleneglycol, diethyleneglycol) and diamines (1,5-penta- и 1,6-hexamethylendiamines) in ratio 2:1 under reflux in methylene chloride in the presence of Et<sub>3</sub>N derivatives **3-8** were synthesized (yield 29-65%). Compound **5** in which two moieties of dihydroquinopimaric acid are binded with diethyleneglycol spacer was modified at the carbon atom C(1, 1'). By the reduction of **5** with NaBH<sub>4</sub> in methanol bishydroxyderivative **9** was obtained, also characterized as acetate **10**. Refluxing of **9** in methanol with HCl led to ester **11** in good yield. The structure of compounds **3-11** were established by NMR spectroscopy.





## МЕРА ХИРАЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Смоленский Е.А., Жохова Н.И., Рыжов А.Н., Чувылкин Н.Д.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
Москва, Россия  
e-mail: smolensk@server.ioc.ac.ru

Одной из важных характеристик биологически активных веществ является хиральность. Известно несколько попыток количественно охарактеризовать степень хиральности. Можно упомянуть публикации Мислова (K. Mislov), Авнира (D. Avnir), Кузьмина (V.E. Kuzmin), Гилата (G. Gilat) и др. Для этой величины предлагается установить, например, такие ограничения:

$$-1 \leq \chi(M) \leq 1, \chi(M) = -\chi(M'),$$

где  $\chi(M)$  – «мера хиральности»,  $M$  и  $M'$  – энантиомеры. При этом «степень хиральности» определяется как  $|\chi(M)|$ .

Мы предлагаем новые формулы для степени хиральности, имеющие простой и ясный химический смысл. Используя предложенные в предыдущем докладе ориентированные тройки атомов, можно определить меру хиральности для некоторого асимметрического атома как сумму обратных величин площадей треугольников, которые меняют знак для энантиомеров. Это происходит следующим образом. Для каждого треугольника можно ту сторону, которая направлена к хиральному центру, назвать внутренней, а противоположную – внешней. Тогда для энантиомеров хиральный центр будет лежать по разные стороны плоскости одного и того же треугольника, поэтому векторное произведение 2-х векторов, образующих стороны треугольника, будет иметь смысл площади этого треугольника, но разные знаки для энантиомеров.

Итак, имеем

$$\chi(M) = a \sum_i S^{-1}(\Delta_i),$$

где  $a$  – нормировочный коэффициент, зависящий от того, какое соединение мы примем за максимально хиральное. С химической точки зрения таковым следует признать CHFClBr. У этой молекулы площади треугольников  $\Delta_1=(H, F, Cl)$ ,  $\Delta_2=(H, F, Br)$ ,  $\Delta_3=(H, Cl, Br)$  и  $\Delta_4=(F, Cl, Br)$  будут иметь минимальные значения.

Тогда мы имеем  $a \sum_{i=1}^4 S^{-1}(\Delta_i) = 1$ , т.е.  $a = \left( \sum_{i=1}^4 S^{-1}(\Delta_i) \right)^{-1}$ .


**THE MEASURE OF CHIRALITY OF BIOLOGICALLY ACTIVE ORGANIC COMPOUNDS**

*Smolenskii E.A., Zhokhova N.I., Ryzhov A.N., Chuvylkin N.D.*

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry (ZIOC RAS), Moscow, Russia

e-mail: smolensk@server.ioc.ac.ru

Chirality is one of the most important characteristics of biologically active compounds. There are known some attempts of quantitative estimation of the "measure of chirality" in the literature. Among them are publications of K. Mislov, D. Avnir, V. Kuzmin, G. Gilat, etc. The following restrictions are suggested for this parameter:

$$-1 \leq \chi(M) \leq 1, \chi(M) = -\chi(M'),$$

where  $\chi(M)$  is a "measure of chirality",  $M$  and  $M'$  are enantiomers. The "degree of chirality" is determined as  $|\chi(M)|$ .

We propose a new approach for description of "degree of chirality", which is simple and evident for chemists. On the basis of idea of oriented triples of atoms, suggesting in the previous communication, one can estimate the "measure of chirality" for any asymmetric atom as the sum of inverse values of triangle squares. The signs of these values may change in dependence of enantiomers pair.

We can model this process as following. Let us consider the side of triangle, which is faced to the center of chirality, as "internal" one, and the opposite side as "external" one. Then for the pair of enantiomers the centers of chirality will take place at opposite sides of flatness of the same triangle. Therefore, vector product of two vectors, restricting sides of this triangle, will be equal to the square of the same triangle, but its value will possess different signs for different enantiomers.

The corresponding equation is

$$\chi(M) = a \sum_i S^{-1}(\Delta_i),$$

where  $a$  is a normalized coefficient, depending on the type of a chemical compound which is defined as an maximally chiral object. This compound is CHFCIBr from the chemical viewpoint. For this molecule, the squares of triangles  $\Delta_1=(H, F, Cl)$ ,  $\Delta_2=(H, F, Br)$ ,  $\Delta_3=(H, Cl, Br)$  and  $\Delta_4=(F, Cl, Br)$  are minimal.

Then we have  $a \sum_{i=1}^4 S^{-1}(\Delta_i) = 1$ ; consequently,  $a = \left( \sum_{i=1}^4 S^{-1}(\Delta_i) \right)^{-1}$ .



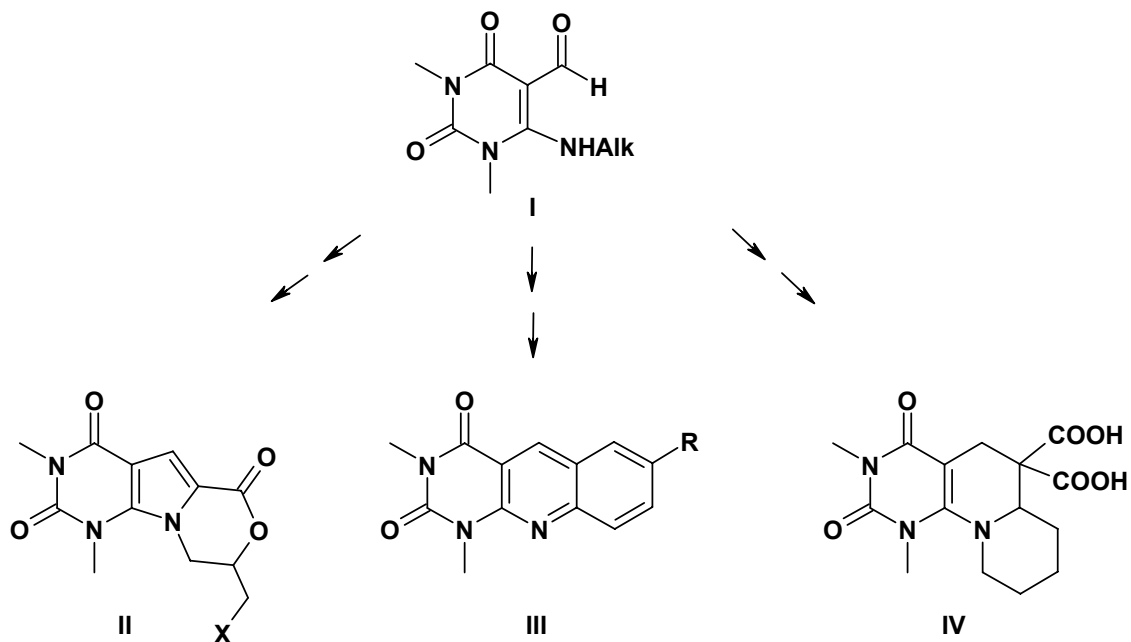
### КОНДЕНСАЦІЇ 6-АЛКІЛАМІНО-5-ФОРМІЛ-1,3-ДИМЕТИЛУРАЦИЛУ

Смолій О.Б., Музичка Л.В., Вервес Є.В.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна

e-mail: Smolii@bpci.kiev.ua

Похідні піримідин-2,4-діону (арофілін, доксофілін, сіпамфілін) є ефективними антагоністами аденозинових рецепторів [1]. На основі 6-алкіламіно-5-форміл-1,3-диметилурацилу (I) здійснені препаративні синтези ряду нових похідних конденсованих гетероциклічних систем (II, III, IV).



R= H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, F, Cl; X= OH, NAlk.

**Література:**

1. Arumugam Kodimuthali, S. Sugin Lal Jabaris, J. Med. Chem., 2008, 51 (18), 5471-5489



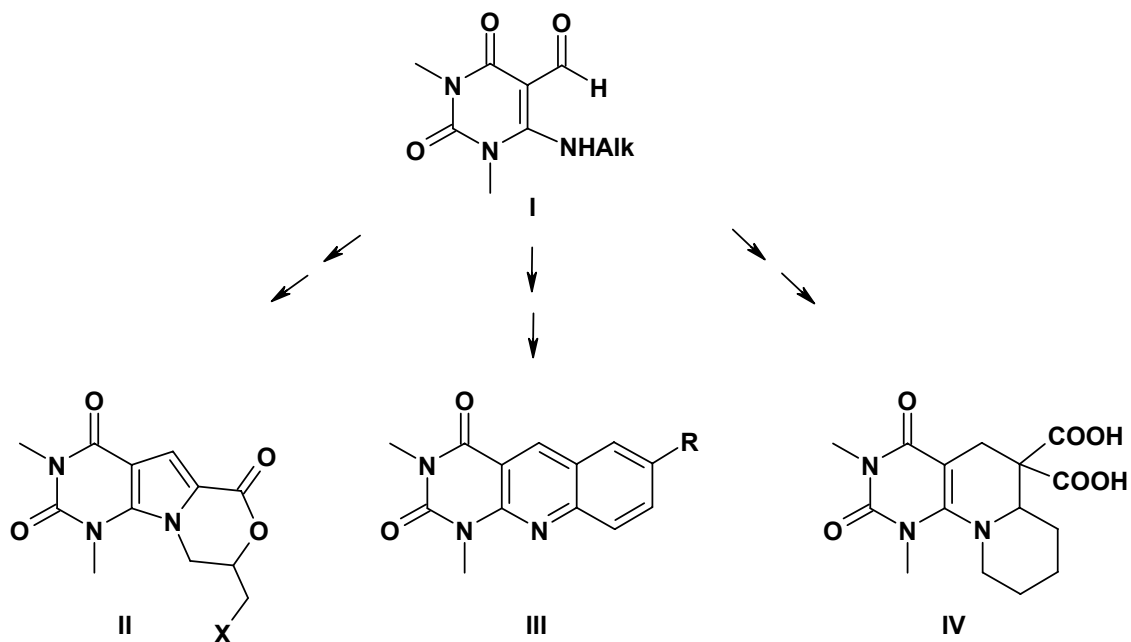
CONDENSATIONS OF 6-ALKYLAMINO-5-FORMYL-1,3-DIMETHYLURACIL DERIVATIVES

Smolii O.B., Muzychka L.V., Verves E.V.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: Smolii@bpci.kiev.ua

Pyrimidine-2,4-dion derivatives (*arofylline*, doxofylline, cipamfylline) have been shown to be effective adenosine receptor antagonists [1]. New derivatives of condensed heterocyclic systems (II, III, IV) have been prepared from 6-alkylamino-5-formyl-1,3-dimethyluracil (I).



R= H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, F, Cl; X= OH, NAlk.

References:

1. Arumugam Kodimuthali, S. Sugin Lal Jabaris, J. Med. Chem., 2008, 51 (18), 5471-5489



## БИОПОЛІМЕР-АПАТИТНІ НАНОКОМПОЗИТНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ МЕДИЦИНИ

Суходуб Л. Ф.

Інститут прикладної фізики НАН України, Суми, Україна  
e-mail: l\_sukhodub@yahoo.com; sukhodub@ipfcentr.sumy.ua

В роботі наведені результати дослідження трьох різних нанокompatитних систем, а саме: хітозан-апатитної, гідрогель-гідроксилапатитної (ГА) та колаген-апатитних покриттів на субстратах із  $Ti_6Al_4V$ . Типові аналітичні методи такі як рентгенівська дифракція, інфрачервона спектроскопія, скануюча електронна мікроскопія з рентгенівським енергоаналізатором (EDX) були використані для ідентифікації отриманих матеріалів. Особлива увага приділена *in-vivo* тестам хітозан-апатитним зразкам на лабораторних 4-місячних щурах. За допомогою методики EDX, процес формування нанокристалітів ГА в гідрогелевих нанореакторних матрицях був максимально оптимізований. У випадку мікро гранул на основі гомополіакриламідного гелю інкорпорований ГА відповідав стехіометричному складу ( $Ca/P=1.67$ ). Термосубстратний метод, який був не так давно запропонований для отримання покриття із ГА на титані був використаний для отримання високо кристалічного ГА на субстратах із  $TiAlV$  при фізіологічній температурі. Покриття отримували як на чистому субстраті, так і покритому колагеном. Висок кристалічний ГА утворювався при рН 6,15. Швидкість депозиції зменшувалась з пониженням рН, а також при підвищенні рН до 6,3 – падала кристалічність. Колаген покращував як кристалічність, так і швидкість формування покриття.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### MATERIALS BASED ON BIOPOLYMER-APATITE NANOCOMPOSITES FOR MEDICAL APPLICATIONS

*Sukhodub L. F.*

Institute of Applied Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine  
e-mail: l\_sukhodub@yahoo.com

Present paper discusses the results obtained for three different nanocomposite systems, namely chitosan-apatite, hydrogel-hydroxylapatite (HA) and collagen-apatite coatings onto  $Ti_6Al_4V$  substrates. Common analytical techniques such as X-ray diffraction analysis, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy with X-ray dispersive energy analysis were employed to characterize the resulting materials. Special attention was given to the *in-vivo* tests of the obtained chitosan-apatite composites using 48 linear laboratory rats at the age of 4 months. Using energy dispersive X-ray analysis (EDX) of HA nanoclusters, formed in hydrogel nanoreactor matrixes, the process of their formation depending on monomer nature and ratio, as well as on their consistent state was optimized. In case of microgranules based on homopolyacrylamide gel we observed almost ideal coincidence on the stoichiometric composition with pure HA (Ca/P=1.67). Thermal substrate method recently proposed to obtain hydroxyapatite coating on titanium was used for high crystallinity hydroxyapatite deposition onto titanium-based plate (TiAlV) at the physiological temperature. The coating was produced onto clear plates and onto collagen covered surfaces. The best pH value for depositing of the high crystallinity hydroxyapatite on a target was pH 6,15. Depositing speed was decreased with pH decreasing, and while pH value was increased up to 6,3 crystallinity was going down. Collagen has improved both the speed and the crystallinity of the deposited layers.



## ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Теркина И.А. \*, Черницына С.М. \*, Федорова Г.А. \*, Соболевская М.П. \*\*, Парфенова В.В. \*

\* Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия  
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия  
e-mail: iterkina@mail.ru

В настоящее время широкое использование антибиотиков в медицинских и немедицинских целях привело к появлению и распространению в окружающей среде все большего числа антибиотикорезистентных микроорганизмов. Одним из основных путей преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам является поиск и изучение антибактериальных метаболитов микроорганизмов, обитающих в окружающей среде. Поэтому исследование микробного сообщества озера Байкал - уникального древнего пресноводного водоема, в котором обнаружено большое количество редких и специфичных для озера микроорганизмов, представляет большой интерес. Особые экологические условия этого водоема (низкое содержание растворенного органического вещества, постоянная низкая температура воды, высокое содержание растворенного кислорода) оказывают значительное влияние на жизнедеятельность и взаимоотношения микроорганизмов, которые могут оказаться источниками новых антибактериальных соединений с уникальными свойствами.

В результате исследований из воды и губок озера выделены и протестированы на антимикробную активность 220 штаммов бактерий и 154 штамма актиномицетов. Обнаружено, что 47% штаммов микроорганизмов, выделенных из байкальских губок, и 70% штаммов, выделенных из воды озера, подавляют рост и развитие *E. faecium*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* и *C. albicans*. Изучены морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства некоторых штаммов актиномицетов и бактерий, обладающих антибактериальной активностью, и проведена их идентификация методами классической и молекулярной микробиологии. В результате, определены представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* и *Proteus*. Бактерии с антимикробной активностью, выделенные из байкальских губок, являются резистентными к антибиотикам тетрациклинового и пенициллинового ряда, а также к налидиксовой кислоте и карбенициллину.

Результаты тестирования микробных экстрактов некоторых штаммов *Streptomyces* показали присутствие в них соединений, обладающих достаточно высокой антимикробной активностью к патогенным (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *S. aureus*) и к условно-патогенным микроорганизмам (*L. seeligeri*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* и *E. coli*), а также противоопухолевой и экзогликозазной ферментативной активностями [1].

Проведен скрининг питательных сред и условий максимального образования и накопления антимикробных веществ в микробных экстрактах стрептомицетов и бактерий, обладающих антибактериальной активностью. Установлено, что у большинства стрептомицетов широкий спектр антибактериального действия обнаружен при культивировании на полусинтетической среде с глицерином.

Методами ГЖХ и ГЖХ-МС исследован состав неполярных фракций в микробных экстрактах некоторых штаммов *Streptomyces*. Отмечена особенность штамма *Streptomyces* sp. LB T5 продуцировать дегидроабетиновую кислоту. Выявлено высокое содержание ненасыщенных жирных кислот (16:1, 18:1 и 18:2) в мембранных липидах байкальских стрептомицетов, что позволяет мембранам находиться в функционально активном состоянии в условиях низких температур, характерных для озера Байкал.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ - Байкал № 05-05-97271 и междисциплинарного проекта СО РАН № 96.

### Литература:

1. Соболевская М. П., Теркина И. А. и др. Биологически активные соединения стрептомицетов озера Байкал // Химия природных соединений. Т. 42. № 1. 2006. С. 65-69.



**INVESTIGATION OF MICROORGANISMS OF LAKE BAIKAL – POTENTIAL PRODUCERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

Terkina I.A. \*, Chernitsina S.M. \*, Fedorova G.A. \*, Sobolevskaya M.P. \*\*, Parfenova V.V. \*

\*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

\*\*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FED RAS, Vladivostok, Russia

e-mail: iterkina@mail.ru

At present widespread application of antibiotics in medical and non-medical purposes is a result of appearance and distribution of large numbers of antibiotic-resistance microorganisms in the environment. One of the main ways to overcome resistance of microorganisms to antibiotics is to isolate and study antibacterial metabolites of microorganisms inhabiting in nature. So, investigation of microbial community of Lake Baikal – a unique ancient freshwater reservoir in which the high number of rare and endemic microorganisms has been already found out is the great interest. The specific ecological conditions of the lake (low content of dissolved organic matter, permanent low water temperature and high content of dissolved oxygen) affect significantly the vital functions of microorganisms and interactions between them. The microorganisms can be the sources of new antibacterial compounds with unique properties.

Totally 220 bacterial isolates and 154 actinomycetes isolates have been selected from lake water and sponges and tested on antimicrobial activity. It was found that 47% of isolates from Baikal sponges and 70% of isolates from lake water suppressed growth of *E. faecium*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *C. albicans*. Morphological, cultivable, physiological and biochemical features of some actinomycetes and bacterial cultures possessing antibacterial activity have been studied. They were identified with methods of classical and molecular microbiology. As a result the representatives of genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Proteus* have been determined. Bacterial isolates having antimicrobial activity were resistant to tetracycline, penicillin, nalidixic acid and carbenicillin have been obtained.

Data of testing of microbial extracts of some *Streptomyces* isolates found compounds having significantly high antibacterial activity towards pathogenic (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *S. aureus*) and opportunistic microorganisms (*L. seeligeri*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* и *E. coli*) and also exhibiting a cytotoxic effect and endogluconase activity [1].

Screening of nutrient media and conditions of maximal formation and accumulation of antibacterial compounds in microbial extracts of the streptomycetes and bacteria has been carried out. It was found that the most number of studied streptomycetes had a wide spectrum of antibacterial activity when they were cultivated in semi-synthetic medium with glycerin.

Composition of nonpolar fractions in microbial extracts of some *Streptomyces* isolates has been studied using methods of GLC and GLC-MS. The peculiarity of *Streptomyces* sp. LB T5 to produce dehydroabietinic acid has been marked. The high content of unsaturated fatty acid (16:1, 18:1, 18:2) in membrane lipids of baikalian streptomycetes has been found. Probably it allows the membranes to be functionally active in low temperature condition of Lake Baikal.

The work was supported by grant of RFBR-Baikal № 05-05-97271 and by Interdisciplinary project SB RAS № 96.

**References:**

1. Sobolevskaya M.P., Terkina I.A. et al. Biologically active compounds from Lake Baikal streptomycetes // *Chimia prirodnich soedinenii*, V. 42, № 1, 2006, P. 65-69.





**ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЛИПИДОВ И СТЕРИНОВ ДРОЖЖАМИ  
*SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS CNMN-Y-15* НА СРЕДАХ  
ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА**

Усатый А.С., Молодой Е.В., Киселица О.А., Киселица Н.Н., Молдовяну Т.Г.

Институт Микробиологии и Биотехнологии А.Н. Молдовы, Кишинев, Молдова  
e-mail: usatyi.agafia@gmail.com; chiselița@mail.ru

В последнее время особое внимание уделяется исследованиям синтеза эргостерина дрожжами. Дрожжи рода *Saccharomyces* являются основным продуцентом эргостерина (провитамина D<sub>2</sub>). Его содержание может достигать до 10 % от сухого веса биомассы.

Данная работа посвящена изучению закономерностей биосинтеза липидов и стеринов дрожжами *Saccharomyces carlsbergensis CNMN-Y-15* (штамм запатентован как активный продуцент стеринов), культивированных на питательных средах с различными источниками азота, углерода, предшественников и индукторов с целью их оптимизации для направленного синтеза эргостеринов.

В условиях периодического культивирования дрожжей установлено, что из 4-х исследованных источников азота и углерода, культура метаболизирует более эффективно мелассу и глюкозу. Меласса способствует активному росту биомассы (до 7,06 г/л), но в ущерб биосинтезу липидов и стеринов. Максимальное содержание липидов (до 14,4...16,8% на сухой вес) и стеринов (до 9,5...10,1% на сухой вес) обнаружено при культивировании дрожжей в присутствии глюкозы в концентрации 20-40 г/л.

Неоднозначное влияние на биосинтетическую активность дрожжей оказывают предшественники. Установлено, что ацетат цинка в концентрации 30 мг/л способствует накоплению биомассы. Стимулирующий эффект биосинтеза олеогенных биологически активных веществ выявлен при культивировании дрожжей в присутствии ацетата марганца, который в концентрации 10 мг/л стимулирует как биосинтез липидов (на 38%), так и стеринов (на 21% в сравнении с контролем). Положительный эффект можно объяснить тем, что ацетаты являются признанными активаторами коэнзима Ко-А, необходимого в промежуточных реакциях биосинтеза изопреновых соединений.

Впервые установлена эффективность применения координационных соединений цинка, марганца и хрома в качестве индукторов биосинтеза стеринов у дрожжей. В процессе оценки влияния координационных соединений установлено, что самые эффективные индукторы являются соединения цинка и марганца. Соединение [Zn(L-ala)<sub>2</sub>] в концентрации 15 мг/л стимулирует продуктивность дрожжей на 55% в сравнении с контролем. В случае применения [Mn(Gly)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] в концентрациях 5-10 мг/л содержание стеринов в биомассе дрожжей повышается на 16,8...18,6% в сравнении с контролем.

Поскольку, влияние источников азота, углерода, предшественников и индукторов на биосинтетические процессы дрожжей было изучено в отдельности, представляет интерес установить эффект влияния совокупности этих факторов как на продуктивность, так и на биосинтез стеринов и на этой основе оптимизировать питательные среды. Были разработаны более 20 вариантов питательных сред.

Методом математического планирования эксперимента оптимизирован состав двух питательных сред для культивирования *Saccharomyces carlsbergensis CNMN-Y-15*, которые позволяют увеличить продуктивность и содержание стеринов в биомассе дрожжей. Питательная среда в состав которой дополнительно включены меласса и координационное соединение цинка позволяет получить до 8,36 г/л сухой биомассы, что представляет на 89% больше в сравнении с контрольной питательной средой. Другая оптимизированная питательная среда, в состав которой включены глюкоза и ацетат марганца, дает прирост стеринов (на 80,8% в сравнении с контролем).

Разработанные оптимальные питательные среды рекомендуются для использования в биотехнологии культивирования штамма дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis CNMN-Y-15* – продуцента стеринов.



**THE PECULIARITIES OF THE LIPIDS AND STERINS BIOSYNTHESIS AT THE *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 YEASTS IN THE ENVIRONMENTS OF OPTIMAL COMPOSITION**

Usatyi A. S., Molodoi E. V., Kiselita O. A., Kiselita N. N., Moldoveanu T. G.

The Institute of Microbiology and Biotechnology of the Academy of Science of Moldova, Chisinau, 1Moldova  
e-mail: usatyi.agafia@gmail.com; chiselita@mail.ru

In the last years a special attention is given to the researches of the ergosterins yeasts synthesis. The yeasts of the *Saccharomyces* genus represent the main producer of ergosterin (pro-vitamin D2). Its concentration can achieve till 10% from the dry weight of biomass.

The present work is dedicated to the study of the regularities of the lipids and sterins biosynthesis of *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 yeasts (the stem is patented as an active producer of sterins), cultivated in nourishing environments with different sources of azoth, carbon, predecessors and inductors and with the aim of their optimization for the directed synthesis of ergosterins.

In conditions of yeasts periodical cultivation it was determined that from 4 researched sources of azoth and carbon, the culture is metabolizing more effectively the melass and glucose. The melass promotes the active growth of the biomass (till 7,06 g/l), but with a loss of the lipids and sterins biosynthesis. The maximum content of lipids (till 14,4 ... 16,8% in dry weight) and sterins (till 9,5 ... 10,1% in dry weight) was discovered at the yeasts cultivation in the presence of glucose in concentration of 20-40 g/l.

An important influence on the yeasts biosynthetical activity is played by predecessors. It was determined that zinc acetate in concentration of 30 mg/l promotes the active accumulation of the biomass. The stimulating effect of the biosynthesis of oleogenic biologically active substances is revealed at the yeasts cultivation in the presence of manganese acetate, which in concentration of 10 mg/l is stimulating both the biosynthesis of lipids (to 38%) and sterins (to 21% in comparison with the control data). The positive effect can be explained by the fact that the acetates are proven to be activators of the Ko-A coenzyme, which is necessary in intermediate reactions of the biosynthesis of isoprene junctions.

For the 1<sup>st</sup> time it was determined the efficiency of the zinc, manganese and chrome coordination junctions' application as inductors of sterins biosynthesis at yeasts. In the process of evaluation of coordination junctions' influence it was determined that the junctions of zinc and manganese represent the most effective inductors. The junction [Zn(L-ala)<sub>2</sub>] in concentration of 15 mg/l is stimulating the yeasts productivity with 55% in comparison with control data. In the case of application of [Mn(Gly)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] in concentrations of 5-10 mg/l the sterins content in the yeasts biomass is rising to 16,8 ... 18,6 in comparison with control data.

As the influence of the sources of azoth, carbon, predecessors and inductors on biosynthetical processes of yeasts had been studied separately, it is interesting to determine the effect of the influence of the totality of these factors both on productivity and sterins biosynthesis and in this regard to optimize the nourishing environments. There were elaborated more than 20 kinds of nourishing environments.

According to mathematical planning of the experiment it was optimized the composition of two nourishing environments for the cultivation of *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, which allows the increasing of the productivity and the content of sterins in the yeasts biomass. The nourishing environment in the composition of which additionally are included melass and zinc coordination junction allows us to obtain till 8,36 g/l of dry biomass, that represent with 89% more in comparison with the control nourishing environment. The other optimal nourishing environment in the composition of which are added glucose and manganese acetate give us an increase in sterins (with 80,8% in comparison with control data).

The optimal nourishing environments that were elaborated are recommended to be used in the biotechnology of *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 yeasts stem cultivation as sterins producer.



## **ВКЛЮЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В МИКРОКАСУЛЫ (КАРРАГИНАН/ХИТОЗАН; КАРРАГИНАН/ПОЛИ-L-ЛИЗИН)**

*Воробьева О.В., Аванесян С.С., Ковалькова М.В., Пшеничная Э.Н.*

Ставропольский государственный университет, ЮНЦ РАН, Ставрополь, Россия  
e-mail: biomedchem@stavsu.ru

Иммобилизация белков в полиэлектролитные микрокапсулы, сформированные методом последовательной адсорбции полиэлектролитов (ПАП) привлекает внимание специалистов по ряду причин: процесс осуществляется в мягких условиях, препараты отличаются высоким процентом сохранения активности и стабильности. В последнее время много работ посвящено микрокапсулированию биологически активных субстанций (БАС) последовательным нанесением полиэлектролитных слоев на неорганические и коллоидные матрицы, с последующим их растворением. Прохождение через полиэлектролитную мембрану продуктов распада ядер частично способствует потере количества БАС, иммобилизованных на твердую матрицу. Формирование микрокапсул методом ПАП на белковых комплексах позволяет снизить потери активного вещества при капсулировании и, следовательно, повысить процент активности.

Для изучения процесса получения микрокапсул методом ПАП на белковые комплексы и исследования их свойств в качестве модельного белка был выбран пепсин лиофилизированный. Для формирования полиэлектролитных оболочек микрокапсул были использованы биodeградируемые полимеры каррагинан, хитозан и поли-L-лизин.

Первой стадией включения пепсина в микрокапсулы является получение белковых комплексов. В связи с этим были оптимизированы по выходу и сохранению удельной активности условия осаждения пепсина: раствор пепсина концентрацией 30 мг/мл, 0,7 мл 0,2 М раствора HCl. Были получены комплексы пепсина с выходом 69,3% и удельной активностью 1715 Е/г фермента, что составило 53% сохранения ферментативной активности. Ферментативную активность пепсина определяли спектрофотометрически, в качестве субстрата использовали 1%-ный раствор гемоглобина.

Белковые комплексы пепсина заряжены положительно, поэтому полиэлектролиты (ПЭ) попарно адсорбировали на белковую матрицу, начиная с отрицательно заряженного (2 мг/мл в 0,1М растворе HCl). Суспензию белкового комплекса и полиэлектролита инкубировали при перемешивании в течение 15 мин, центрифугировали, удаляли супернатант, осадок дважды промывали 0,1М раствором HCl. Всего наносили 6 слоёв полиэлектролитов: три слоя каррагинана и три слоя хитозана. При нанесении второй пары ПЭ вместо хитозана использовали поли-L-лизин. Полученные микрокапсулы суспензировали в дистиллированной воде при 4°C. Процент включения пепсина в ПЭ микрокапсулы каррагинан/хитозан и каррагинан/поли-L-лизин составил 47,5% и 58,6% соответственно.

Исследование влияния pH и времени на стабильность микрокапсул показало, что для ПЭ каррагинан/хитозан время, через которое высвобождается максимальное количество белка (94%) составляет 1 час, для ПЭ каррагинан/ поли-L-лизин – 1,5 часа (88%); pH в обоих случаях 4,0. Процент сохранения удельной активности микрочастиц через 1 месяц составляет 82% (для ПЭ каррагинан/хитозан) и 79% (для ПЭ каррагинан/ поли-L-лизин), а по истечении 3 месяца удельная активность составляет – 59 и 49% соответственно.

С целью увеличения процента включения белка в микрокапсулы разработан метод соосаждения пепсина с полиэлектролитами. К раствору пепсина с концентрацией 30 мг/мл в ацетатном буферном растворе pH 2,0 добавляли раствор каррагинана в 0,2М HCl с концентрацией 10 мг/мл, интенсивно перемешивали в течение 15мин. Супернатант отделяли от осадка центрифугированием, после чего промывали 0,2М раствором HCl для осаждения несвязавшегося белка. Поли-L-лизин адсорбировали из 0,2М раствора HCl с концентрацией 5 мг/мл.

Количество пепсина, включенного в микрокапсулы, оценивали по разнице концентраций белка в исходном растворе и супернатанте, используя метод Варбурга и Кристиана. Процент включения белка в микрокапсулы составил 72,3 %, удельная ферментативная активность 2567 Е/г фермента.

На примере пепсина предложены методики получения микрокапсул с включенным белковым комплексом методами ПАП и соосаждением. Показана возможность регулирования высвобождения белка из микрокапсул путем изменения pH среды и времени постановки ферментативной реакции. Изучена активность инкапсулированного пепсина.

Данные, представленные выше, позволяют сделать вывод о возможности получения микрокапсулированных белковых препаратов, стабильных при хранении и сохраняющих при этом высокий процент удельной активности.



**INCORPORATION OF PROTEIN COMPLEXES INTO MICROCAPSULES  
(KARRAGENAN/CHITOZAN; KARRAGENAN/POLY-L-LYSINE)**

*Vorobyova O.V., Avanesjan S.S., Kovalkova M.V., Pshenichnaya E.N.*

Stavropol state university, SSC of the Russian Academy of Sciences, Stavropol, Russia  
e-mail: biomedchem@stavsru

The immobilization of proteins into the polyelectrolytic microcapsules generated with a method of consecutive adsorption of polyelectrolytes (CAP) attracts attention of specialists for some reasons: the process is carried out in soft conditions, the preparations differ in high percent of activity and stability conservation. Recently a lot of researches are devoted the microcapsulation of biologically active substances (BAS) with consecutive layering of polyelectrolytes on inorganic and colloidal templates with their subsequent dissolution. A penetration through the polyelectrolytic membrane of decay products of nuclei particularly promotes the loss of the BAS quantity, immobilized on a firm template. The formation of microcapsules on the protein complexes with CAP method will allow to reduce the active agent losses at capsulation and, hence, to raise activity percent.

The lyophilized pepsin was chosen as a protein model for the analysis of process of microcapsules production on protein complexes with CAP method and for the studying of their properties. The biodegraded polymers karragenan, chitozan and poly-L-lysine were used for the formation of polyelectrolytic layers of microcapsules.

The first stage of a pepsin incorporation into the microcapsules is the production of protein complexes. In this connection there were optimized the conditions of the pepsin sedimentation on a yield and conservation of specific activity: solution of a pepsin concentration of 30 mg/ml, 0,7 ml of 0,2 M HCL solution. There were obtained the pepsin complexes with a yield of 69,3% and enzyme specific activity of 1715 U/g that compounded 53 % of enzyme activity conservation. The pepsin enzyme activity was determined spectrophotometrically, the 1% hemoglobin solution was used as a substrate.

Protein complexes of a pepsin are positively charged, therefore the polyelectrolytes (PE) were adsorbed on the protein template in pairs, starting with negatively charged one (2 mg/ml in 0,1M HCl solution). The suspension of the protein complex and polyelectrolyte was incubated at agitating during 15 minutes, centrifuged, a supernatant was removed. The sediment was twice washed with 0,1M HCl solution. In total 6 layers of polyelectrolytes were put: three layers of karragenan and three layers of chitozan. At layering of the second pair of PE poly-L-lysine was used instead of chitozan. The obtained microcapsules were suspended in distilled water at 4°C. The percent of the pepsin incorporation into PE microcapsules from karragenan/chitozan and karragenan/poly-L-lysine has compounded 47,5 % and 58,6 % accordingly.

The research of pH value and time influence on stability of microcapsules has shown, that for the PE karragenan/chitozan the time, within which the protein maximum quantity (94 %) liberates, has compounded 1 hour, for the PE karragenan/poly-L-lysine – an hour and a half (88 %); in both cases the pH value is 4,0. The percent of specific activity conservation of microparticles compounds 82 % in 1 month (for the PE karragenan/chitozan) and 79 % (for the PE karragenan/poly-L-lysine), and after 3 months the specific activity compounds – 59 and 49 % accordingly.

For the purpose of increase of protein incorporation percent into the microcapsules the method of a pepsin coprecipitation with polyelectrolytes is developed.

The karragenan solution in 0,2M HCl with concentration of 10 mg/ml was added to the pepsin solution with concentration of 30 mg/ml in the acetate buffer solution with pH value of 2,0 and all that was intensively mixed during 15 min. The supernatant was removed from the deposit with a centrifuging, then it was washed with 0,2M HCl solution for the sedimentation of not connected protein. Poly-L-lysine was adsorbed from 0,2M HCl solution with concentration of 5 mg/ml.

The quantity of the pepsin incorporated into the microcapsules was estimated on the difference of protein concentrations in initial solution and in supernatant, using the Warburg and Christian's method. The percent of protein incorporation into the microcapsules has compounded 72,3 %, the specific enzyme activity is 2567 U/g of the enzyme.

The obtaining procedures of microcapsules with incorporated protein complex with CAP and coprecipitation methods are offered on the pepsin example. The possibility of regulating of protein liberation from microcapsules by changing the pH value and the statement time of the enzymatic reaction is shown. The activity of the encapsulated pepsin is studied.

The data introduced above, allow to draw a conclusion about the obtaining possibility of the encapsulated protein preparations, stable at storage and conserving thus high percent of specific activity.

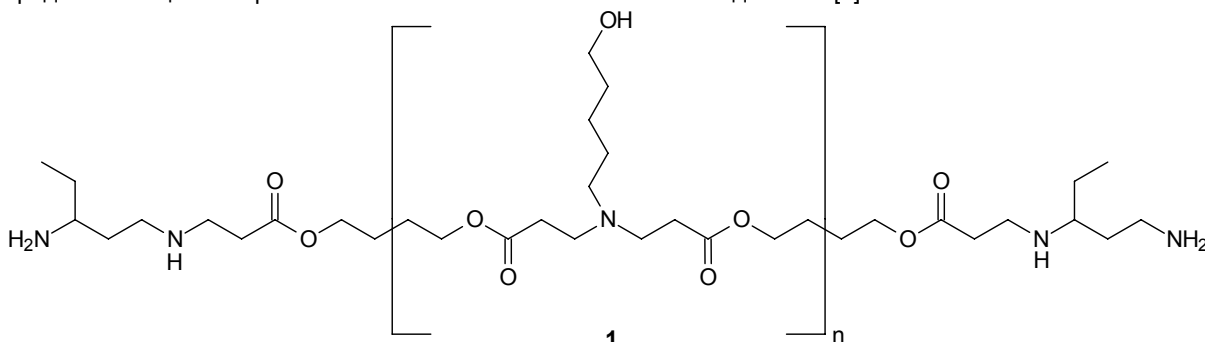


## СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3-ПРОПИЛЕНДИАМИНА НА ОСНОВЕ 4,5-ДИГИДРО-3*H*-ПИРАЗОЛОВ

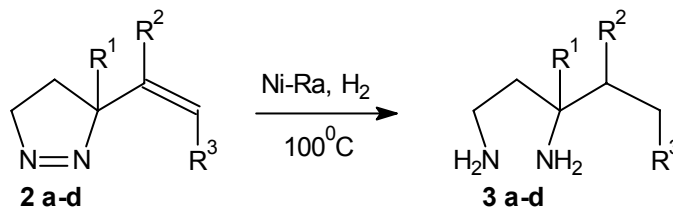
Яковлев К.В., Петров Д.В., Докичев В.А.

УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: dokichev@anrb.ru

Важным направлением генной терапии является создание биоразлагаемых полимерных наночастиц, облегчающих невирусный перенос генов к зародышевым клеткам человека (hESCs). Формирование наночастиц осуществляется путем самосборки плазмид ДНК и гидролитически разлагаемых поли-β-аминоэфиров **1**. Варьирование концевых фрагментов поли-β-аминоэфиров (например, с помощью 1,3-диаминопентана) улучшает биофизические свойства наночастиц и эффективность функции переноса генов [1]. 1,3-Диаминопентан также находит применение для получения модифицированных пептидов, представляющих интерес в качестве биологически активных соединений [2].



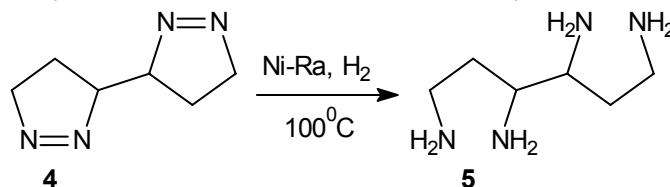
В настоящей работе предложен метод синтеза производных 1,3-пропилендиамина путем восстановления 3-алкенил-3*H*-пиразолинов.



**a:**  $R^1=R^2=R^3=H$ ; **b:**  $R^1=R^2=H$ ,  $R^3=Me$ ;

**c:**  $R^1=R^3=H$ ,  $R^2=Me$ ; **d:**  $R^1=R^2=Me$ ,  $R^3=H$ ;

Установлено, что каталитическое гидрирование 3-винил- **2a**, *цис*-3-[(1*E*)-проп-1-ен-1-ил]- **2b**, 3-изопропенил-3-метил- **2c** или 3-изопропенил-4,5-дигидро-3*H*-пиразола **2d** в присутствии никеля Ренея в среде  $CH_3OH$  в автоклаве приводит с выходом 90-99% к 1,3-диаминопентану **3a**, 1,3-диаминогексану **3b**, 1,3-диамино-4-метилпентану **3c** или 1,3-диамино-3,4-диметилпентану **3d** соответственно.



При восстановлении 4,4',5,5'-тетрагидро-3*H*,3'*H*-3,3'-бипиразола **4** образуется 1,3,4,6-тетрааминогексан **5** с выходом 95 %.

### Литература:

1. J.J. Green, B.Y. Zhou, M.M. Mitalipova, C. Beard, R. Langer, R. Jaenisch, D. G. Anderson, *Nano Lett.*, vol. 8, № 10, 3126 (2008).
2. R. Gunther, A. Stein, F. Bordusa, *J. Org. Chem.*, vol. 65, №. 6, 1672 (2000).

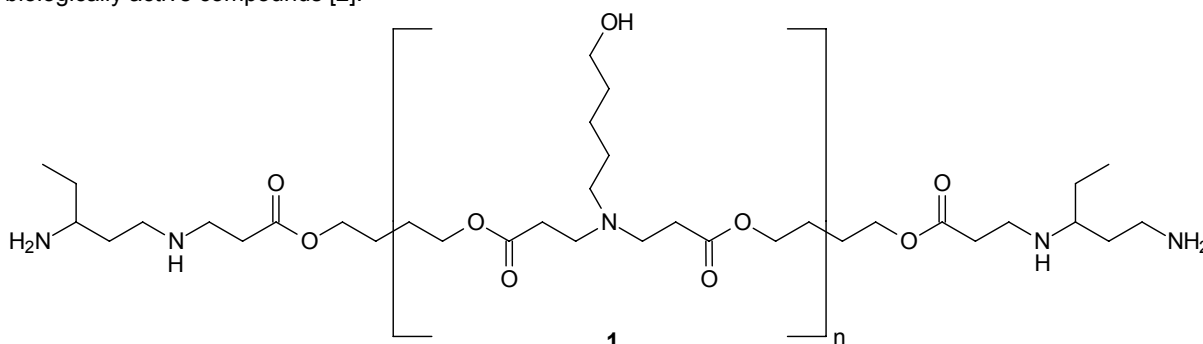


## SYNTHESIS OF 1,3-PROPYLENDIAMINE DERIVATIVES ON BASIS OF 4,5-DIHYDRO-3H-PYRASOLES

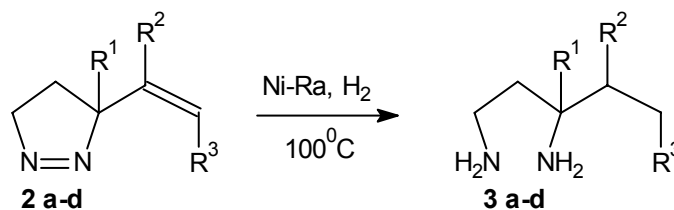
Yakovlev K.V., Petrov D.V., Dokichev V.A.

<sup>a</sup>Institution of the RAS Institute of Organic Chemistry of Ufa Scientific Centre of the RAS, Ufa, Russia  
e-mail: dokichev@anrb.ru

The production of biodegradable polymeric nanoparticles, which facilitate nonviral gene transfer to human embryonic stem cells (hESCs) is an important direction of gene therapy. The nanoparticles are formed by the self assembly of plasmid DNA and hydrolytically degradable poly( $\beta$ -amino esters). The varying the end group of the polymer (for example, with 1,3-diaminopentane) improves the biophysical properties of the resulting nanoparticles and their gene-delivery efficacy [1]. 1,3-Diaminopentane is also used to produced peptide isosteres, interesting as biologically active compounds [2].



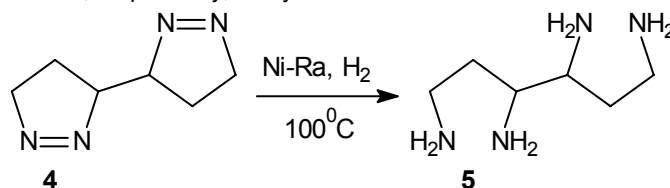
In this work a method of synthesis of 1,3-propylenediamine via the reduction of 3-alkenyl-3H-pyrazolines is proposed.



**a:**  $R^1=R^2=R^3=H$ ; **b:**  $R^1=R^2=H$ ,  $R^3=Me$ ;

**c:**  $R^1=R^3=H$ ,  $R^2=Me$ ; **d:**  $R^1=R^2=Me$ ,  $R^3=H$ ;

It was found, that the catalytic hydrogenation of 3-vinyl- **2a**, *cis*-3-[(1E)-prop-1-en-1-yl]- **2b**, 3-isopropenyl-3-methyl- **2c**, or 3-isopropenyl-4,5-dihydro-3H-pyrazoles **2d** in the presents of Raney nickel in  $CH_3OH$  in an autoclave results in 1,3-diaminopentane **3a**, 1,3-diaminohexane **3b**, 1,3-diamino-4-methylpentane **3c** or 1,3-diamino-3,4-dimethylpentane **3d**, respectively, in a yield 90-99%.



The reduction of 4,4',5,5'-tetrahydro-3H,3H'-3,3'-bipyrazole **4** gives 1,3,4,6-tetraaminohexane **5** in a yield 95%.

### References:

1. J.J. Green, B.Y. Zhou, M.M. Mitalipova, C. Beard, R. Langer, R. Jaenisch, D. G. Anderson, *Nano Lett.*, vol. 8, № 10, 3126 (2008).
2. R. Gunther, A. Stein, F. Bordusa, *J. Org. Chem.*, vol. 65, №. 6, 1672 (2000).



## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРА И МОРСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ

<sup>1</sup>Юркова И.Н., <sup>1</sup>Панова Э.П., <sup>1</sup>Панов Д.А., <sup>2</sup>Рябушко В.И., <sup>3</sup>Пархоменко Н.А.

<sup>1</sup>Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина  
e-mail: nanosilver@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт биологии южных морей им. А.А. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина

<sup>3</sup>Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, Киев, Украина

Препараты серебра имеют давнюю историю применения в медицине. Однако с появлением антибиотиков интерес к ним заметно снизился. Быстрое распространение антибиотикоустойчивых штаммов, а также влияние антибиотиков на иммунный статус привело к развитию направлений, связанных с разработкой новых препаратов на основе серебра, применяемых для лечения инфицированных ран, создания противоопухолевых, антибактериальных и фунгицидных препаратов, а также средств для стерилизации и консервирования воды и др. В отличие от антибиотиков, препараты серебра имеют более широкий антибактериальный спектр, не вызывают привыкания, не подавляют иммунную систему, значительно более активны в отношении вирусной и грибковой инфекции. В сравнении с ионным серебром, структурированное серебро, медленно растворяясь в биологических жидкостях, проявляет пролонгированное действие.

Нами создан новый подход к синтезу нанобиокомпозигов серебра на основе уникальной стабилизирующей полимерной матрицы морского полисахарида альгината натрия определенного молекулярного веса. Макромолекулы альгината не только стабилизируют наночастицы серебра, но и непосредственно участвуют в их формировании, контролируют размер и форму. Они синергетически усиливают активность наносеребра, обеспечивая его высокую стабильность, биосовместимость, мембранотропность, иммуномодулирующие свойства и пролонгированное действие.

Установлены оптимальные параметры получения наночастиц серебра: соотношение ионного серебра и альгината натрия, pH среды, время экспозиции. Показано, что наночастицы серебра сохраняют высокую стабильность в течение длительного времени.

Методами оптической спектроскопии, просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии исследована морфология поверхности нанобиокомпозигов, определены размер и распределение полидисперсности наночастиц серебра.

В отличие от известных аналогов, полученные нанобиокомпозиты обладают высокой стабильностью, что особенно важно в медицине (физиологические растворы, биологические жидкости). Они совмещают два уникальных биологически активных компонента: высокостабильные наночастицы серебра и биополимеры морских гидробионтов. Синтез наночастиц серебра в матрице биополимера имеет преимущества при модификации различных медицинских сорбентов (углеродные материалы, цеолиты и др.).

Получены образцы водорастворимых бактерицидных композиций и углеродных сорбентов медицинского назначения, модифицированных наночастицами серебра и исследовано их антибактериальное и противогрибковое действие на тест-культурах микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Streptococcus bovis*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerosis*. Показано, что наиболее эффективная концентрация наночастиц серебра для большинства тест-культур микроорганизмов-возбудителей заболеваний людей и животных составляет 0,05-0,1 г/л.

Разработанный способ получения водорастворимых нанобиокомпозигов серебра в матрице биологически активных полимеров морского происхождения может быть положен в основу создания новых безопасных и эффективных медицинских и ветеринарных препаратов пролонгированного действия.



## **BIOLOGICALLY ACTIVE NANOCOMPOSITES BASED ON SILVER AND MARINE POLYSACCHARIDES**

<sup>1</sup>Yurkova I.I., <sup>1</sup>Panova E.P., <sup>1</sup>Panov D.A., <sup>2</sup>Ryabushko V.I., <sup>3</sup>Parhomenko N.A.

<sup>1</sup> V.I.Vernadsky Tavrida National University, Simferopol, Ukraine  
e-mail: nanosilver@rambler.ru

<sup>2</sup>Institut of Biology of Southern Seas NASU, Sevastopol, Ukraine

<sup>3</sup>State scientifically-control institute of biotechnology and microorganisms strain, Kiev, Ukraine

Preparations of silver have old history of application in medicine. However with appearance of antibiotics interest went down appreciably to them. Rapid distribution of antibiotic resistantly strains, and also influence of antibiotics on immune status resulted in development of directions, related to developing of new silver-based preparations, use to treatment of infected wounds, making antitumoral, antibacterial and antifungal agents, and also agents for sterilization and preserving waters and other. Unlike antibiotics, silver-based preparations have broad antibacterial spectrum, non-addictive, non-inhibit the immune system and considerably more active in regard to a viral and mycotic infection. By comparison to ionic silver, the structured silver, slowly dissolving in biological liquids and shows the prolonged action.

We have created a new approach to the synthesis of silver nanobiocomposites on the basis of a unique stabilizing the polymer matrix of marine polysaccharide sodium alginate with certain molecular weight. Alginate macromolecules is not only stabilize the nanoparticles of silver, but also involved in their formation, control their size and shape. They reinforce the synergistic activity of nanosilver, providing its high stability, biocompatibility, membranotropic, immunomodulation properties and prolonged action.

The optimum parameters obtaining nanoparticles of silver are ascertained: correlation of ionic silver and sodium alginate, pH and exposure time. It is shown that nanoparticles of silver save high stability in long-term.

Morphology of surface, size and assignment polydispersity nanoparticles of silver by the methods of optical spectroscopy, transmission electron and scanning electron microscopy has been investigated.

Obtained nanocompositions, unlike the known analogues, possess high stability, that is especially important in medicine (physiological solutions, biological liquids). They combine two unique biologically active components: highly stable silver nanoparticles and sea hydrobionts biopolymers.

Synthesis of silver nanoparticles in a matrix of biopolymer has advantages at updating various medical sorbents (carbon materials, zeolites, etc.).

A sample of water-soluble bactericidal composition and carbonaceous sorbate for medical purpose on modified nanoparticles of silver was obtained and antibacterial and antifungal action on test-culture of microorganism has been investigated: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Streptococcus bovis*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerosis*. It is show that more effective concentration of silver nanoparticles for most test-culture of pathogenic agent makes 0.05–0.1 g/l.

The developed way of reception water-soluble silver nanocompositions in a matrix of biologically active sea origin polymers can be put in a basis of creation of new safe and effective medical and veterinary preparations of the prolonged action.





## СИНТЕЗ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КОМПЛЕКСОВ СЕРЕБРА(I) С ЦИСТИНОМ

Заковеряшин В.С.<sup>1</sup>, Третьяков В.В.<sup>2</sup>, Евстропов Н.А.<sup>3</sup>, Глотова Т.И.<sup>4</sup>, Тихонов В.Л.<sup>4</sup>, Сильников В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

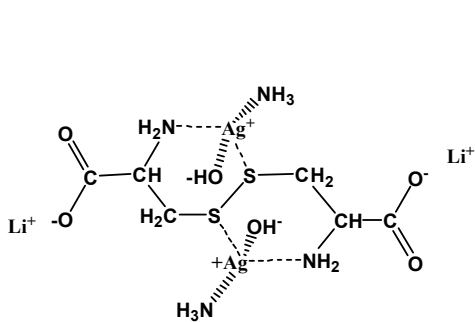
<sup>2</sup> ЗАО "БиоАргоФарм", Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

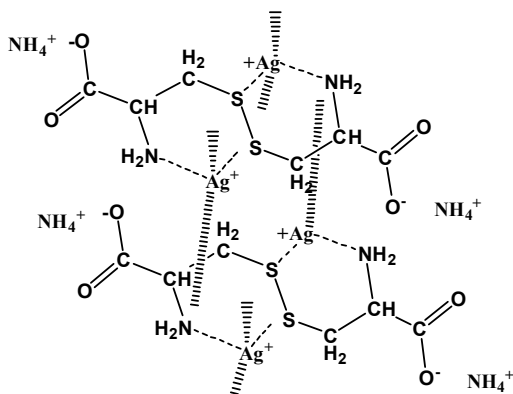
<sup>4</sup> Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии, Новосибирск, Иркутск, Россия.  
e-mail: silnik@niboch.nsc.ru

Антибактериальная активность серебра хорошо известна. В то же время, токсичность серебра по отношению к бактериям значительно выше, нежели к клеткам человека, что позволяет надеяться на получение эффективных и малотоксичных препаратов на его основе. Кроме того, из литературы известно, что некоторые комплексы серебра с аминокислотами обладают высокой противовирусной активностью [1].

Продолжая поиск эффективных лекарственных препаратов на основе ионов серебра, нами был синтезирован и охарактеризован ряд комплексов ионов одновалентного серебра с рядом природных аминокислот. В настоящей работе представлены несколько светостойких комплексов серебра(I) с цистином: (I)  $\text{Li}_2[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$ , (II)  $\text{Na}_2[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$ , (III)  $\text{Li}^+[\text{Ag}^+_2 \text{Cys}_2^{2-}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]$  (IV)  $[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2]_n$  ( $\text{Cys}_2 = \text{cystine}$ ). На основе цистина могут быть получены как водорастворимые (I-III), так и практически не растворимые в воде комплексы (IV) с серебра (I). Водорастворимые комплексы были получены при взаимодействии  $\text{NO}_3^-[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]$  с дилитиевой, монолитиевой или динатриевой солью аминокислоты (водный раствор, pH 11, 20 °C, 2-12 ч). При увеличении времени взаимодействия до 24 часов и более, а также при переходе к аммонийным солям цистина образуется не растворимый в воде комплекс (IV). Предполагаемые структуры водорастворимого и не растворимого комплексов представлены ниже.



Водорастворимый комплекс I



Водонерастворимый комплекс IV

Полученные соединения были охарактеризованы данными ИК, УФ, ЯМР спектроскопии. Структура соединений подтверждена данными рентгенструктурного анализа в порошке. Данные элементного анализа согласуются с расчетными данными приведенных эмпирических формул соединений I-IV

Была сделана предварительная оценка биологической активности полученных соединений. LD<sub>50</sub> комплекса (I) при внутрибрюшинном введении мышам составила 0.825 г/кг (средний вес мышей около 26 г, диапазон испытанных доз 0.4-1.2 г/кг). В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что полученные комплексы обладают выраженной противовирусной активностью по отношению к вирусу диареи КРС, вирусу бычьего лейкоза, а также к вирусам Коксаки группы В. Для соединения II в экспериментах на клеточных культурах и мышах был обнаружена умеренно выраженная интерферон индуцирующая активность.

Проведенные эксперименты показывают перспективность поиска эффективных противовирусных препаратов широкого спектра действия на основе комплексов ионов серебра с органическими лигандами.

Работа выполнена при поддержке программы РАН "Фундаментальные науки медицине", проект №30 и Интеграционного проекта СО РАН, проект № 85.

### Литература:

1. Meng, F.-D. Zhao, Q.-Q. Li, M.-X. Xin, Y.-C. Synthesis and Antivirus Activity of Amino Acid Schiff Base Complexes with Silver(I) // Chinese J. Appl. Chem. 2002. V. 19. P. 1183-1185.



## SYNTHESIS AND ANTI-VIRUS ACTIVITY OF WATER-SOLUBLE SILVER(I) COMPLEXES WITH CYSTINE

Zakovryashin V.S.<sup>1</sup>, Tretyakov V.V.<sup>2</sup>, Evstropov N.A.<sup>3</sup>, Glotova T.I.<sup>4</sup>, Tichonov V.L.<sup>4</sup>, Silnikov V.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of chemical biology and fundamental medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>BioArgoPharm Company, Novosibirsk, Russia

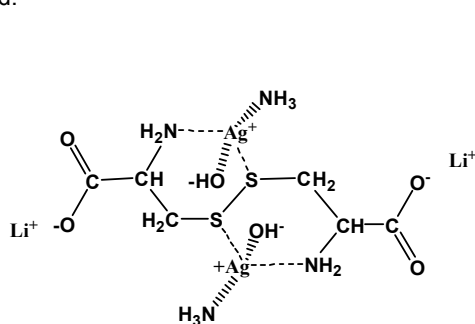
<sup>3</sup>Novosibirsk state medicine university, Novosibirsk

<sup>4</sup>Institute of experimental veterinary science of Siberia and the Far East, Irkutsk, Novosibirsk, Russia

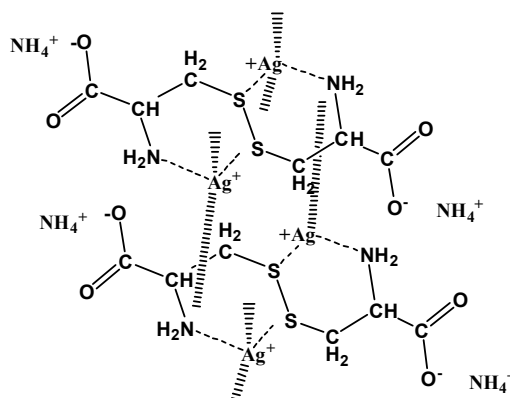
e-mail: silnik@niboch.nsc.ru

The antibacterial activity of silver has long been known and has found a variety of applications because its toxicity to human cells is considerably lower than to bacteria. Also it was established that some complex of silver with amino acid derivatives exhibit higher antivirus activity [1].

In continuation of the search for new effective drugs of this type, we have synthesized and characterized the silver complexes with series of natural amino acids. In this work, we present several light stable silver(I) complexes: (I)  $\text{Li}_2[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$ , (II)  $\text{Na}_2[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$ , (III)  $\text{Li}^+[\text{Ag}_2^+ \text{Cys}_2^{2-}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]$  (IV)  $[\text{Ag}_2(\text{Cys}_2)(\text{NH}_3)_2]_n$  ( $\text{Cys}_2$ =cystine). The silver(I) cystine complex existed in two different forms: the water-soluble powder (I-III) and insoluble polymer (IV). The water-soluble complexes was obtained by reaction of  $\text{NO}_3^- [\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]$  with the dilithium, mono lithium or disodium salts of amino acid (pH 11, 20 °C, 2-12 h). If the reaction time was increase (i.g. 24 h or more) or the lithium was replaced by ammonia, the insoluble complex (IV) was obtained.



Water-soluble complex I



Insoluble complex IV

The synthesized compounds were characterized by data IR, UV, NMR spectroscopy. The structures were checked by X-ray powder diffraction measurements. The data of elemental analyses agree with the results of analytical calculations according to the empirical formulas of the compounds I-IV.

A preliminary study of biological activities of water-soluble complex was carried out. The  $\text{LD}_{50}$  of silver complex (I) for intragastric administration in mice was 0.825 g/kg (mongrel mice weighing about 26 g, a dose ranging 0.4-1.2 g/kg). This compound was found to be active against the virus of Bovine viral diarrhea, Bovine leukaemia virus (in vitro and in vivo data) and Coxsackie virus (in vitro data). Interferon inducing activity of compound II was detected *in vitro* and *in vivo* experiments. The results of our experiments show good prospects in the search for new drugs among the complex compounds of silver with amino acids.

This work was supported by the RAS Presidium Program "Basic Sciences for Medicine" no 30 and Integration project SB RAS no 85.

### References:

1. Meng, F.-D. Zhao, Q.-Q. Li, M.-X. Xin, Y.-C. Synthesis and Antivirus Activity of Amino Acid Schiff Base Complexes with Silver(I) // Chinese J. Appl. Chem. 2002. V. 19. P. 1183-1185.



## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГЕМИНА КАК КАТАЛИЗАТОРЫ ОКИСЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ БИОМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

*Желтухина Г.А.\* , Окороченков С.А.\* , Небольсин В.Е.\*\**

\* Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
e-mail: laboratory211@yandex.ru

\*\* ООО «Фарминтерпрайсез» Москва, Россия

На протяжении ряда лет модифицированные формы гемина продолжают привлекать внимание исследователей в качестве объектов, интересных как для теоретической, так и прикладной науки. Так, модификация гемина – перспективный метод преобразования функций гемопротеидов в другие новые биоматериалы [1]. Получение синтетических производных гемина является путём моделирования функций гемовых ферментов, катализирующих окисление природных органических субстратов.

Нами получена серия новых и известных производных гемина (ПГ), модифицированных по пропионовоокислым остаткам аминокислотами, пептидами и пептидоаминами. Исследована кинетика катализа окисления ПГ полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – компонентов липидных мембран, в модельной системе с применением метиллинолеата (МЛ) и электрода Кларка [2]. Показано, что любая модификация пропионовоокислых остатков гемина снижает эффективность катализа окисления МЛ. В ряду ПГ выявлены вещества, обладающие достаточной, но более низкой по сравнению с геминем эффективностью катализа окисления ПНЖК, повышенной устойчивостью в условиях реакции окисления, а также водорастворимостью. Комплекс этих свойств повышает перспективность использования ПГ для биомедицинского применения, т.к. нерастворимость в воде, чрезмерная эффективность перекисного окисления липидов в цитоплазматической мембране, вызываемого гемом, главным образом обуславливает его высокую токсичность и препятствует практическому применению.

Флуориметрически показана более высокая эффективность разрушения липосом, моделирующих липидную оболочку вирусов, под действием ПГ по сравнению с геминем.

В модельной реакции окисления NADH гидропероксидами ( $H_2O_2$ ,  $Vu^tOH$ ) продемонстрированы пероксидазные свойства ПГ, исследована кинетика процесса и взаимосвязь между их структурой и функцией.

### **Литература:**

1. Takashi H., Hideake S. et al. J. Porph. Phtalocyanines, 2004, V. 8, p. 255-264
2. Roginsky V.A., Zheltukhina G.A., Nebolsin V.E. et al. J. Agric Food Chem., 2007, 55, № 16, 6798-6806



**MODIFIED HEMINE-DERIVATIVES AS CATALYSTS OF NATURAL ORGANIC SUBSTRATES OXIDATION  
AND PERSPECTIVES OF ITS BIOMEDICAL APPLICATION**

*Zheltukhina G.A.\* , Okorochenkov S.A.\* , Nebolsin V.E.\*\**

\*M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

\*\*LTD "Pharmenterprises", Moscow, Russia

For years modified hemine forms are of interest for investigators as object for theoretical and applied science. So, the modification of hemine is a perspective method to hemoproteide reform to other new biomaterials [1]. Synthesis of hemine derivatives is a route of modeling functions of hem proteins that catalyzing natural organic substrates oxidation.

We have synthesized a range of hemine derivatives (HD) modified at it propionic acid residues by amino acids, peptides and peptidoamines. It was investigated the kinetic characteristics of polyunsaturated acids (PUFA), the components of cytoplasm membrane oxidation using model system included methylinoleate (ML) and Clark's electrode [2]. It was demonstrated that any modification of hemine propionic acids residues decreased the efficacy of ML oxidation. In the range of HD we have shown the substances possessed the sufficient effectiveness of PUFA oxidation catalysis, but more low in comparison with hemine; enhanced stability in oxidative reaction conditions and water-solubility. The complex of these properties enhances the perspectives of HD using for biomedical application as insolubility in water, excessive effectiveness of hem-induced lipid peroxidation in cytoplasm membrane are the main reasons of its high toxicity and hindrance in its application.

By using of fluorimetry we have demonstrated more high effectiveness of liposome modeling viral lipid envelop destruction in presence HD in comparison with hemine. In model reaction of NADH oxidation by hydro peroxides ( $H_2O_2$ ,  $Bu^tOH$ ) there were demonstrated the peroxidase properties of HD, investigated the kinetic properties of process and reciprocity between its structure and functions.

**References:**

1. Takashi H., Hideake S. et al. J. Porph. Phtalocyanines, 2004, V. 8, p. 255-264
2. Roginsky V.A., Zheltukhina G.A., Nebolsin V.E. et al. J. Agric Food Chem., 2007, 55, № 16, 6798-6806



## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЕРРОЦЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛА И ИНДОЛА

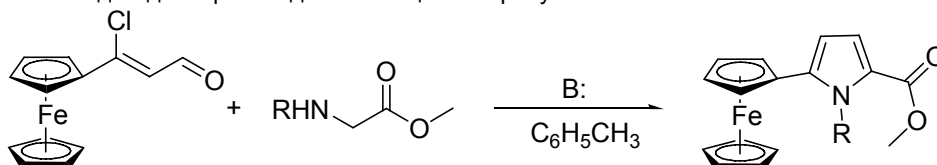
Жеребкер К. Я., Сименел А. А., Родионов А. Н.

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия  
e-mail: kiryonok@yandex.ru

Замещение ароматического заместителя на ферроценовый фрагмент в органических соединениях часто приводит к появлению или изменению биологической активности по сравнению с исходной молекулой. Было обнаружено, что ферроценодержажие гетероциклы проявляют противоопухолевую активность в сочетании с низкой токсичностью.

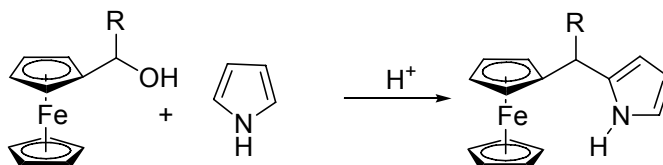
Были синтезированы новые ферроценовые производные пиррола и индола.

Эфиры пирролкарбоновых кислот были получены при взаимодействии 3-ферроценил-3-хлоракрилового альдегида с производными глицина в присутствии основания:



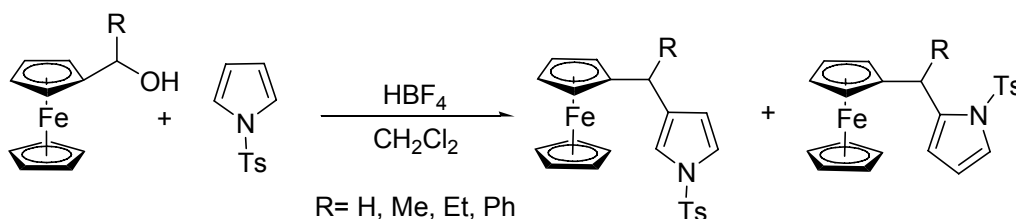
R=H, Me, Ph, CH<sub>2</sub>Ph B:= NaOMe, Et<sub>3</sub>N

Алкилирование пиррола ферроценилкарбинолами в условиях кислотного катализа (HBF<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O или BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) протекает по второму положению. Алкилирование индола в тех же условиях приводит к продукту замещения по третьему положению, однако в некоторых случаях образуются диалкилпроизводные.



R= H, Me, Et, Ph

Были предприняты попытки алкилирования пиррола в 3-е положение при взаимодействии *N*-тозилпиррола и ферроценилкарбинолов. Изомерные 2- и 3-ферроценилалкилтотилпирролы были разделены хроматографически:



R= H, Me, Et, Ph

Строение соединений установлено на основании ЯМР спектров <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, а также <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C гетероядерных корреляций (HSQC, HMBC).

В дальнейшем планируются биологические испытания полученных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума Российской академии наук «Поддержка молодых ученых», «Фундаментальные науки – медицине» и Отделения химии наук о материалах Российской академии наук «Биомолекулярная и медицинская химия» (проект 10 ОХ) и РФФИ № 06-03-32219



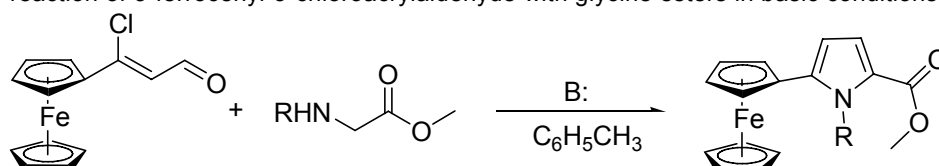
## SYNTHESIS AND PROPERTIES OF FERROCENE DERIVATIVES OF PYRROLE AND INDOLE

Zherebker K. Ya. , Simenel A.A. , Rodionov A.N.

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Academy of Sciences of Russia,  
Moscow, Russian Federation  
e-mail: kiryonok@yandex.ru

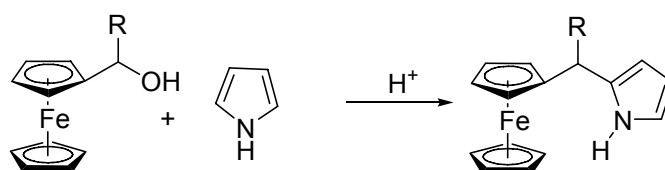
Substitution of an aromatic nucleus of certain organic compounds with a ferrocene unit can lead to products possessing unexpected biological activity which are absent or less manifest in the parent molecule. It was found that some of the ferrocene containing heterocycles displayed high antitumour activity in combination with low toxicity.

New ferrocenyl derivatives of pyrrole and indole were synthesized. Pyrroletooxycarboxylates were obtained by reaction of 3-ferrocenyl-3-chloroacrylaldehyde with glycine esters in basic conditions:



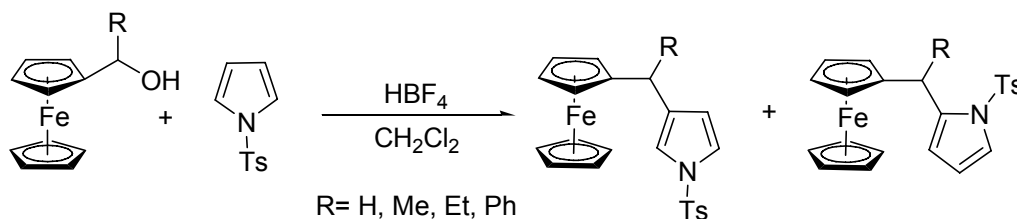
R=H, Me, Ph, CH<sub>2</sub>Ph B:= NaOMe, Et<sub>3</sub>N

Ferrocenylcarbinol alkylation of pyrrole in the presence of the equimolar amount of 45% aqueous HBF<sub>4</sub> or BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O proceeds in the second position. In the same conditions alkylation of indole leads to 3-ferrocenylalkylindole and in some cases gives dialkylsubstituted product.



R= H, Me, Et, Ph

Attempts of alkylation of pyrrole in to the third position by reaction of *N*-tosylpyrrole with ferrocenylcarbinols were made. Isomers of 2- and 3-ferrocenylalkyltosylpyrroles were obtained after purification by column chromatography:



R= H, Me, Et, Ph

The structures of compounds have been assigned on the basis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C heteronuclear correlations.

Further the potential pharmacological activity of these compounds will be tested elsewhere.

This work has been partially supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Programs "Support for Young Scientists" and "Fundamental sciences – for medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Project 10), by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 06-03-32219).



**СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРРОЦЕН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ**

Зыкова С.И. <sup>a,b</sup>, Снегур <sup>a</sup> Л.В., Сименел А.А. <sup>a</sup>, Островская Л.А. <sup>c</sup>

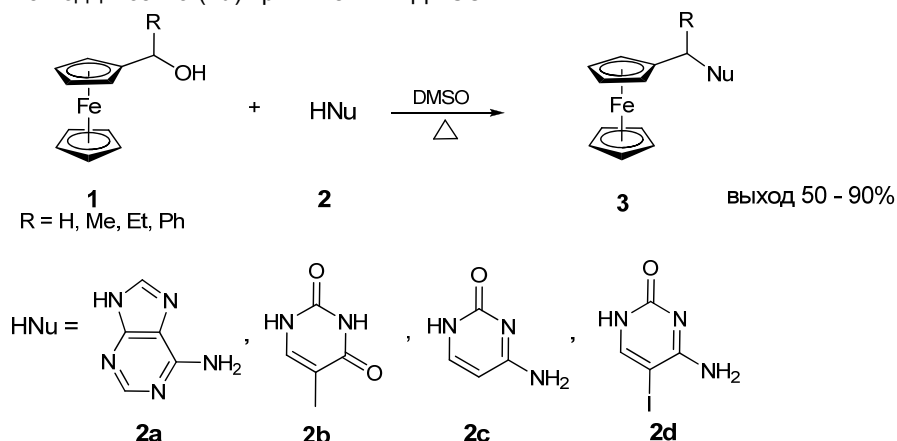
<sup>a</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация

<sup>b</sup> Российский заочный институт текстильной и легкой промышленности,  
Москва, Российская Федерация

<sup>c</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация  
e-mail: svetlana\_@mail.ru

Известно, что синтетические аналоги природных нуклеиновых оснований и нуклеотидов находят применение в химиотерапии рака. Введение ферроценильного фрагмента в различные комплексы вызывает снижение острой токсичности препарата [1]. Целью работы было получение соединений с выраженным противоопухолевым эффектом и низким токсическим действием.

Нами разработан удобный метод введения ферроценильного фрагмента в нуклеиновые основания. Получен ряд ферроценовых производных нуклеиновых оснований (**3a-3d**) с высокими выходами (до 90%) при взаимодействии эквимольных количеств ферроценилкарбинолов (**1**) и аденина (**2a**), тимина (**2b**), цитозина (**2c**) и 5-йодцитозина (**2d**) при кипении в ДМСО.



Полученные соединения **3a-3d** охарактеризованы методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии, а также данными элементного микроанализа. Строение ферроценовых продуктов установлено при помощи двумерных методик ЯМР – спектроскопии на ядрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (NOESY, HSQC, HMBC). Замещение в пиримидиновых основаниях (**2b-2d**) протекает стереоселективно по 1N-положению, а в аденине (**2a**) по 9N-положению, при этом продукты полиалкилирования не образуются.

Изучено действие ферроценил(метил)тимина (**2b**) на солидные опухоли – карциному 755 (Ca755) и карциному лёгких Льюис (LLC). Установлено торможение роста опухолей до уровня 70% по сравнению с контролем. Обнаружено синергетное терапевтическое действие этого соединения на опухоли Ca755 и LLC при совместном применении с противоопухолевым препаратом циклофосфамидом. Этот результат принципиально важен для будущих исследований ферроценовых соединений в качестве потенциальных лекарств для противоопухолевой полихимиотерапии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума Российской академии наук «Поддержка молодых ученых», «Фундаментальные науки – медицине» и Отделения химии наук о материалах Российской академии наук «Медицинская и биомолекулярная химия» (проект ОХ-09).*

**Литература:**

- L.V. Snegur, A.A. Simenel, Yu.S. Nekrasov et all, Synthesis, structure and redox potentials of biologically active ferrocenylalkyl azoles, J. Organomet. Chem., 2004, 689, 2473-2479.
- A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur, S.I. Zykova, V.V. Kachala, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluchterova, M.M. Fomina, Simple Route to Ferrocenylalkyl Nucleobases. Antitumor Activity in vivo, Appl. Organomet. Chem. 2009, in press.



## SYNTHESIS, STRUCTURE AND ANTITUMOR ACTIVITIES OF FERROCENE-MODIFIED NUCLEOBASES

Zykova S.I.<sup>a,b</sup>, Snegur L.V.<sup>a</sup>, Simenel A.A.<sup>a</sup>, Ostrovskaya L.A.<sup>c</sup>

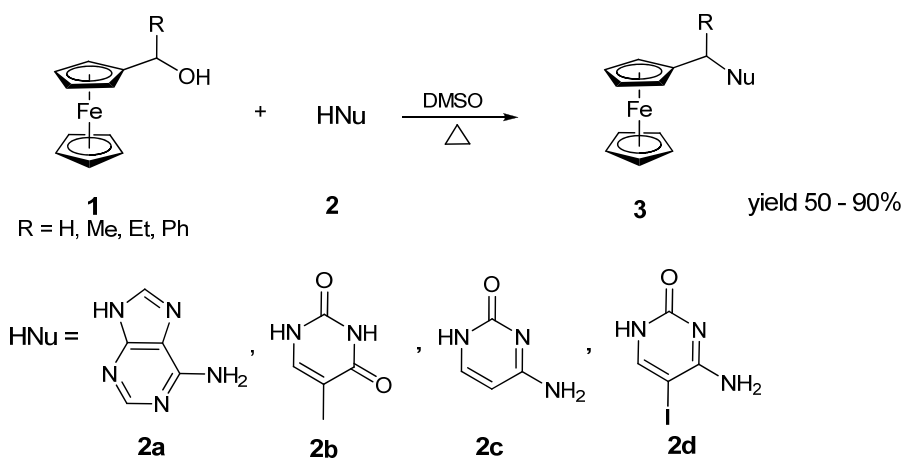
<sup>a</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Russian Correspondence Institute of Textile and Light Industries, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
e-mail: svetlana\_@mail.ru

A synthetic analogue of natural nucleobases and nucleotides are known to be used in chemotherapy cancer. Introduction ferrocene fragment in different complexes is the reduction of acute toxicity preparation. The aim of this work was to obtain compounds with antitumor effect and low toxic effects.

We have developed a convenient method of ferrocenylalkyl units introduction into nucleic bases. A series of ferrocenylalkyl derivatives of nucleic bases were synthesized in high yields by interaction of equimolar amounts of ferrocenylcarbinols, FcCHR(OH), and nucleobases (adenine, thymine, cytosine and 5-iodo-cytosine) in boiling DMSO.



These compounds (**3a-3d**) were described by mass spectrometry and NMR spectroscopy methods, and elemental microanalysis data. Structure of ferrocenylalkyl derivatives were installed using two-dimensional NMR spectroscopy techniques on <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclei (NOESY, HSQC, HMBC). Substitution of pyrimidine bases is a stereoselective by 1N-position and adenine (**2a**) by 9N-position, the products polyalkylation being not occur.

The antitumor activities of 1N-ferrocenylmethyl thymine (**2b**) against some animal tumor systems such as carcinoma 755 (Ca755), melanoma B16 (B16) and Lewis lung carcinoma (LLC) were studied. The strong antitumor effect of this drug equal to the 70% of tumor growth inhibition as compared with control was shown against carcinoma 755. Therapeutic synergism of antitumor activity against Lewis lung carcinoma was demonstrated in the case of combined application of compound (**2b**) with the well-known antitumor drug cyclophosphamide. This result is fundamentally important for ferrocene compounds future research as potential antitumour drugs.

*This work was partially supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Programs "Support for Young Scientists" and "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Project OX-09).*

### References:

1. L.V. Snegur, A.A. Simenel, Yu.S. Nekrasov et al, Synthesis, structure and redox potentials of biologically active ferrocenylalkyl azoles, J. Organomet. Chem., 2004, 689, 2473-2479.
2. A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur, S.I. Zykova, V.V. Kachala, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluchterova, M.M. Fomina, Simple Route to Ferrocenylalkyl Nucleobases. Antitumor Activity in vivo, Appl. Organomet. Chem. 2009, in press.





**ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ АНТИВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ВЫСОКОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КАРКАСНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ НУКЛЕОЗИДФОСФОНАТОВ**

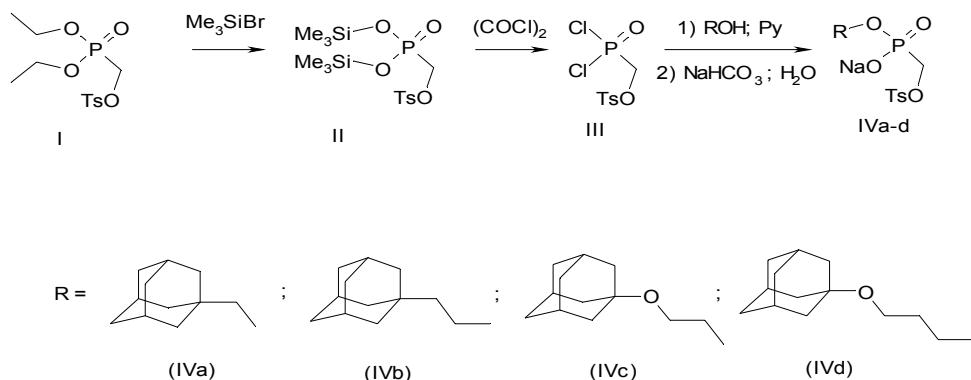
Резников А.Н., Климочкин Ю.Н.

Самарский государственный технический университет, Самара, Россия  
e-mail: orgchem@samgtu.ru

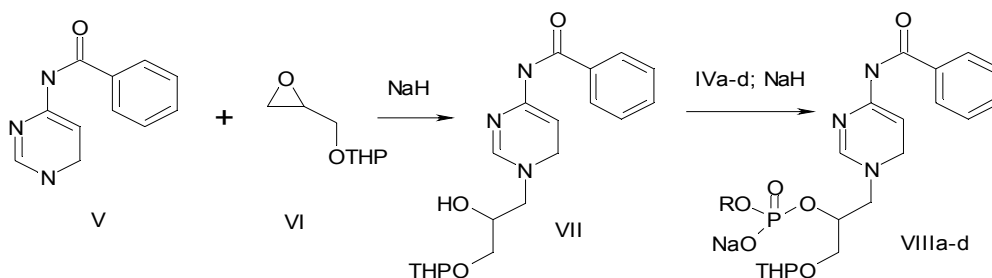
Наиболее перспективными противовирусными препаратами являются аналоги монофосфорилированных нуклеозидов, например адефовир, цидофовир, тенофовир и др.). Однако главным недостатком этих препаратов является низкий уровень биодоступности, что обуславливает применение данных лекарственных средств только путем внутривенного введения. Это связано с наличием в структуре полярного фрагмента фосфоновой кислоты. В то же время, именно этот фрагмент и обеспечивает высокую противовирусную активность соединения. В связи с этим несомненный интерес представляют нуклеозидфосфонаты, модифицированные по фосфонатной группе липофильными структурными блоками. В качестве таковых наиболее перспективными представляются адамантилсодержащие фрагменты. Кроме того, многие функциональные производные адамантана сами обладают выраженной противовирусной активностью, что позволяет надеяться на создание препаратов с «двойным» механизмом действия.

Синтезирован широкий ряд адамантановых модификаторов с широким диапазоном липофильности. Получен ряд О-адамантилалкил- и О-адамантилоксиалкил[(п-толуолсульфонил)оксиметил]фосфонатов – ключевых продуктов при создании новых противовирусных препаратов:

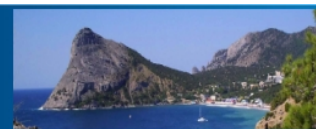
Взаимодействием 2-(оксиран-2-илметокси)тетрагидро-2Н-пирана IV с N<sup>4</sup>-бензоилцитозином V с последующей модификацией VII фосфорорганическими производными IVa-d синтезированы



адамантилсодержащие аналоги цидофовира. Проработаны технологические аспекты синтеза адамантилзамещенных фосфонатов в мультиграммовых количествах.



Работа выполнена в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», (Госконтракт № 02.11.512.2248) и при поддержке РФФИ (грант № 08-03-99038-R\_ОФИ).



## OBTAINING AND PERSPECTIVES OF USING OF FUNGAL PREPARATION

Suprun S.M., \*Kharkevich E.S., Donchenko G.V., Parhomenko Yu.M., \*Kurchenko I.N., Kuchmerovskaya T.M.

A.V. Palladin Institute of Biochemistry NASU, Kyiv, Ukraine

e-mail: kuch@biochem.kiev.ua

D.K.Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, Kyiv, Ukraine

Fungi are the valuable source of biologically active natural substances, such as essential amino acids, unsaturated fat acids, vitamins, vitamin like substances, as ubiquinone Q<sub>10</sub> and other which possesses antioxidant and antimutagenic properties. It is known that the amino acid composition of the fungus proteins doesn't yield to an animal one that is the base for its using for food and chow additives.

The composition of cell wall influences the fungi biomass biological value, due to glycosaminoglycans such as chitin, which play role as natural sorbents. Micromycetes can be perspective for using in different fields, such as environmental protection, agriculture and medicine (1-3). New biotechnologies of obtaining of lipids, food fibres based on chitin-glycan complex and pharmacological preparations were developed using of micromycetes.

The purpose of this investigation was development of biotechnology obtaining of food and fodder additives based on fungal selected strains-which are producers of vitamins, coenzymes and protein.

We have selected the strains-producers: *Mycelia sterilia* IMB F-100014 – the protein and thiamine producer; *Fusarium sambucinum* VCPM F-139 - coenzyme A; *Fusarium sambucinum* IMB F-10011 – nicotinic acid and its derivatives and others biologically active substances; *Penicillium sclerotiorum* F-10015 – β-carotene. Based on studying of biosynthesis peculiarities of vitamins of chosen strains, their growth speed, an antagonism absence, the cultures for joint cultivation were selected. For obtaining of a protein-vitamin preparation the following cultures were selected namely *Fusarium sambucinum* IMB F-10011 – the producer of vitamins complex, protein, essential amino acids such as lysine and tryptophane and *Penicillium sclerotiorum* F-10015 – the producer of β-carotene. It has been fulfilled conditions of their joint cultivation on a standing installation of the Scientific-Technical Center of Industrial Biotechnology OAS "Stirolbiotech". Joint cultivation of strains has allowed increasing by 2-3 times the content of investigated vitamins and protein as compared to monoculture and at the same time the terms of fermentation were reduced to 44-46 hours. Different forms of fungal preparations namely granulated, powdered, and liquid were obtained due to the developed technology. The liquid form of preparation can be obtained by using special thermal processing while granulated – by using the filler. The obtained vitamin-coenzymes preparation represents the complex of natural biologically active substances (vitamins, coenzymes, essential amino acids, microelements, unsaturated fat acids). It contains considerable quantity of nicotinic acid and its derivatives, in particular NAD<sup>+</sup> (6, 0 mg/g dry weight) thiamine, vitamins E and B<sub>12</sub>, folic acid and β-carotene (12 mg/l). The preparation has been tested on silkworm, carp spawn, quails and laboratory mice. In case of carp spawn treatment by the biopreparation the output of larvae was 100%, while in control it didn't exceed 74%. Using of the preparation the disease of the nuclear polyedrosis was reduced to 9-12%. The finding on quails was marked the increase of young quails mass beginning from the 21 day and on the 28 day the living weight was 124.5 g while in control – 116.6 g. Moreover, the favorable influence of investigated vitamins protein preparation on an organism testify the reduction of ammonia content by 3 times in brain mice, which were received the preparation in dose 1.8 g per mouse and improve the parameters of serum cholinesterase activity.

These investigations allow us to obtain vitamin protein preparation and its using can raise survival rate of animals, their physiological and industrial parameters. Moreover this preparation protects them against diseases, such as silkworm polyedrosis and microsporidiosis and a carp spawn against saprolegniosis. Thus obtained biopreparation based on micromycetes can be used for preventive and medical purposes as biologically active additives.

### References:

1. Wainwright M. Novel use for fungi in biotechnology // Chem. Ind.-1990. № 2. P. 131–134.
2. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Santa Cruz, C.A. 1995. 251 p.
3. Feofilova E. P., Nemtcev D. V., Tereshina V. M., Kozlov V. P. Polyaminosacharides of micromycetes: new biotechnologies and perspectives of practical using // Applied biochemistry and microbiology.-1996. v.32, № 5. - P. 483–492.



**Биологически активные вещества:**

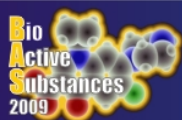
фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения

25 - 30 мая 2009, Новый Свет, АР Крым, Украина



## **Фундаментальные и прикладные аспекты применения биологически активных веществ**

## **Fundamental and Applied Problems of Application of Bioactive Substances**



# Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine





**ВЛИЯНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ФИТОКОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПОРАЖЕНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ**

Афонин В.Ю.<sup>1</sup>, Мадзиевская Т.А.<sup>2</sup>, Огурцова С.Э.<sup>1</sup>, Шафрановская Е.В.<sup>1</sup>, Шилов В.В.<sup>1</sup>, Малей Л.П.<sup>1</sup>, Ковалева М.В.<sup>1</sup>, Тагиль И.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь  
e-mail: viktor\_afonin@tut.by

<sup>2</sup>УП «Унитехпром БГУ», Минск, Беларусь

В работе проводили биологическую оценку двух фитокомпозиций «Дабрадзья-12» и «Аврора-7», разработанных УП «Унитехпром БГУ» для хлебобулочных изделий (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика фитокомпозиций

	Дабрадзья-12	Аврора-7
Состав	Овес, корень солодки, имбирь	Ламинария, яблочный порошок, шрот из расторопши, листья мяты перечной, имбирь, селенметионин
Энерг. ценность	230 ккал	154 ккал
В 100 г продукта	8,9 г белка; 5,4 г жиров; 35,7 углеводов	2,5 г белка; 0,3 г жиров; 36,7 углеводов

Фитокомпозиция «Аврора – 7», в состав которой входит ламинария, расторопша, имбирь, селенметионин, обладает сложным природным антиоксидантным комплексом, включающим флавоноиды, витамины (А, Е, С), минеральные вещества (цинк, медь, марганец), что обеспечивает эффективность ее применения. Антиоксидантный эффект «Дабрадзья -12» обусловлен наличием в ее составе флавоноидов, витаминов, минеральных веществ.

Фитокомпозиции вводили самцам мышей (п линия ВaLb) в течение 17 дней зондом из расчета «Дабрадзья-12» 45 мг/кг и «Аврора-7» 15 мг/кг. Контрольным животным вводили растворитель – дистиллированную воду. На 18 сутки половине животных вводили однократно азотнокислый свинец в концентрации 100 мг/кг. Через 48 ч. после введения соли свинца мышам забивали и забирали пробы крови для биохимического анализа. Проводили также забор селезенки, из которой вымывали клетки и готовили для проточной цитометрии. К части суспензии клеток добавляли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1мМ) и инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение 30 мин., после чего также готовили для проточной цитометрии. Всего было проанализировано 34 особи.

В результате исследования установлено, что «Аврора-7» в выбранной дозе приводит к достоверному увеличению массы тела экспериментальных животных (P<0,05). Введение свинца животным привело к падению массы селезенки, как у контрольных животных, так и у групп, получавших фитокомпозиции, однако, в данной точке фиксации животных достоверных различий отмечено не было. Анализ клеточного цикла клеток селезенки показал, что кормление животных двумя выбранными композициями стимулировало клетки к делению, что может указывать на иммуномодулирующий эффект. Введение контрольной группы соли свинца, обладающего цито- и генотоксичностью, привело к аресту клеток на стадии G<sub>2</sub>/M. Арест клеток на стадии деления обычно вызывается аберрациями хромосом, формирующимися при дву- и одностранных разрывах ДНК. Добавление перекиси водорода инициирует в клетках одностранные разрывы ДНК, как результат свободно радикальных механизмов. При добавлении 0,1мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к суспензии клеток уровень апоптоза увеличивается в несколько раз (P<0,01) в группах, получавших фитокомпозиции и свинец, по сравнению с группой, которой вводили свинец, и группами, получавших фитокомпозиции. Это позволяет предположить, что арест клеток на стадии G<sub>2</sub>/M у групп, получавших свинец, вызван в основном двунитевыми разрывами, характеризующими большую степень повреждения ДНК. Известно, что многие компоненты растительных пищевых добавок обладают антиоксидантными свойствами, обусловленными ремоделированием хроматина хромосом, приводящие к защите ДНК от двунитевых разрывов.

Механизм ремоделирования хроматина часто является и одной из причин защиты клеток сердца от гибели. Так биохимический анализ крови показал меньший уровень МБ-фракции креатинкиназы у животных, получавших фитокомпозиции, по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что прием фитокомпозиций приводит к значительному снижению лактатдегидрогеназы, что указывает на защитную функцию для различных органов, таких как сердце, печень, легкие.



**THE ACTION OF SPECIALIZED BACERY PRODUCT PHYTOCOMPOSITIONS ON FREE RADICAL DAMAGES, INDUCED BY HEAVY METALS**

Afonin V.Yu.<sup>1</sup>, Madzievskaya T.A.<sup>2</sup>, Ogurtsova S.A.<sup>1</sup>, Shafranovskaya E.V.<sup>1</sup>, Shylau V.V.<sup>1</sup>, Malei L.P.<sup>1</sup>, Kovaliova M.V.<sup>1</sup>, Tagil I.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Institute of Pharmacology and Biochemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus  
viktor\_afonin@tut.by

<sup>2</sup>Unitekhprom scientific production rue of Belarusian State University, Minsk, Belarus

In work carried out a biological estimation of two phytocomposition "Dabradzeya-12" and "Aurora -7", developed «Unitekhprom scientific production rue of Belarusian State University» for bakery products (table).

Table Characteristics of phytocompositions

	Dabradzeya-12	Aurora -7
Compound	Oats, root of licorise, ginger	Laminaria, powder of the apples, holy thistle, leaves of peppermint, ginger, selenmetionin
Energy value	230 kkal	154 kkal
At 100 g of product	8,9- protein, 5,4- fat, 35,7 - carbohydrates	2,5- protein, 0,3- fat, 36,5 - carbohydrates

The phytocomposition "Aurora -7", which consists of (see table) possesses complex natural antioxidant complex, including flavonoids, vitamins (A, E, C), mineral substances (zinc, cooper, manganese), that are provided with the efficiency of its application. Antioxidant effect of "Dabradzeya-12" is caused by presence of flavonoids, vitamins, mineral substances in its composition.

Phytocompositions administered *per os* to mice (line BALB) during 17 days on the basis of "Dabradzeya-12" – 45 mg/kg and "Aurora -7" – 15 mg/kg. Control group received the boiled water. At 18-th day to the half of animals administer unitary nitrate lead into concentration of 100 mg / kg. In 48 hours after introduction of nitric lead mice were killed and samples of blood were tested at biochemical analysis. Also carried out a fence of spleen from which washed away cells and prepared for flow cytometry. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) was supplemented to one part of spleen tissue and it was incubated at 37°C within 30 min then also prepared for flow cytometry. There were analyzed 34 male mice.

As the result it was established that "Aurora -7" in the chosen doze leads to significant increase in weight of a body of experimental animals (P <0,05). Introduction of lead by an animal has led to descent of weight of a spleen, both at control animals, and at the groups receiving the photocompositions, however, in the given point of fixing of animal were no any significant differences. The analysis of a cell cycle of spleen cells has shown that feeding of animals by two chosen compositions stimulated cells division that can specify on immunomodulatory effect. Nitric lead administered to control group possessing cyto- and genotoxicity, has led to cell arrest at stage G<sub>2</sub>/M. Usually the cell arrest at the division stage is usually caused to the chromosome aberrations, formed at the single- and double-strand breaks. Addition of peroxide of hydrogen initiates in cells single-strand breaks of DNA, as result of free-radical mechanisms. At addition 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the cell suspension the level of apoptosis increases in some times (P <0,01) in the groups receiving phytocompositions and lead as compared with group which entered lead, and the groups, receiving phytocompositions. It allows to assume, that arrest of cells at stage G<sub>2</sub>/M at the groups receiving lead, is caused basically strand-breaks describing big damage rate of DNA damage. It is known, that much of vegetable food components possess antioxidant properties, provided by the remodeling of chromosomal chromatin, that leads to protect DNA from cut. The mechanism of remodeling of chromatin frequently is also one of the reasons of protection of cells of heart from destruction. So the biochemical analysis of blood has shown a less level of MB-fraction creatine kinase at the animals receiving phytocompositions, in comparison with the control. It is essential to note, that consumption of phytocompositions leads to significant decrease of lactate dehydrogenase, that specifies protective function for various bodies, such as heart, a liver, lung.



## ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ - МЕЛАФЕНА, ИХФАН-10 И ФЕНОЗАНА НА $Ca^{2+}$ -СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

*Алексеева О.М.<sup>1</sup>, Фаттахов С.Г.<sup>2</sup>, Коновалов А.И.<sup>2</sup>, Голощапов А.Н.<sup>1</sup>,  
Бурлакова Е.Б.<sup>1</sup>, Ким Ю.А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Институт Биохимической физики РАН им. Н.М.Эмануэля ул. Москва, Россия. e-mail: olgavek@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Российской академии наук, Казанского Научного центра, Казань, Россия

<sup>3</sup> Институт Биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Мелафен (производное меламин и фосфиновой кислоты) – стимулятор роста растений, повышающий стрессоустойчивость. Фенозан ( $\beta$ -4-окси-(3,5- дитретбутил-4-оксифенил) калий пропионат) – экранированный фенол - антиоксидант, Ихфан-10 – гибридный антиоксидант, производное Фенозана с добавлением жирнокислотного и холинового фрагментов для лучшего внедрения в мембрану и антихолинэстеразной активности. Оба вещества предлагаются как нейропротекторы. Влияние на структурные характеристики тестировали на искусственных липосомах, влияние на функции - на клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) с помощью методов дифференциальной микрокалориметрии и первичного светорассеяния под прямым углом. Было обнаружено, что структурная организация микродоменов липидов в мембранах искусственных мультиламеллярных липосом из димристоилфосфатидилхолина (DMPC) стабилизируется в присутствии Мелафена в концентрационном диапазоне от  $10^{-17}$  М до  $10^{-3}$  М. Большие концентрации  $10^{-2}$  М перестраивают микродомены липидов. В растениеводстве Мелафен применяется в концентрациях не выше  $10^{-13}$  М. Исследованный нами концентрационный диапазон оставляет еще значительный неструктурный интервал. Однако, в случае влияния на функционирование клетки интервал сужается.  $Ca^{2+}$ -сигнальная система клеток животных – АКЭ подвергается угнетению даже при концентрациях  $10^{-11}$  М. Мелафен влияет сразу на две мишени на поверхности клеток – на метаболитные пуринорецепторы  $PY_2$  и на  $Ca^{2+}$ -проводящие каналы емкостного входа (CRAC), значительно снижая их активность. Только при концентрациях  $10^{-13}$  М и ниже  $Ca^{2+}$ -сигнальная система клеток не угнетается.

Фенозан и Ихфан-10 перестраивают липидные домены в меньших концентрациях. При  $10^{-13}$  М начинаются значительные изменения, при  $10^{-4}$  М термоиндуцированный переход исчезает, т.е. происходит деструкция микродоменов липидов.  $Ca^{2+}$ -сигнальная система клеток животных – АКЭ подвергается угнетению даже при концентрациях  $10^{-11}$  М Ихфан-10 и фенозана. Сделан вывод о ограничениях концентрационного интервала применения биологически активных веществ, для гидрофобных веществ он значительно меньше.



**THE INFLUENCE OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES: MELAFEN, ICHFAN-10, PHENOZAN, TO THE  $Ca^{2+}$ -SIGNALING SYSTEMS OF THE ANIMAL CELLS**

*Alekseeva O. M. \*, Fattachov S. G. #, Konovalov A. I. #, Goloshchapov A. N. \*, Burlakova E. B. \*, Kim Y. A.*

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;  
e-mail: [olgavek@yandex.ru](mailto:olgavek@yandex.ru),

#Arbuzov Institute of Organic and Physics Chemical, Russian Academy of Sciences,  
Kazan Scientific Centr, Kazan, Russia  
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

We tested the new amphiphilic hybrid antioxidants (HA) – ichfans and melafen (hydrophilic derivation of melamine and phosphinic acid) - the antistress plant growth regulator. HA are the derivatives of phenozan [1- $\beta$ -4-oxy- (3,5-ditertbutyl-phenyl) potassium propionate] with a saturated fatty acid tail and choline's residuum. HA are the perspective substances for the neuroprotection. All substances were tested with different animal cells membranes. Its actions to the structural properties of membranes were investigated with the artificial liposomes. Its effects to the functions were detected at the Erchlich ascitic carcinoma cells (EAC). We used the differential microcalorimetry and primary light scattering under the right angle methods. It was found that structural organization of the lipid microdomains in the membranes of artificial multilamellar dimyristoilphosphatidylcholine (DMPC) liposomes were stabilized under the Melafen treatment by the  $10^{-17}$  M -  $10^{-6}$  M concentration diapason. Only large concentrations  $10^{-2}$  M of Melafen influenced the lipid microdomains organizations at large degree. The similar picture was obtained for the protein microdomains. Thus we can show that the Melafen hasn't the significant membrane destructive effect, due to the adequate models of the cellular membranes, with the lipid microdomains and cytoskeleton proteins, which are typical for the many different cells. At the crop production it usually used below  $10^{-13}$  M. The tested diapason of concentrations reserved the big nondestructive interval. But this interval dramatically restricted at the case of the Melafen action to the function. The  $Ca^{2+}$ -signaling system of animal cells (EAC) was depressed by the Melafen concentration  $10^{-11}$  M. Melafen just acted to the two targets at the cell surface – metabotropic pyrinoreceptors and to the  $Ca^{2+}$  -releasing channel, which regulated by intracellular calcium pools depletion. Melafen decreased its activity. Only below  $10^{-13}$  M  $Ca^{2+}$ -signaling system didn't dump.

HA action on the biological objects was investigated with DMPC and EAC too. The membrane structure was tested by the temperature transitions of domains (by the method of differential adiabatic microcalorimetry). The dose-effect was the curve of first order. But the dose  $10^{-4}$  M had the drastically destruction effect to the lipid microdomain organization: the thermo induction peak was absent. The functional effects to EAC were more wonderful: at the super low dose  $10^{-21}$  –  $10^{-17}$  M HA had the same influence as the  $10^{-6}$  –  $10^{-10}$  M to the second cell answer to the P2Y receptors activation/ At the middle diapason we obtained curve of first order. Conclusion: the HA effects were more great, than the Melafen effect, and the concentration regions must be corrected.





## БАВ – БИОКОРРЕКТОРЫ ОНТОГЕНЕЗА И УРОЖАЙНОСТИ НЕКОТОРЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР.

*Андрянова Ю.М., Голубева Е.А., Егорова А.Ю.\*, Федотова О.В.\*, Гусакова Н.Н.*

ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И.Вавилова», Саратов, Россия  
\*ГОУ ВПО «Саратовский ГУ им. Н.Г.Чернышевского», Саратов, Россия

В мировом земледелии зерновые культуры занимают ведущее место и имеют важнейшее значение для населения земного шара, что связано с их большой ценностью и разнообразным применением. Увеличивая производство зерна, можно успешно решить зерновую проблему, обеспечить население разнообразными продуктами питания, повысить продуктивность животноводства, создать необходимый государственный резерв зерна и обеспечить продовольственную безопасность страны. В течение длительного времени валовый сбор зерна в РФ повышался в основном за счет расширения посевных площадей. Внедрение достижений сельскохозяйственной науки, новых высокопродуктивных сортов зерновых культур, использование высокопроизводительной техники, минеральных удобрений, химических средств защиты растений дали возможность несколько увеличить валовой сбор и урожайность. На современном этапе в повышении урожайности и валовых сборов зерна важная роль принадлежит внедрению эффективных методов повышения продуктивности выращиваемых культур за счет применения биологически активных веществ.

Перспективным направлением более полной реализации потенциала зерновых культур может стать предпосевная обработка семян синтетическими биологически активными веществами.

Целью работы являлось скрининговое изучение росторегулирующей активности новых биологически активных веществ на посевах зерновых культур некоторых районов Саратовской области на примерах модельных сельскохозяйственных предприятий.

Эксперименты проведены в полевые периоды 2006–2008г.г. на территории 2-х сельхозпредприятий, а именно в ООО «Перспективное» Татищевского района на культуре овса сорта «Скакун» и яровой пшеницы сорта «Белянка», СПК «Преображенское-2001» Пугачевского района на культуре ячменя сорта «Донецкий 8». Опыты закладывали в трехкратной повторности, размещение вариантов – рендомизированное. Учетная площадь делянок по 50 м<sup>2</sup>. Для исследования взята группа новых БАВ в виде растворов с концентрацией 10<sup>-4</sup> %. Контролем в опытах служила дистиллированная вода, стандартом – промышленный иммуномодулятор и стимулятор роста растений – иммуноцитофит. Семена опрыскивали перед посевом водной суспензией БАВ, закрывали брезентом и оставляли в таком состоянии на 24 часа.

Всего было исследовано 12 БАВ под условными названиями ФМСФ (9-(4-метоксифенил)-3,6,8-трифенил-2-окса-7-азаспиро[4.4]нон-3-ен-1-он), ТПСФ (9-(2-пиридинил)-3-толил-6,8-дифенил-2-окса-7-азаспиро[4.4]нон-3-ен-1-он), ФДАФ (3-{1-(4-нитрофенил)-2-[(4-нитро-фенил) диазо] этилиден}-5-фенил-3Н-фуран-2-он), ФТП (1-(2-(1Н-индол-3-ил)-5-фенил-3Н-пиррол-2-он), ФААЦГ (циклогексенил-(2,3-б)-5-фенил-1,4-дiazобикакло[3.3.0]-октан-8-он), ФКА (бензо-(2,3-б)-5-фенил-1-аза-4-оксабикакло-[3.3.0]-октан-8-он), ФАА (бензо-(2,3-б)-5-фенил-1,4-дiazобикакло-[3.3.0]-октан-8-он), ТМП (4-(4-метоксибензилиден)-4,5-дигидро-6-толил-пиридазин-3-он), ТФП (4-фенил-4,5-дигидро-6-толил-пиридазин-3-он), ТВП (4-(4-гидрокси-3-метоксибензилиден)-4,5-дигидро-6-толил-пиридазин-3-он), цис-ОПП (гидротартрат цис-3-(5-метил-2-пирролидинил)пропанола-10), СХ (2-(п-хлорфенил)-4-фенил-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромен), ПСХП (перхлорат 2-фенил-4-(2,4-диметоксифенил)-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромилия).

Анализ полученных данных исследования по полевой всхожести показал, что обработка семян растворами БАВ способствовала повышению всхожести яровой пшеницы на 10,0 – 16,7 % по сравнению с контролем, овса на 10,0 – 21,1 %, ячменя на 12,0 – 21,0 %.

Число зерен в колосе (метелке) во всех вариантах опытов колебалось от 36,5 шт. до 43,5 шт. на пшенице, от 55,0 шт. до 112,5 шт. на овсе, от 18,0 – 27,2 шт. на ячмене. В варианте с иммуноцитофитом – 41,5 шт., 76,0 шт., 27,19 шт. соответственно. При использовании БАВ значение данного показателя на пшенице изменялось от 29,0 шт. (ФМСФ) до 43,5 шт. (ТВП), на овсе от 65,0 шт. (ФАА) до 112,5 шт. (ТВП), на ячмене от 23,0 шт. (СХ) до 27,0 шт. (ПСХП).

Важным элементом структуры урожайности является масса зерна с колоса (метелки) и масса 1000 зерен. Эксперимент показал, что масса зерна с колоса в контроле на яровой пшенице составила 1,25 г, масса 1000 зерен – 28,0 г., на овсе масса зерна с метелки – 2,0 г., масса 1000 зерен – 33,7 г, на ячмене 0,98 и 53,5 г. соответственно. Таким образом, применение различных БАВ для предпосевной обработки семян позволило получить с колоса на пшенице до 1,9 г зерна (ТВП) и массу 1000 зерен до 38,0 г. (ТВП), с метелки на овсе до 3,5 г. зерна (ТВП) и массу 1000 зерен до 42,4г. (ТВП) и с колоса на ячмене до 1,62 г. (ПСХП) и до 59,9 г. (ПСХП), соответственно.

Главным критерием росторегулирующей активности новых БАВ на посевах изучаемых культур является урожайность. На яровой пшенице в контрольном варианте она составила 10,3 ц/га, на овсе – 19,1 ц/га, на ячмене – 11 ц/га. При применении стандарта – 11,5 ц/га, 29,9 ц/га и ячмене – 15,0 ц/га, соответственно. Использование новых БАВ позволило получить прибавку урожайности на пшенице в размере 1,0 ц/га (ФМСФ) – 10,4 ц/га (ТВП), на овсе в размере от 4,6 ц/га (ФАА) до 23,7 ц/га (ТВП), на ячмене в размере от 13,0 ц/га (СХ) до 18,0 ц/га (ПХСХ).

На основании анализа результатов проведенных исследований: разработано новое направление повышения урожайности яровой пшеницы, овса и ячменя, основанное на применении БАВ в качестве биокорректоров онтогенеза и урожайности зерновых культур в Среднем Поволжье.



## BAV - BIOPROOF-READERS ONTOGENESIS AND PRODUCTIVITY OF SOME GRAIN CROPS

*Andrijanova U.M., Golubeva E.A., Egorova A.U. \*, Fedotova O.V. \*, Gusakova N.N.*

FGOU VPO «Saratov GAU of N.I.Vavilova», Saratov, Russia

\*GOU VPO «Saratov GU of N.G.Chernyshevskogo», Saratov, Russia

In world agriculture grain crops take a leading place and have the major value for the globe population that is connected with their big value and various application. Increasing grain manufacture, it is possible to solve successfully a grain problem, to provide the population with a various foodstuff, to raise efficiency of animal industries, to create a necessary state reserve of grain and to provide food safety of the country. For a long time валовой grain gathering in the Russian Federation raised basically at the expense of expansion of areas under crops. Introduction of achievements of the agricultural science, new highly productive grades of grain crops, use of high-efficiency technics, mineral fertilizers, chemical protection frames of plants have given the chance to increase total gathering and productivity some. At the present stage in increase of productivity and total gathering of grain the important role belongs to introduction of effective methods of increase of efficiency of grown up cultures at the expense of application of biologically active substances. Presiding processing of seeds by synthetic biologically active substances can become a perspective direction of fuller realization of potential of grain crops.

The job purpose was скрининговое studying growth-regulating activity of new biologically active substances on crops of grain crops of some areas of the Saratov area on examples of the modelling agricultural enterprises.

Experiments are spent during the field periods 2006-2008r.r. In territory of 2 agricultural productions, namely in Open Company "Perspective" of Tatishchevsky area on culture of oats of a grade "Racer" and grade spring wheat «Belyanka», SPK « Preobrazhenskiy-2001» Pugachevsky area on culture of barley of a grade «Donetsk 8». Experiences pawned in triple frequency, placing of variants - casual. The registration area of allotments on 50 m<sup>2</sup>. For research the group new BAV in the form of solutions with concentration of 10<sup>-4</sup> % is taken. The control the distilled water served in experiences, as the standard - industrial immunomodulator and a growth factor of plants - immunocitofit. Seeds sprayed before crops by water suspension BAV, closed a canvas and left in such status at 24 o'clock. In total it has been investigated 12 BAV under conditional names FMSF (9 (4-metoksifenil)-3,6,8-trifenil-2-oxsa-7-azaspiro [4.4] non-3-en-1), TPSF (9 (2-piridinil)-3-tolil-6,8-difenil-2-oxsa-7-azaspiro [4.4] non-3-en-1), FDAF (3 {1 (4-nitrophenil)-2 [(4-nitro-phenil) diazo] etiliden}-5-fenil-3H-furan-2-on), FTP (1 (2 (1N-indol-3-silt)-5-fenil-3H-pirrol-2-on), FAACG (tsiklogeksenil - (2,3-b)-5-phenyl-1,4-diazobitsiklo [3.3.0]-oktan-8), FKA (benzo - (2,3-b)-5-fenil-1-aza-4-oksabitsiklo-[3.3.0]-oktan-8), FAA (benzo - (2,3-b)-5-phenyl-1,4-diazobitsiklo - [3.3.0]-oktan-8), TMP (4 (4-metoksibenziliden)-4,5-digidro-6-tolil-piridazin-3-on), TFP (4-fenil-4,5-digidro-6-tolil-piridazin-3-on), TVP (4 (4-gidroksi-3-metoksibenziliden)-4,5-digidro-6-tolil-piridazin-3-on), tsis-OPP (gidrotartrat tsis-3 (5-metil-2-pirrolidinil) propanola-10, SX (2 (n-hlorfenil)-4-fenil-7,8-benzo-5,6-digidroselenohromen), PSXP (perxlorat 2-2-4 (2,4-dimetoksifenil)-7,8-benzo-5,6-digidroselenohromiliya).

The analysis of the received data of research on field germinative power has shown, that processing of seeds by solutions BAV promoted increase germinative power spring wheat on 10,0 - 16,7 % in comparison with the control, oats on 10,0 - 21,1 %, barley on 12,0 - 21,0 %. The number of grains in an ear (whisk) in all variants of experiences fluctuated from 36,5 pieces to 43,5 pieces on wheat, from 55,0 pieces to 112,5 pieces on oats, from 18,0 - 27,2 pieces on barley. In a variant with immunocitofit - 41,5 pieces, 76,0 pieces, 27,19 pieces accordingly. At use BAV value of the given indicator on wheat changed from 29,0 pieces (FMSF) to 43,5 pieces (TVP), on oats from 65,0 pieces (FAA) to 112,5 pieces (TVP), on barley from 23,0 pieces (SX) to 27,0 pieces (PSXP). The important element of structure of productivity is the weight of grain from an ear (whisk) and weight of 1000 grains. Experiment has shown, that the weight of grain from an ear in the control on spring wheat has made 1,25 r, weight of 1000 grains - 28,0, on oats weight of grain from a whisk - 2,0, weight of 1000 grains-33,7 r, on barley of 0,98 and 53,5 according to. Thus, application various BAV for preseeding processing of seeds has allowed to receive from an ear on wheat to 1,9 r grains (TVP) and weight of 1000 grains till 38,0 (TVP), from a whisk on oats till 3,5 of grain (TVP) and weight of 1000 grains to 42,4r. (TVP) and from an ear on barley till 1,62 (PSXP) and till 59,9 (PSXP), accordingly.

The main criterion growth-regulating activity new BAB on crops of studied cultures is productivity. On spring wheat in control a variant it has made 10,3 ts/hectares, on oats - 19,1 ts/hectares, on barley - 11 ts/hectares. At standard application - 11,5 ts/hectares, 29,9 ts/hectares and barley - 15,0 ts/hectares, accordingly. Use new BAV has allowed to receive a productivity increase on wheat at a rate of 1,0 ts/hectares (FMSF) - 10,4 ts/hectares (TVP), on oats at the rate from 4,6 ts/hectares (FAA) to 23,7 ts/hectares (TVP), on barley at the rate from 13,0 ts/hectares (SX) to 18,0 ts/hectares (PSXP).

On the basis of the analysis of results of the spent researches: the new direction of increase of productivity of spring wheat, an oats and the barley, based on application BAV as bioproof-readers ontogenesis and productivity of grain crops on the average the Volga region is developed.



**СИНТЕЗ И ПРОТИВОСУДОРОЖНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИ-1,2-ДИГИДРО-3Н-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНА**

<sup>1,2</sup>Андронаті С.А., <sup>1</sup>Павловский В.И., <sup>1</sup>Семенішина Е.А., <sup>3</sup>Дариенко А.М., <sup>2</sup>Кравченко И.А., <sup>2</sup>Коберник А.А.

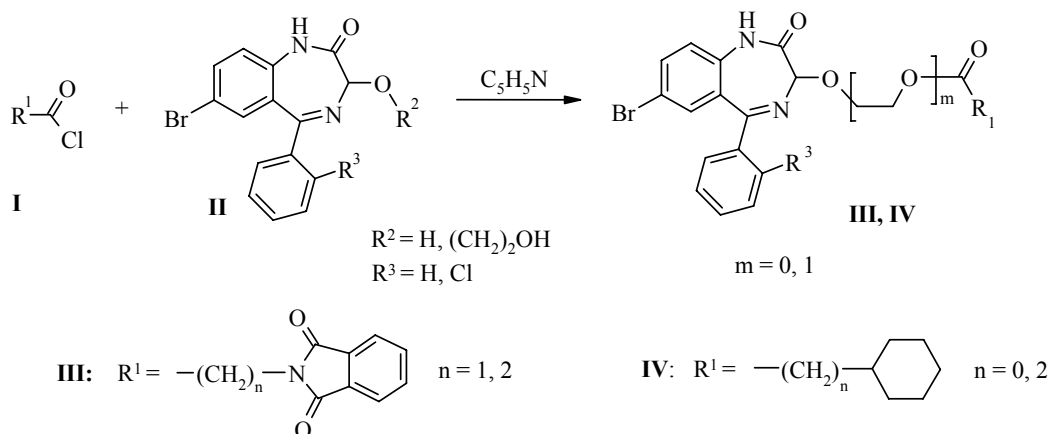
<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут ім. А.В. Богатського НАН України, Одеса, Україна  
e-mail: medchem\_department@ukr.net

<sup>2</sup>Одесский национальный университет ім. И.И. Мечникова, Одеса, Україна

<sup>3</sup>Одесский национальный политехнический университет, Одеса, Україна

Состояние тревоги, нарушение сна и памяти занимают значительное место в клинической практике заболеваний нервной системы. Поиск новых селективных, высокоактивных нейротропных соединений в ряду 1,4-бенздиазепин-2-онов и изучение влияния различных заместителей на фармакологические свойства остается актуальной задачей.

Нами синтезирован ряд новых производных 3-гидрокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов **III**, **IV**. Сложные эфиры получены взаимодействием хлорангидридов соответствующих кислот с 3-гидрокси или 3-(2-гидроксиэтокси)-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онами **II** в присутствии пиридина.



Противосудорожную активность синтезированных соединений оценивали по увеличению минимальных эффективных доз коразола при его внутривенном введении, которое вызывает у экспериментальных животных развитие клонико-тонических судорог и тонической экстензии. Исследование проводили в двух временных интервалах, – через 3 часа и 24 часа после перорального введения тестируемого соединения в сравнении с исходным 3-гидрокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-оном.

В ряду 2-(1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)алкилкарбонилпроизводных **III** наибольшим противосудорожным действием обладает 2-(1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)метилкарбонилксипроизводное (**III**  $n=1$ ,  $R=\text{Cl}$ ,  $m=0$ ). Отмечено, что противосудорожная активность остается практически на одном уровне через 3 и 24 часа после введения, превышая уровень соединения сравнения (**II**  $R^2=\text{H}$ ,  $R^3=\text{Cl}$ ) на 31% и 29 %, соответственно. Остальные производные этого ряда проявляют активность ниже либо на уровне соединения сравнения.

В ряду циклогексильных производных неожиданно было установлено, что 7-бром-5-фенил-3[2-(циклогексилкарбонилэтокси)]-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (**IV**  $n=0$ ,  $R^3=\text{H}$ ,  $m=1$ ) обладает наибольшей активностью в ряду исследуемых соединений через 3 часа после введения, превосходя соответствующее производное 5-(2'-хлор)фенил-1,4-бенздиазепин-2-она (**IV**  $n=0$ ,  $R^3=\text{Cl}$ ,  $m=1$ ).



**SYNTHESIS AND ANTICONVULSIVE ACTIVITY OF NOVEL DERIVATIVES 3-HYDROXY-1,2-DIHYDRO-3H-1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONES**

<sup>1,2</sup>Andronati S.A., <sup>1</sup>Pavlovsky V.I., <sup>1</sup>Semenishina E.A., <sup>3</sup>Darienko A.M., <sup>2</sup>Kravchenko I.A., <sup>2</sup>Kobernik A.A.

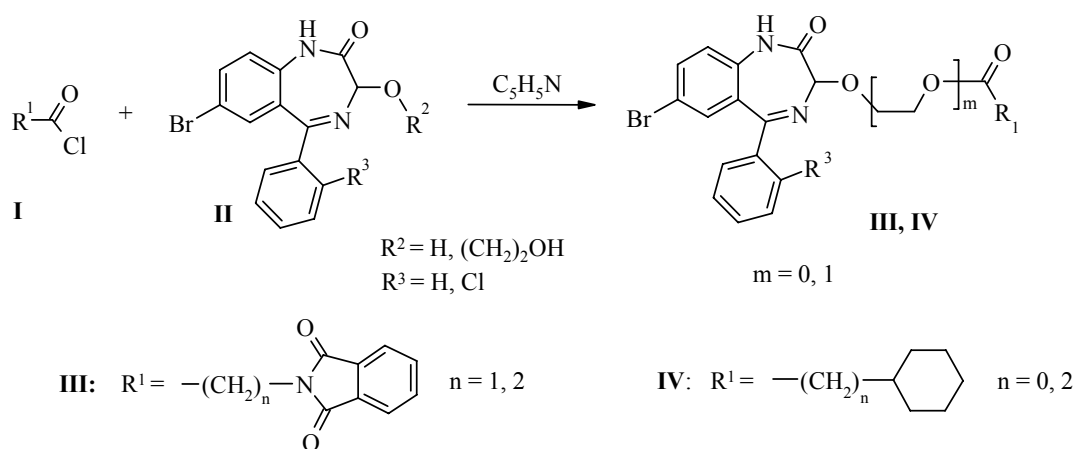
<sup>1</sup>A.V.Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine,  
e-mail: medchem\_department@ukr.net

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Odessa national university, Odessa, Ukraine

<sup>3</sup>Odessa national polytechnic university, Odessa, Ukraine

Anxiety state, sleep and memory disturbance keep a significant place in clinical practice of nerves diseases. It is steel actual to search for new selective high affinity neurotropic compounds among 1,4-benzodiazepine-2-ones and to study an influence of different substituents on pharmacological properties.

We have synthesized new derivatives of 3-hydroxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones **III**, **IV**. The esters were obtained by interaction of the chloroanhydrides of respective carboxylic acids with 3-hydroxy- or 3-(2-hydroxyethoxy)- 1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones **II** in the presence of pyridine.



The anticonvulsive activity of the synthesized compounds was determined by increase of effective doses of pentylenetetrazol which was intravenous introduced to experimental animals. Pentylenetetrazol induces clonic-tonic convulsions and tonic extension. Determinations were done at 3 h and 24 h after oral administration of tested compounds in comparison with 3-hydroxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones.

2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)methylcarbonyloxy derivative (**III**  $n=1$ ,  $R=Cl$ ,  $m=0$ ) demonstrates the highest anticonvulsive activity among 2-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)alkylcarbonyl derivatives **III**. It was noted that the anticonvulsive activity has approximately the same values at 3 h and 24 h after administration, this values exceed values on the anticonvulsive activity of the compound of comparison on 31% и 29 %, respectively. The rest of compounds of this class demonstrate lower or the same anticonvulsive activity as compound of comparison.

7-Bromo-5-phenyl-3[2(cyclohexylcarbonylethoxy)]-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one (**IV**  $n=0$ ,  $R^3=H$ ,  $m=1$ ) unexpectedly has demonstrated the highest anticonvulsive activity among cyclohexyl derivatives **IV** at 3 h after administration, exceeding by its activity respective 5-(2'-chloro)phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one (**IV**  $n=0$ ,  $R^3=Cl$ ,  $m=1$ ).



**ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛИГАНДЫ БРАДИКИНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЯДУ  
1,2-ДИГИДРО-3Н-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНОВ**

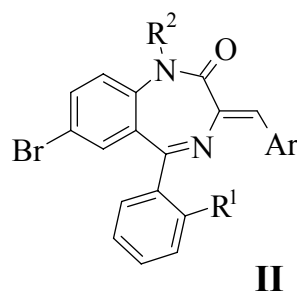
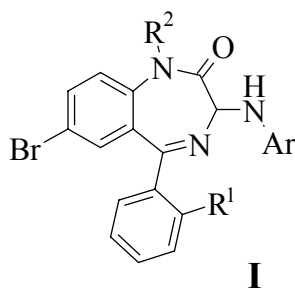
Андронати С.А., Павловский В.И., Кабанова Т.А.

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина  
e-mail: medchem\_department@ukr.net

Одной из актуальных задач медицинской химии является поиск новых низко токсичных соединений, обладающих высокой анальгетической активностью и оказывающих минимальные побочные эффекты.

К настоящему моменту достижением ряда крупных фармацевтических фирм (Merk, Novartis, Elan Pharmaceutical, Fujisava Pharmaceutical и др.) является разработка высокоаффинных антагонистов как  $V_1$ , так и  $V_2$  рецепторов брадикинина на основе производных 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, которые проявляют анальгетический эффект в опытах *in vivo* на животных. Несколько представителей такого типа соединений предложено для клинических испытаний.

Нами синтезирован ряд новых производных 3-ариламино (I) и 3-арилиден (гетерелиден) (II) 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов и исследованы их фармакологические свойства. Все изученные соединения проявили отчетливую анальгетическую активность *in vivo* на модели "корчей", вызванных уксусной кислотой у мышей. Показатели  $ED_{50}$  по анальгетической активности для наиболее активных из синтезированных соединений находятся в пределах 0,19 - 0,9 мкмоль/кг. Препарат сравнения "диклофенак-натрий", широко применяемое в медицине анальгетическое средство, проявил активность с показателем  $ED_{50}$ , равным 31,4 мкмоль/кг.





POTENTIAL LIGANDS OF BRADYKININ RECEPTORS FROM THE SERIES  
OF 1,2-DIHYDRO-3H-1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONES

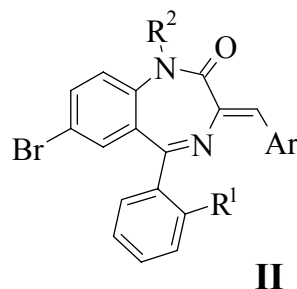
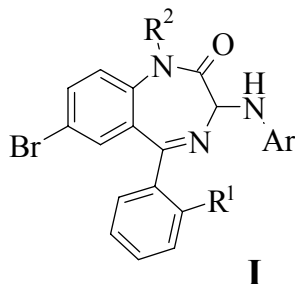
Andronati S.A., Pavlovsky V.I., Kabanova T.A.

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of National Academy of Science of Ukraine, Odessa, Ukraine  
e-mail: medchem\_department@ukr.net

The search for novel low-toxic compounds with a high analgesic activity and minimum side effects is one of essential tasks of medicinal chemistry.

Up to date, a number of prominent pharmaceutical companies (Merk, Novartis, Elan Pharmaceutical, Fujisava Pharmaceutical, etc.) have achieved a success in the development of potent both B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptor antagonists based on 1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one derivatives which demonstrate *in vivo* analgesic effect in animal models. Several representatives of such type compounds have been proposed for clinical trials.

The series novel of 3-arylamine (I) and 3-arylidene (heterylidene) (II) of 1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones derivatives has been prepared by us, and their pharmacological properties have been studied. All the compounds obtained have showed distinct *in vivo* analgesic activity on inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. For most active synthesized compounds, the indices ED<sub>50</sub> of analgesic activity are within 0,19 - 0,9 μmol/kg. The medicine of comparison "diclofenac", wide-spread analgesic agent, has possessed the activity with ED<sub>50</sub> of 31.4 μmol/kg.





## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ «АЛЬБИКАРА» – ГОМОЛОГА ПРЕПАРАТА «МЕБИКАР»

Аникина Л.В.,<sup>1</sup> Вихарев Ю.Б.,<sup>1</sup> Малышев О.А.,<sup>2</sup> Кравченко<sup>2</sup> А.Н.

<sup>1</sup>Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук,  
Пермь, Российская Федерация

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация  
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru

«Альбикар» (2,6-диметил-4,8-диэтилгликольурил) является гомологом препарата Мебикар. Механизм действия этих соединений в организме до сих пор не ясен, поэтому изучение этой проблемы очень актуально. В отличие от Мебикара, «альбикар» является рацематом, поэтому для его разделения на энантиомеры использована ВЭЖХ. Было выделено 2 энантиомера: 1-й энантиомер «альбикара» (вышедший с колонки первым) и 2-ой (вышедший вторым). Изучение механизма действия энантиомеров в сравнении с рацематом выполняли на беспородных мышах-самцах массой 20-22 г (18-20 г и 22-25 г). Поведенческие реакции оценивались в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

Изучение психофармакологических эффектов энантиомеров «альбикара» в сравнении с рацематом проводили поэтапно. На первом этапе были изучены анксиолитические и психостимулирующие свойства «альбикара»-рацемата с использованием различных доз и на продолжительном временном интервале регистрации эффектов. Исследования проводились для серии доз 50, 75, 100, 125 и 150 мг/кг в интегральном тесте «открытое поле» и было показано, что зависимость «доза-эффект» для «альбикара» аналогична зависимостям многих анксиолитиков и антидепрессантов: в небольших дозах проявляется некоторый стимулирующий эффект, с повышением дозы переходящий в угнетение ЦНС. Наиболее эффективная доза 150 мг/кг.

Анксиолитические свойства рацемического «альбикара» изучались в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Выявлено, что в этом тесте «альбикар» не проявил анксиолитического действия. Регистрация эффектов «альбикара»-рацемата и его энантиомеров проводилась в тесте «открытое поле» в течение 90 минут. Было показано, что через 30 минут после введения рацемата оказывает стимулирующее действие на горизонтальную двигательную активность мышей, через 60 минут рацемат проявляет явно угнетающее ЦНС действие, выражающееся в снижении двигательной и исследовательской активности мышей. Через 90 минут после введения он перестает оказывать достоверное воздействие на поведенческие реакции мышей. Энантиомеры вводились в дозе 75 мг/кг, так как соотношение изомеров в рацемате 1:1. Сопоставление результатов полученных по рацемическому «альбикару» и его энантиомерам показывает, что эффекты рацемического препарата обусловлены преимущественно вторым энантиомером.

На втором этапе исследований проводилась сравнительная оценка угнетающего и стимулирующего действия энантиомеров и рацемата с использованием агонистов и антагонистов серотонинергических и дофаминергических рецепторов. Первичное изучение медиаторной базы, опосредующей действие «альбикара» и его энантиомеров на поведение животных в виду характерных для них эффектов, проводилось на дофамин- и серотонинергической системах. Исследование воздействия на дофаминергическую систему было проведено путем оценки влияния препарата на гипотермию, вызванную относительно селективным агонистом дофаминовых D<sub>2</sub>-рецепторов апоморфином. Исследование задействованности (участия) серотонинергической системы в эффектах альбикара и его энантиомеров начато с оценки их влияния на действие 5-гидрокситриптофана, непосредственного предшественника серотонина, способного в отличие от самого медиатора проходить через гематоэнцефалический барьер.

На основании проведенных опытов нами установлено, что энантиомеры «альбикара» по фармакологическому действию отличаются друг от друга. Фармакологическое действие энантиомеров способно и потенцировать, и маскировать фармакологические эффекты рацемата «альбикара».

1-й энантиомер «альбикара» ответственен за стимулирующее влияние на исследовательское поведение мышей, потенцирует эффекты агониста дофаминовых рецепторов и предшественника серотонина. Можно сделать вывод, что его конфигурация имеет большее сродство к структурам, ответственным за активацию серотонинергической системы.

2-й энантиомер «альбикара» ответственен на стимулирующее влияние на двигательную активность мышей, потенцируя эффекты апоморфина. Очевидно, его эффекты опосредуются через активацию структур, связанных с катехоламинами.

*Работа выполнена при поддержке программы ОХМ РАН (ОХ-9) и гранта РФФИ 08-03-01070а.*



## A STUDY ON THE ACTION MECHANISM OF ENANTIOMERS OF *ALBIKAR* – A *MEBIKAR* HOMOLOG

Anikina L.V.,<sup>1</sup> Vikharev Yu.B.,<sup>1</sup> Malyishev O.A.,<sup>2</sup> Kravchenko<sup>2</sup> A. N.

<sup>1</sup>Institute of Technical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, Russian Federation  
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru

*Albikar* (2,6-dimethyl-4,8-diethylglycoluryl) is a homolog of *Mebikar*. The mechanism of action of those compounds on the organism has been so far unclear therefore a study of these is of high topicality. Unlike *Mebikar*, *Albikar* is a racemate that is why HPLC was employed to separate enantiomers. Two enantiomers were isolated: 1<sup>st</sup> (that eluted from the column first) and 2<sup>nd</sup> (that eluted second) *Albikar* enantiomers. The mechanism of enantiomers action as compared to the racemate was examined in outbred male mice with 20-22 g mass (18-20 g and 22-25 g). The behavioral reactions were assessed by open-field and elevated plus-maze tests.

The psychopharmacological effects of *Albikar* enantiomers in comparison with the racemate were researched stepwise. In the first step, the anxiolytic and psychostimulating properties of racemate *Albikar* were examined using various doses in the long time interval of effects registration. The runs were performed for a series of 50, 75, 100, 125, and 150 mg/kg doses in the integral open-field test. It was demonstrated that the 'dose-effect' relationship for *Albikar* was similar to the dependencies of many anxiolytics and antidepressants; a certain stimulating effect was exhibited, which with dose increasing shifted to the CNS depression. The most efficient dose was 150 mg/kg.

The anxiolytic properties of racemate *Albikar* were assessed in the elevated plus-maze tests. It was found out that in this test *Albikar* did not exhibit the anxiolytic action. The effects of racemate *Albikar* and its enantiomers were registered in the open-field test during 90 min. It was shown that 30 min after the introduction the racemate exerted stimulating action on the horizontal locomotive activity in mice and in 60 min it exhibited apparent CNS-depressing action expressed through declining locomotive and exploratory activities in mice. 90 min after the introduction the racemate stopped exerting credible impact on the behavioral reactions in mice. The enantiomers were added in a 75 mg/kg dose because of the racemate isomers ratio 1:1. A comparison of the results obtained for racemate *Albikar* and its enantiomers indicates that the racemate drug effects mostly depend on the second enantiomer.

The second research step was comprised of a comparative assessment of both depressing and stimulating action of the enantiomers and racemate using agonists and antagonists of serotonergic and dopaminergic receptors. A preliminary study of the mediator basis that mediates *Albikar* and its enantiomers action on the animals' behavior in view of their specific effects was performed for dopamin- and serotonergic systems. The impact on the dopaminergic system was examined by assessing the drug's effect on hypothermia caused by apomorphine, a relatively selective agonist of dopamin D<sub>2</sub>-receptor. The research on a serotonergic system input to the effects of *Albikar* and its enantiomers commenced with the evaluation of their influence on the action of 5-hydroxytryptophan, an immediate serotonin precursor, which, unlike the mediator, is capable of passing through the blood-brain barrier.

Basing on the experiments, we established that the *Albikar* and its enantiomers differed from each other in pharmacological action. The enantiomers' pharmacological action can both exponentiate and mask the pharmacological effects of racemate *Albikar*.

The 1<sup>st</sup> *Albikar* enantiomer is responsible for the stimulating influence on the exploratory behavior in mice and exponentiates the effects of the agonist of dopamin receptors and of the serotonin precursor. One may conclude that its configuration has great affinity to the structures responsible for the serotonergic system activation.

The 2<sup>nd</sup> *Albikar* enantiomer is responsible for the stimulating influence on the locomotive behavior in mice and exponentiates the apomorphine effects. It is evident that its effects are mediated through the activation of the structures related to catecholamines.

*This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No.08-03-01070).*





## КАРОТИНОИДЫ КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ ГЕНОМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВИНЦА НА ОРГАНИЗМ

*Анисович М.В., Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.*

ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»

e-mails: elenamorozova@tut.by; nikolarisa@tut.by

Перспективными средствами защиты генома при воздействии различных мутагенов могут быть использованы каротинсодержащих препараты, которые не токсичны для организма и обладают выраженными антимуtagenными и генопротекторными свойствами.

Целью исследования явилось изучение влияния ликопина и  $\beta$ -каротина на клеточный цикл и апоптоз при поступлении нитрата свинца в организм. Методом проточной цитофлуориметрии оценена плоидность клеток костного мозга, селезенки, тимуса и крови животных и изучены параметры распределения клеток по стадиям клеточного цикла, пролиферация и апоптоз.

Крысам (самцы и самки; линия Wistar; возраст 3 мес; средняя масса 165 г) вводили растворы перорально зондом в желудок в течение 14 дней:  $\beta$ -каротин в дозе 1,07 мг/кг/сутки, ликопин в дозах 0,07, 0,14 и 0,36 мг/кг/сутки. Общие дозы составили: 15 мг/кг  $\beta$ -каротина и 1, 2 и 5 мг/кг ликопина. Свинец вводили в дозе 80 мг/кг также в течение 14 дней.

Показано, что у животных, которым вводили нитрат свинца, пролиферация клеток в селезенке и крови возрастает на 70-100% по сравнению с контролем. В крови животных, которым вводили исследуемые дозы ликопина, пролиферация клеток снижается на 50-90% по сравнению с контролем. При одновременном введении нитрата свинца и каротиноидов пролиферация клеток крови снижается до контрольного уровня у животных, получавших 5 мг/кг ликопина и 15 мг/кг  $\beta$ -каротина, а также при сочетании ликопина (1 мг/кг) и  $\beta$ -каротина (15 мг/кг). В популяции спленоцитов пролиферация клеток не превышала контрольный уровень при раздельном действии ликопина (или ликопина и  $\beta$ -каротина) в дозах 1 и 5 мг/кг на фоне введения свинца. Отмечено, что только в сочетании с  $\beta$ -каротином ликопин в дозах 1 и 5 мг/кг достоверно снижает пролиферацию клеток селезенки по сравнению с контролем. У самцов исследуемая композиция каротиноидов снижает пролиферацию клеток селезенки на 61% (доза ликопина 1 мг/кг) и 76% (доза ликопина 5 мг/кг), у самок – на 45% (доза ликопина 5 мг/кг). Пролиферация клеток тимуса и костного мозга не превышала контрольный уровень.

Кроме того, ликопин снижает уровень апоптоза в крови, костном мозге, тимусе и селезенке при его сочетанном введении с нитратом свинца.

Ликопин в дозах 1 и 2 мг/кг снижает уровень апоптоза в крови на 50%, а при дозе 5 мг/кг – на 77% по сравнению с контролем. При сочетанном введении ликопина в дозах 1 и 5 мг/кг и нитрата свинца уровень апоптоза в крови также снижается на 60-67% по сравнению с контролем.

Выявлено, что введение нитрата свинца повышает уровень апоптоза в селезенке на 87%, в то время как при сочетанном введении ликопина в дозах 2 и 5 мг/кг на фоне нитрата свинца снижается этот показатель до контрольного уровня. В тимусе при введении животным ликопина в дозе 1 мг/кг снижается уровень апоптоза на 44%. При введении крысам ликопина в дозе 2 мг/кг в костном мозге снижается уровень апоптоза на 34%, а при сочетанном действии ликопина (во всех дозах) и нитрата свинца – на 35-50%.

Установлены достоверные различия действия ликопина на клетки селезенки, костного мозга, тимуса и крови в зависимости от пола животных.

Таким образом, ликопин и  $\beta$ -каротин могут нивелировать отрицательное действие нитрата свинца на уровень пролиферации клеток в крови и селезенке, а также оказывать синергическом эффект при сочетанном действии. О генопротекторных свойствах ликопина свидетельствуют данные о достоверном снижении уровня апоптоза в клеточных популяциях различной функциональной специализации. Влияние ликопина на частоту апоптоза может объясняться как его антиоксидантными и антиоксидантстимулирующими свойствами [1,2], так и непосредственным действием на механизм апоптоза в клетке [1].

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что именно ликопин, благодаря своему разнонаправленному действию на клеточные процессы, может оказаться эффективным средством профилактики различных генетических нарушений, вызванных действием тяжелых металлов на организм.

### **Литература:**

1. Heber, D., Quing-Yi Lu. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene / D.Heber [et al.]/ University of California Center of Human Nutrition. – 2002. – P. 920-923.
2. Ben-Dor, A. Steiner, M. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system/ A. Ben-Dor [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2005. - № 4. – P. 177-186.



## **CAROTENOIDS AS PERSPECTIVE MEANS OF GENOME PROTECTION UNDER LEAD EXPOSURE ON ORGANISM**

*Anisovich M. V., Morozova E.V., Nikolaevich L.N.*

SI "SPC "Institute of pharmacology and biochemistry of the NAS of Belarus"  
e-mails: nikolarisa@tut.by; elenamorozova@tut.by

Carotene preparations may be used as perspective means of genome protection under various mutagens exposure which are not toxic for an organism and possess expressed antimutagenic and genoprotective properties.

The aim of the investigation was to study the influence of lycopene and  $\beta$ -carotene on cellular cycle and apoptosis under lead nitrate intake in organism. Animals' bone marrow, spleen, thymus and blood cells ploidy was estimated and parameters of cells on cellular cycle stages distribution, proliferation and apoptosis were studied by the flow cytometry method.

Rats (males and females; strain Wistar; age 3 month; average weight 165 g) were orally gavaged with  $\beta$ -carotene in a dose of 1,07 mg/kg/day, lycopene in doses 0,07, 0,14 and 0,36 mg/kg/day solutions within 14 days. The general doses were 15 mg/kg  $\beta$ -carotene and 1, 2 and 5 mg/kg lycopene. Lead was entered in a dose of 80 mg/kg also within 14 days.

The animals entered lead nitrate was shown to have increased on 70-100 % spleen and blood cells proliferation in comparison with the control. Cells proliferation in blood of animals gavaged with investigating doses of lycopene decreased on 50-90 % in comparison with the control. Animals received 5 mg/kg of lycopene and 15 mg/kg of  $\beta$ -carotene and also the combination of lycopene (1 mg/kg) and  $\beta$ -carotene (15 mg/kg) were shown to have decreased to the control level blood cells proliferation under simultaneous lead nitrate and carotenoids administration. Splenocytes population cells proliferation did not exceed the control level under separate lycopene (or lycopene and  $\beta$ -carotene) action in doses of 1 and 5 mg/kg compared to lead introduction. Lycopene only in the combination with  $\beta$ -carotene in doses of 1 and 5 mg/kg was noticed to significantly reduce spleen cells proliferation in comparison with the control. The investigated carotenoids composition reduced males spleen cells proliferation on 61 % (lycopene dose was 1mg/kg) and on 76 % (lycopene dose was 5 mg/kg), females spleen cells proliferation - on 45 % (lycopene dose was 5 mg/kg). Thymus and bone marrow cells proliferation did not exceed the control level.

Besides, lycopene reduced blood, bone marrow, thymus and spleen apoptosis level under additional lead nitrate introduction.

Lycopene doses of 1 and 2 mg/kg reduced blood apoptosis level on 50 %, and the dose of 5 mg/kg - on 77 % in comparison with the control. Blood apoptosis level decreased on 60-67 % in comparison with the control also under simultaneous lycopene doses of 1 and 5 mg/kg and lead nitrate introduction.

Lead nitrate administration was revealed to raise spleen apoptosis level on 87 % while the administration of lycopene doses of 2 and 5 mg/kg under additional lead nitrate introduction decreased this indicator to the control level. Thymus apoptosis level decreased on 44 % under lycopene dose of 1 mg/kg introduction to animals. Introduction to rats of lycopene dose of 2 mg/kg decreased bone marrow apoptosis level on 34 % and 35-50 % under additional lycopene (all doses) and lead nitrate action.

Significant differences of lycopene action on spleen, bone marrow, thymus and blood cells depending on animals' gender were established.

Thus, lycopene and  $\beta$ -carotene may counteract lead nitrate negative action on proliferation blood and spleen cells level and also render synergetic effect under simultaneous action. The data concerning significant decrease of various functional specializations cells populations' apoptosis level suggest genoprotective properties of lycopene. Influence of lycopene on frequency apoptosis may be elucidated by its antioxidatic and antioxidant promoting properties [1, 2], as well as its direct action on apoptosis mechanism in cell [1].

The obtained experimental data allow to make a conclusion that exactly lycopene, due to its manifold action on cells processes, can appear an effective mean of preventive maintenance of the various genetic disturbances caused by heavy metals action on the organism.

### **References:**

1. Heber, D., Quing-Yi Lu. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene / D.Heber [et al.]/University of California Center of Human Nutrition. - 2002. - P. 920-923.
2. Ben-Dor, A. Steiner, M. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system/A. Ben-Dor [et al.]/Mol. Cancer Ther. - 2005. - № 4. - P. 177-186.



## ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ФІТОЕКДІСТЕРОЇДІВ ЯК ЗАСОБІВ БІОЛОГІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ

Алихтіна О.Л.<sup>1</sup>, Коцюруба А.В.<sup>2</sup>, Дмитруха Н.М.<sup>1</sup>, Андрусишина І.М.<sup>1</sup>, Коркач Ю.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ „Інститут медицини праці АМН України”, Київ, Україна  
e-mail:dmytrukha@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут біохімії ім. О.О. Палладіна НАН України, Київ, Україна

Результати експериментальних та клінічних досліджень свідчать, що фітоекдістероїди та препарати на їх основі володіють анаболічною, адаптогенною, антиоксидантною, мембраностабілізуючою, гепато-, нейрон- та нефропротекторною, антиаритмічною, імуномоделюючою, гіпоглікемічною та гіпохолестеринемічною властивостями. Їх застосування є перспективним та потребує подальших ретельних досліджень.

Нами на моделі свинцевої інтоксикації були проведені експериментальні дослідження протекторних властивостей екстракту *S. coronata*, що містить фітоекдістероїди, з метою оцінки його протекторної дії.

**Методи досліджень.** Дослідження проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар вагою 160-180 гр., які утримувалися у загальноприйнятих умовах. Щурам першої дослідної групи щоденно до харчового раціону протягом 1 місяця додавали попередньо розчинений у воді висушений водно-спиртовий екстракт *S. coronata* у дозі 20 мг/кг (добова доза сумарних екдістероїдів становила 10 мг/кг). Тваринам другої дослідної групи щоденно вводили внутрішньоочеревинно ацетат свинцю у дозі 1,53 мг/кг на фізіологічному розчині (28 введень). Третя дослідна група щурів отримувала ацетат свинцю та екстракт *S. coronata* у зазначених вище дозах. Тваринам контрольної групи вводили внутрішньоочеревинно фізіологічний розчин. Після припинення експозиції половину тварин знеживлювали шляхом декапітації, а решту – через 1 місяць постекспозиційного періоду і проводили дослідження.

Екстракт, що містив 5 % екдістероїдів, готували із надземної частини у фазі цвітіння рослини *S. coronata*, яка була вирощена на дослідних ділянках в національному парку „Олександрія” (м. Біла Церква). Екстракцію, ідентифікацію і ліофілізацію проводили за методикою Ю.Д. Холодової на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ.

Вміст свинцю в крові і внутрішніх органах визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопометрії; гематологічні показники досліджували по загальноприйнятих методиках; функціональний стан нейтрофілів оцінювали по їх фагоцитарній і бактерицидній активності; біохімічними методами визначали рівень тіолових сполук в тканинах печінки, показники продукції активних форм кисню (АФК) та обміну оксиду азоту в гомогенатах печінки і аорти. Функціональний стан судинної стінки оцінювали на препаратах ізольованих сегментів аорти щурів за допомогою міографічної установки.

**Результати досліджень.** Застосування екстракту *S. coronata* на фоні експозиції свинцем у експериментальних тварин сприяло зниженню змісту свинцю у внутрішніх органах, поліпшенню гематологічних показників, нормалізації функціональної активності нейтрофілів, зниженню продукції АФК, а також позитивній динаміці зміни показників обміну оксиду азоту і функціональної активності судинної стінки. Вказані зміни частково зберігалися і через 1 місяць після припинення застосування екстракту, що свідчить про їх стійкість. У разі застосування екстракту *S. coronata* у інтактних тварин не спостерігалось істотних змін досліджуваних показників.

Таким чином отримані результати свідчать про високу протекторну ефективність екстракту *S. coronata* у тварин на фоні експозиції ацетатом свинцю і перспективності застосування препаратів на основі фітоекдістероїдів у якості засобів біологічної профілактики свинцевої інтоксикації, а з огляду на їх фармакологічні властивості – і при інших патологічних станах.



**PROSPECTS OF THE USE OF PREPARATIONS BASED ON PHYTOECDISTEROIDS AS MEANS  
OF BIOLOGICAL PREVENTION**

*Apykhtina O.L.<sup>1</sup>, Kotsuruba A.B.<sup>2</sup>, Dmytrukha N.M.<sup>1</sup>, Andrusishyna I.M.<sup>1</sup>, Korkach Yu.P.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: dmytrukha@ukr.net

<sup>2</sup> Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

It was shown, by the results of experimental and clinical researches, that phytoecdisteroids and preparation based on phytoecdisteroids have anabolic, membran-stabilized, hepato-, neuro-protective action, antyarrhythmic, immunomodulation, hypoglycemic and hypoholesterynemic properties. Their usage is perspective and however this require continuing additional researchers.

We have made researchers on protective properties of extract of *S. coronata*, which including phytoecdisteroids. The aim of this researcher was to estimate a protective effect.

The use of *S. coronata* extract in experimental animals on the background of lead acetate exposure promotes the decrease of the level of this metal in biological media, decrease manifestations of its hematotoxic action, improvement of indices of products of reactive oxygen species and nitric oxide metabolism, level of thiol compounds and the shortening function of vessel walls, showing their high efficiency and perspective of their use as means of biological prevention.

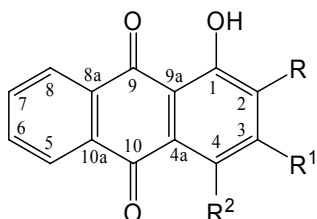


## КЛЕТочная КУЛЬТУРА *RUBIA CORDIFOLIA* КАК НОВЫЙ ИСТОЧНИК АНТРАХИНОНОВ С ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Азарова О.В., Мищенко Н.П., Федорев С.А., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В., Шкрыль Ю.Н., Чернодед Г.К.

e-mail: zver@asmu.ru; kunaza@rol.ru

В последние годы объектом пристального внимания фитотерапевтов являются антрахиноны растения марены сердцелистной *Rubia cordifolia* (*Rubiaceae*), известного в аюрведических трактатах как *Manjishtha*. Широкий спектр фармакологической активности стимулировал развитие биотехнологических способов получения биомассы марены сердцелистной, синтезирующей вторичные метаболиты в количествах превышающих таковые в нативном источнике *R. cordifolia*. Из клеточной культуры *R. cordifolia* (штамм RC-I), полученной сотрудниками Биолого-почвенного института Дальневосточного отделения РАН из корневищ дикорастущих растений Приморского края, методами колоночной гель-хроматографии на Sephadex LH-20 и обратнофазной колоночной хроматографией низкого давления на TSK геле Тоурораг HW-40 выделено семь антрахинонов: руберитриновая кислота I, муньистин II, ализарин III, ксантопурпурин IV, пурпурин V, метиловый эфир муньистина VI и этилксантопурпурин VII.



- I: R = O-β-D-Xyl-(1-6)-β-D-Gl, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H
- II: R = COOH, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H
- III: R = OH, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H
- IV: R = H, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H
- V: R = R<sup>2</sup> = OH, R<sup>1</sup> = H
- VI: R = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H
- VII: R = R<sup>2</sup> = H, R<sup>1</sup> = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

В результате количественного определения индивидуальных антрахинонов методом обратнофазной ВЭЖХ на колонке Hypersil BDS-C18 установлено, что суммарное содержание антрахинонов в каллусах марены сердцелистной составляет 2,14% с доминированием муньистина (60,3%) и пурпурина (20,2%).

Высокое содержание антрахинонов в биотехнологическом материале по сравнению с аналогичным показателем для корней нативного растения (0,2%) позволяет рассматривать клеточную культуру *Rubia cordifolia* как продуктивный отечественный источник антрахинонов. Следует отметить, что доминирующие антрахиноны марены сердцелистной муньистин и пурпурин не обладают мутагенной активностью в отличие от некоторых антрахинонов марены красильной.

В серии экспериментов на животных и *in vitro*, проведенных в лаборатории кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, установлена противовоспалительная, антиоксидантная, противомикробная и диуретическая активность комплекса антрахинонов, извлеченных из клеточной культуры марены сердцелистной. Учитывая патогенетическое значение выявленных фармакологических эффектов в лечении воспалительных заболеваний почек, было изучено его влияние на течение одного из распространенных иммуно-воспалительных заболеваний почек – гломерулонефрита.

Для изучения фармакологической активности готовили препарат, содержащий очищенный комплекс антрахинонов из хлороформного экстракта каллусов *Rubia cordifolia* с общим содержанием антрахинонов 0,76%. Нефропротективную активность фитокомплекса в дозе 50 мг/кг определяли на фоне экспериментального гломерулонефрита Masugi крыс по его влиянию на экскрецию белка и биохимические показатели мочи.

При длительном применении антрахинонов марены была зафиксирована тенденция к постепенному снижению суточного выделения белка. До конца эксперимента уровень протеинурии был на 40,8 - 58,6% ниже аналогичного показателя нелеченных животных. Следует отметить нормализацию скорости клубочковой фильтрации у крыс с патологией под воздействием антрахинонов клеточной культуры марены. Лечебный эффект реализовался в снижении показателей активности ферментов аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и гамма-глутамилтрансферазы. К концу эксперимента показатели активности ферментов были существенно ниже, чем у больных животных. На пике заболевания отмечено снижение активности ферментов в 2,9 -3,7 раз по сравнению с показателями крыс с гломерулонефритом.

Таким образом, в условиях экспериментального гломерулонефрита крыс комплекс антрахинонов клеточной культуры марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L. в дозе 50 мг/кг оказывал благоприятное влияние на течение заболевания, заключающееся в снижении уровня протеинурии и ферментурии.

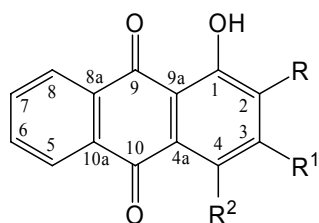


CELL CULTURE OF *RUBIA CORDIFOLIA* AS THE NEW SOURCE OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE ANTHRAQUINONES

Azarova O.V., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Shkryl' Yu.N., Chernoded G.K.

e-mail: zver@asmu.ru; kunaza@rol.ru

In recent years the anthraquinones of plant indian madder (*Rubiaceae*) known in ayurvedic treatises as *Manjishtha* has become the object of close attention of phytopharmacologists. Wide spectrum of pharmacologic activity initiated the development of biotechnological methods of obtaining indian madder biomass which synthesizes secondary metabolites in quantities exceeding those in *Rubia cordifolia*'s native source. Seven anthraquinones are selected from cell culture of *R. cordifolia* (strain RC-I), received by collaborators of the Institute of Biology and Soil Science (Far East Branch of Russian academy of Sciences) from wild plant rhizomes of Primorye territory, by methods of column gel-chromatography on Sephadex LH-20 and re-column chromatography of low pressure on TSK gel of Toyopearl HW-40 such as ruberitric acid I, munjistin II, alizarine III, xanthopurpurin IV, purpurin V, methyl ether of munjistin VI and aetyl ether of xanthopurpurin VII.



- I: R = O-β-D-Xyl-(1-6)-β-D-Gl, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H  
 II: R = COOH, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H  
 III: R = OH, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H  
 IV: R = H, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H  
 V: R = R<sup>2</sup> = OH, R<sup>1</sup> = H  
 VI: R = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H  
 VII: R = R<sup>2</sup> = H, R<sup>1</sup> = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Total content of anthraquinones in calluses account for 2,14 % with domination of munjistin (60,3%) and purpurin (20,2%) was determined according to quantitative measurement of individual anthraquinones by method of re-column high performance liquid chromatography on column Hypersil BDS-C18.

High amount of anthraquinones in biotechnological material allows to consider cell culture *Rubia cordifolia* as a productive national source of anthraquinones in contrast to the similar parameter for roots of the native plant (0,2%). It is necessary to note, that dominating anthraquinones of indian madder munjistin and purpurin do not possess mutagenic activity unlike some anthraquinones of *Rubia tinctorum*.

Anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and diuretic activities of anthraquinones complex derived from cell culture of indian madder were established in experiments in animals and *in vitro*, carried out in the laboratory of the Department of pharmacology of the Altay State Medical University. Taking into consideration pathogenetic significance of detected pharmacological effects for the treatment of inflammatory kidney diseases, its influence on the development of glomerulonephritis, one of widespread immune-inflammatory kidney diseases was studied.

To study pharmacological activity cleared complex of anthraquinones from chloroformic extract of *Rubia cordifolia* calluses with total content of anthraquinones of 0,76% was prepared. Nephroprotective activity of phytocomplex in dosage of 50 mg/kg was determined in rats with experimental glomerulonephritis *Masugi* according to its influence on excretion of protein and on biochemical parameters of urine.

The trend of gradual decrease in daily protein excretion was determined after long-time administration of indian madder anthraquinones. The level of proteinuria was 40,8 - 58,6% lower than in nontreated animals by the very end of the experiment. It is noteworthy the improvement of glomerular filtration rate in glomerulonephritic rats treated with anthraquinones of madder cell culture. Therapeutic effect resulted in decrease of alanine aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and gamma-glytamyltransferase activity. Enzymes' activity was significantly lower than in diseased animals by the end of the experiment. It decreased 2,9 - 3,7 times compared to rats with glomerulonephritis at the peak of the disease.

Thus complex of anthraquinones of cell culture of indian madder *Rubia cordifolia* L. in dosage 50 mg/kg had a beneficial effect on the disease in experimental rat model of glomerulonephritis, it included decreased level of proteinuria and enzymuria.



## БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Башилов А.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
e-mail: anton.bashilov@gmail.com

Цель работы: изучить антиоксидантную активность и особенности биохимического состава *F. hexapetala* Gilib., *F. ulmaria* (L.) Maxim. и *P. coeruleum* L., с последующей разработкой практических рекомендаций по заготовке и хранению лекарственного сырья, а также с целью применения экстрактов в качестве ингибиторов процессов перекисидации липидов.

Полученные результаты и их новизна: установлено, что содержание салицилатов, таннинов, флавоноидов в растительном сырье *F. ulmaria* (L.) Maxim. и *F. hexapetala* Gilib., а также тритерпеновых гликозидов и флавоноидов у *P. coeruleum* L. зависит от фаз вегетации. Максимальное содержание действующих веществ в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси соответствует фенофазам бутонизации и цветения.

В процессе хранения растительного сырья в течение двух с половиной лет установлено, что потери содержания салицилатов, тритерпеновых гликозидов, таннинов в воздушно-сухом растительном сырье не превышали 5,2% для представителей рода *Filipendula* Mill. и 6,5% – *P. coeruleum* L.

Экстракты, полученные из растительного сырья соцветий, листьев, корней и корневищ *F. hexapetala* Gilib., *F. ulmaria* (L.) Maxim. и *P. coeruleum* L. различных сроков хранения, оказывают существенное ингибирующее действие на процессы перекисного окисления растительных (масло льна) и животных (митохондриальная фракция гепатоцитов крыс) липидов.

Рекомендации по использованию: даны практические рекомендации по оптимальным срокам заготовки и хранению лекарственного растительного сырья. Экстрактивные вещества представленных видов могут быть рекомендованы в качестве ингибиторов перекисного окисления липидов.

Предлагается использовать полученные результаты при создании новых видов пищевых продуктов с повышенной биологической ценностью и для разработки научно обоснованных методов контроля качества растительного сырья и фитопрепаратов.

Область применения – пищевая промышленность, фармакогнозия.



## **BIOCHEMICAL COMPOSITION AND INHIBITION PEROXIDICAL OXIDATIONS OF LIPIDS BY THE EXTRACTS OF MEDICINAL HERBS**

*Bashilov A.V.*

Central Botanical Garden of NAS of Belarus  
e-mail: anton.bashilov@gmail.com

Aim of the research: to investigate antioxidant activity and characteristics of biochemical composition of *F. hexapetala* Gilib., *F. ulmaria* (L.) Maxim. and *P. coeruleum* L. with following extraction of practical reference to storage and storing of medicinal material, as well as with the purpose of using extract as safe inhibitor of lipid peroxidase process.

Obtained results and their novelty: it has been identified, that the contents of salicylates, tannins, flavonoids in plant raw material of *F. ulmaria* (L.) Maxim. and *F. hexapetala* Gilib., as well as the contents of saponins, flavonoids in *P. coeruleum* L. depend on phase of vegetation. The most of active substances is in line with phase of vegetation of budding and flowering in conditions of the central agroclimatic zone of Belarus.

It has been identified, that during two-and-half-years process of plant raw material storing, decrease of the contents of salicylates, saponins, tannins, flavonoids in air-dried plant raw material is not more than 5,2% for representatives of sort *Filipendula* Mill. and not more than 6.5% for *P. coeruleum* L.

Extract from plant raw material of flowers, leaves, subterranean organs, as well as *F. hexapetala* Gilib., *F. ulmaria* (L.) Maxim. and *P. coeruleum* L. of various shelf life have an inhibiting effect on process of plant raw (flax oil) lipid peroxidation and animal (mitochondrial fraction of rats' hepatocytes) lipid peroxidation.

Application recommendations: practical reference to storage and storing of medicinal plant raw material on optimal time constraints has been presented. Extractive substances of presented plants may be recommended as inhibitors of peroxidation.

It is proposed to use the finding results in development of new types of foodstuffs with enhanced biological value and scientifically validated methods of quality control of medicinal plant and related phytopreparations.

Area of application – food industry, pharmacognosy.





## ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ ГРУПИ "СИМБІТЕР" НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В ТРАВНОМУ ТРАКТІ, ВИКЛИКАНІ ТРИВАЛИМ ЗНИЖЕННЯМ СЕКРЕЦІЇ СОЛЯНОЇ КИСЛОТИ

*Берегова Т.В., Остапченко Л.І., Цирюк О.І., Радчук О.М., Короткий О.Г., Вороніна О.К., Червінська Т.М., Толстонова Г.М.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: tberegova@univ.kiev.ua

Однією із причин мікроекологічних порушень в шлунково-кишковому тракті у людей є тривале застосування антисекреторних препаратів та знижена кислотність шлункового соку і ахілія, адже соляна кислота швидко знищує велику частину мікроорганізмів, що попадають в шлунок. Окрім негативного впливу на мікробіоценоз травного тракту тривале зниження кислотності шлункового соку призводить до явища гіпергастринемії. Гастрин же є мітогенним фактором для росту епітеліального шару клітин шлунку та товстої кишки, а гіпергастринемія є фактором ризику розвитку раку і шлунку, і товстої кишки.

В зв'язку з цим метою роботи було вивчення впливу мультипробіотиків "Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний концентрований" та "Апібакт<sup>®</sup>" на мікробіоценоз та структурно-функціональні зміни в шлунку та товстій кишці на фоні тривалого пригнічення секреції соляної кислоти в шлунку омепразолом (ОМ).

Щури були поділені на 4 групи. Щури I групи, яким упродовж 28 днів вводили плацебо, слугували контролем. Щурам II групи упродовж 28 днів вводили ОМ (14 мг/кг, в/о, один раз на добу). Щурам III групи упродовж 28 днів одночасно з введенням ОМ орально вводили мультипробіотик "Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний концентрований" (ТОВ фірма "О.Д. Пролісок") (0,14 мл/кг). Щурам IV групи упродовж 28 днів одночасно з введенням ОМ орально вводили мультипробіотик "Апібакт<sup>®</sup>" (ТОВ фірма "О.Д. Пролісок") (0,14 мл/кг). Мультипробіотик "Симбітер<sup>®</sup>" є живою концентрованою біомасою симбіозу 14 унікальних пробіотичних штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів, пропіоновокислих бактерій та фізіологічно корисних продуктів їх метаболізму. "Апібакт<sup>®</sup>" додатково містить 2,5% екстракт прополісу. Через добу після останнього введення препаратів проводили гострий експеримент, в якому досліджували шлункову секрецію методом перфузії ізольованого шлунку за Гхошем та Шільдом, транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки методом перфузії сегменту товстої кишки, радіоімунним методом визначали концентрацію гастрину в сироватці крові. Вивчення мікробіоценозу шлунка та кишечника включало в себе аналіз видового та кількісного складу мікрофлори. У тварин після закінчення експерименту видаляли шлунок та товстий кишечник для морфометричних досліджень.

Показано, що 28-ми денне введення блокатора  $H^+, K^+$ -АТФази омепразолу спричиняло зростання концентрації гастрину в сироватці крові до  $170,7 \pm 90,7$  пг/мл ( $p < 0,05$ ) проти  $59 \pm 35,5$  пг/мл в контролі. Порівняння стану мікрофлори шлунка у щурів контрольної групи з групою, якій протягом 28 днів вводили омепразол, показали, що у щурів після 28-денного введення омепразолу спостерігались значне зменшення частоти висівання лактобактерій та тенденція до зростання колонізації умовно-патогенною мікрофлорою та грибами р. Кандіда. Статистично підтверджено зниження кількісних показників висіву зі шлунка нормальної мікрофлори. У 40% тварин нормальна мікрофлора взагалі не висівалась. Бактеріальний спектр шлунка тварин з гіпергастринемією розширився за рахунок висіву клібсієли, ентеробактера, протея. Зареєстровано також збільшення контамінації шлунка золотистим стафілококом. Концентрація цих умовно-патогенних бактерій досягла високого рівня ( $10^4$ - $10^5$  КУО/г). Одержані данні свідчать про зниження колонізаційної резистентності слизової оболонки шлунка у тварин із зниженою кислотністю шлункового соку упродовж 28 днів та про можливість транзиту мікрофлори з кишечника у шлунок висхідним шляхом. В кишечнику також формувався суттєвий дисбаланс між показниками контамінації облігатною та факультативною мікрофлорою. Морфологічні дослідження показали розвиток метаплазії в шлунку та гіперплазії в товстій кишці, внаслідок чого спостерігались суттєві зміни в секреторній функції шлунка. Також після 28 днів введення омепразолу в товстому кишечнику виявлено знижений рівень абсорбції води на 44,07%, всмоктування  $Na^+$  – на 53,31%. Сумарний потік  $K^+$  знизився на 217,39% порівняно з контрольними значеннями цих показників. У той час рівень всмоктування іонів  $Cl^-$  через епітелій товстої кишки статистично значуще від контролю не відрізнялось. Введення щурам мультипробіотика "Симбітеру<sup>®</sup>" одночасно з омепразолом протягом 28 діб запобігало формуванню дисбіотичних змін в шлунку та кишечнику та морфологічним змінам в шлунку та товстому кишечнику. Спостерігалася нормалізація секреторної функції шлунка. Застосування "Симбітеру<sup>®</sup>" разом з омепразолом протягом 28 днів спричиняло статистично значуще підвищення рівня всмоктування  $Na^+$  на 236,29% та  $Cl^-$  на 68,4 %. Також у цій групі показники сумарних потоків калію показали посилення секреції  $K^+$  на 252,17% порівняно з групою тварин, якій вводили лише омепразол. При цьому рівень транспорту води у цих групах не відрізнявся. Аналогічний вплив на структурно-функціональний стан шлунка та товстого кишечника справляв інший мультипробіотик "Апібакт<sup>®</sup>". Зроблено висновок, що використання "Симбітеру<sup>®</sup>" та "Апібакту<sup>®</sup>" є доцільним у пацієнтів на фоні прийому антисекреторних та антагоністичних препаратів та у людей з гіпоацидністю та ахілією для запобігання розвитку морфологічних та функціональних змін в шлунку та кишечнику, а також для відновлення нормального рівня транспорту води і іонів через епітелій товстого кишечника у пацієнтів з гіпергастринемією різного ґенезу та в якості додаткової терапії у пацієнтів з порушеним електролітним балансом.



**PREVENTIVE ACTION OF MULTIPROBIOTICS OF GROUP "SYMBITER" ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN GASTROINTESTINAL TRACT EVOKED BY LONG-TERM REDUCTION OF GASTRIC ACID SECRETION**

*Beregova T.V., Ostapchenko L.I., Tsyryuk O.I., Radchuk O.M., Korotkyy O.G., Voronina O.K., Chervinska T.M., Tolstanova G.M.*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine  
e-mail: tberegova@univ.kiev.ua

In people long-term use of antisecretory agents, hypoacidity and achylia are one of the reason of microecological disturbances in gastrointestinal tract because gastric acid quickly obliterates the most part of microorganisms which get to stomach. In addition to negative influence on microbiocenose of gastrointestinal tract long-term decrease of gastric acid leads to hypergastrinemia. Gastrin is mitogenetic factor for growth of epithelial tissue of stomach and colon and hypergastrinemia is risk factor of cancer development in stomach and colon.

In connection with this the aim of the study was to investigate the influence of multiprobiotics "Symbiter<sup>®</sup> acidophilic concentrated" (Symbiter) and "Apibact<sup>®</sup>" on microbiocenosis and structural and functional changes in stomach and colon in conditions of long-term reduction of gastric acid secretion evoked by omeprazole (OM).

The rats were divided into 4 groups. The rats of the first (control) group were injected with placebo. The rats of the second group were injected with OM (14 mg/kg, i.p.) during 28 days. The rats of the third group were injected with the same dose of OM and Symbiter (0,14 mg/kg, per os) (the firm "O.D. Prolisok") during 28 days. The rats of the fourth group were injected with the same dose of OM and Apibact (0,14 mg/kg, per os) (the firm "O.D. Prolisok") during 28 days. Multiprobiotic "Symbiter<sup>®</sup>" is living concentrated biomass of symbiosis of 14 microorganisms strains (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionic bacterium*, *Bifidobacterium*) and their physiologically active metabolites. Apibact extra contains 2,5% extract of propolis. In a day after last injection of drugs in acute experiment we investigated the basal acid secretion by method of isolated stomach perfusion by Ghosh and Shild, water and ion ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) absorption and secretion in the isolated loop of large intestine in rats, gastrin concentration in serum we determined by radioimmunoassay technique. The study of microbiocenosis in stomach and colon involved the analysis of specific and quantitative composition of microflora. In animals on completion of experiment the stomach and colon eliminated for morphometric investigations.

It was shown that long-term (28 days) introduction of  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase blocker OM evoked the increase of gastrin concentration in the blood to  $170,7 \pm 90,7$  pg/ml ( $p < 0,05$ ) compared to  $59 \pm 35,5$  pg/ml in control. Comparison of gastric microflora in rats of control group with rats which were injected with OM during 28 days indicated that in rats after 28 days introduction of OM frequency of *Lactobacterium* seeding greatly decreased and tendency was to increase of colonization by opportunistic pathogenic bacteriums and fungi *Candida*. Statistically it was confirmed reduction of quantitative index of normoflora seeding from stomach. In 40% of animals normal microflora was not seeded at all. Bacterial spectrum in stomach of rats with hypergastrinemia was extended because of seeding of *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*. Also it was registered the increase of stomach contamination by *Staphylococcus aureus*. Concentration of these opportunistic pathogenic bacteriums reached high level ( $10^4$ - $10^5$  CFU/g). Obtained data are testified to lowering of bacterial resistance of gastric mucosa in rats with hypoacidity during 28 days and possibility of microflora transit from colon to stomach by ascending tract. In colon essential disbalance between contamination index by obligatory and facultative microflora was also formed. Morphological investigations illustrated the development of metaplasia in stomach and hyperplasia in colon. In results important changes in gastric acid secretion were observed. Also in the 28 days of OM injection in colon absorption of water and  $\text{Na}^+$  were decreased accordingly by 44,07% and 53,31%. Cumulative flow of  $\text{K}^+$  was decreased by 217,39% in comparison to control. At the same time  $\text{Cl}^-$  absorption in the colon was no different from control. The injection to the rats multiprobiotic "Symbiter<sup>®</sup>" simultaneously with OM during 28 days protected stomach and colon from dysbacteriosis formation and morphological changes. Gastric acid secretion is become normal. The use "Symbiter<sup>®</sup>" simultaneously with OM evoked statistically significant increase of  $\text{Na}^+$  absorption by 236,29% and  $\text{Cl}^-$  absorption by 68,4 %. Also in this group cumulative flow of  $\text{K}^+$  was increased by 252,17% in comparison to the rats which were treated only by OM. At that transport of water was the same in these groups. Similar influence on structural and functional state of stomach and colon had another multiprobiotic "Apibact<sup>®</sup>". It was concluded that the use of multiprobiotics "Symbiter<sup>®</sup>" and "Apibact<sup>®</sup>" are advisable for patients with long-term use of antisecretory agents, hypoacidity and achylia for prevention of morphological and functional changes in stomach and colon and also for recovery of normal net water and ions absorption in patients with hypergastrinemia of different genesis and for additional therapy in patients with disturbance of electrolytic balance.



## ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕВОГО ПРОТЕИНА SP-2 В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК РАКА ЭНДОМЕТРИЯ

Береснева<sup>1</sup> Ю.В., Ибрагимов<sup>1</sup> Ф.А., Абдувалиев<sup>2</sup> А.А., Гильдиева<sup>2</sup> М.С., Jin-Rong Zhou<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Республика Узбекистан  
e-mail: yuliana70@mail.ru

<sup>2</sup> Республиканский онкологический научный центр, Ташкент, Республика Узбекистан

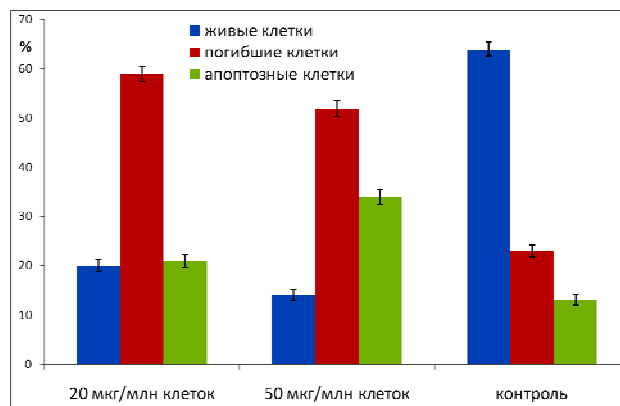
<sup>3</sup> Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA.

В последние годы появились многочисленные исследования, свидетельствующие о роли растительных белков в профилактике онкологических заболеваний, отмечают их тормозящее воздействие как на формирование опухолей, так и на их рост и метастазирование [1-3]. Полагают, что биотерапия будет одним из основных элементов в программах лечения злокачественных новообразований в XXI веке. Это вызвано тем, что биологические препараты являются продуктами жизнедеятельности нормальных клеток. Поэтому, они, существенным образом влияя на дифференцировку и поведение клеток, в том числе и опухолевых, не оказывают токсического действия на другие клетки, органы и системы, как действуют химиотерапевтические препараты.

Целью настоящего исследования явилось получение протеина sp-2 из шрота сои, обладающего противоопухолевым действием.

Для определения цитотоксической активности соевого протеина sp-2 в отношении клеток рака эндометрия нами была использована схема постановки эксперимента, позволяющая определить антипролиферативные эффекты протеина на разных стадиях злокачественной трансформации раковых клеток. Мы использовали 3 образца опухолевой ткани, в которых прослеживалась постепенная злокачественная трансформация клеток эндометрия. В первом образце наблюдалось предраковое состояние ткани эндометрия, пациентку оперировали с диагнозом миома матки. Во втором образце злокачественная трансформация ткани достигла I стадии, пациентку оперировали с диагнозом рак эндометрия. В третьем образце злокачественная трансформация ткани эндометрия достигла II стадии и сопровождалось прорастанием *in situ* в подлежащие эпителиальному слою клеток ткани, пациентку оперировали с диагнозом рак эндометрия II стадии.

Опухолевые клетки, полученные из операционного материала, вносили в лунки полистиролового планшета, куда после образования клеточного слоя средней плотности добавляли соевый протеин sp-2 в дозах 20 мкг/млн клеток (группа I) и 50 мкг/млн клеток (группа II), контролем служили клетки эндометрия без воздействия протеином sp-2 (группа III), время инкубации клеток с протеином составило 90 мин. Результаты цитотоксической активности протеина sp-2 в отношении клеток эндометрия приведены на рисунке.



Цитотоксическая активность протеина sp-2 в отношении клеток рака эндометрия (операционный материал пациентки с диагнозом рак эндометрия, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>).

Соевый протеин sp-2 в дозах 20 мкг/млн клеток и 50 мкг/млн клеток вызывает гибель значительного количества клеток эндометрия (>50%) на разных стадиях их злокачественной трансформации. В тоже время, при воздействии протеином на клетки рака эндометрия I и II стадий значительно повышается количество апоптотных раковых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке УНТЦ по проекту №3501.

### Литература:

1. M. MESSINA, O. KUCUK, J.W. LAMPE: J. AOAC Int. 2006. V. 89(4). P.1121-1134.
2. T.Y.Lau, L.K.Leung: Br. J. Nutr. 2006. V. 96(1). P.169-176.
3. B.J.Trock, L.Hilakivi-Clarke, R.Clarke: J. Natl. Cancer Inst. 2006. V. 98(7). P. 430-431.



### CYTOTOXIC ACTIVITY OF SP-2 SOY-BEAN PROTEIN ON ENDOMETRIUM CANCER CELLS

Beresneva<sup>1</sup> Yu.V., Ibragimov<sup>1</sup> F.A., Abduvaliev<sup>2</sup> A.A., Gildieva<sup>2</sup> M.S., Jin-Rong Zhou<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan  
e-mail: yuliana70@mail.ru

<sup>2</sup> National Cancer Research Center, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan. Tashkent, Uzbekistan

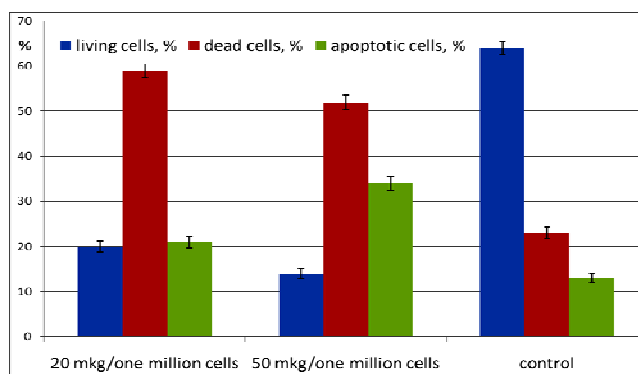
<sup>3</sup> Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA.

In recent years a number of studies have shown the role of plant proteins in cancer prevention; they were observed to have inhibitory effect both at formation of tumors and growth and metastatic of neoplasms [1-3]. It is believed that biotherapy will become a key element in the treatment of malignant neoplasms in the XXI century. The reason is in biological drugs being the products of normal cells. Therefore having a significant influence on differentiation and behavior of cells, including cancer cells, they do not have any toxic effect on other cells, organs and systems, as synthetic chemotherapeutic drugs do.

The purpose of the present research was protein reception sp-2 from soybean cake, possessing antineoplastic action.

For definition of cytotoxic activity of sp-2 soy protein on endometrium cancer cells we used the scheme of experiment, allowing determining antiproliferative effects of the protein at different stages of malignant transformation of cancer cells. We used 3 samples of a tumor tissue which had gradual malignant transformation of endometrium cells. The first sample had precancer condition of endometrium tissue; the patient was operated with the hysteromyoma diagnosis. In the second sample malignant transformation of tissue reached stage I; the patient was operated with the diagnosis of endometrium carcinoma. In the third sample malignant transformation of endometrium tissue reached stage II and was accompanied by in situ invasion into epithelial layer cells tissue; the patient was operated with the diagnosis of II stage of endometrium carcinoma.

The tumor cells received from operational material, were placed in the wells of polystyrene tablet, where after formation of a cellular layer of average density sp-2 soy protein was added in a doze of 20 mkg/mln cells (group I) and 50 mkg/mln cells (group II). The control group consisted of endometrium cells without influence by sp-2 protein (group III). Incubation time of the cells with protein was 90 minutes. Results of cytotoxic activity of sp-2 protein on endometrium cells are represented on figure.



Cytotoxic activity of sp-2 protein on endometrium cells (operational material from the patient with the diagnosis of endometrium carcinoma, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>).

Sp-2 soy protein in dozes of 20 mkg/mln cells and 50 mkg/mln cells causes destruction of a significant quantity of endometrium cells (> 50%) at different stages of their malignant transformation. At the same time, at influence of the protein on endometrium carcinoma cells of stage I and II the quantity of apoptotic cancer cells considerably increases.

Work is executed at financial support STCU on the project №3501.

#### References:

1. M. MESSINA, O. KUCUK, J.W. LAMPE: J. AOAC Int. 2006. V. 89(4). P.1121-1134.
2. T.Y. LAU, L.K. LEUNG: Br. J. Nutr. 2006. V. 96(1). P.169-176.
3. B.J. TROCK, L. HILAKIVI-CLARKE, R. CLARKE: J. Natl. Cancer Inst. 2006. V. 98(7). P. 430-431.



## СИНТЕЗ И АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА

*Блажеевский Н.Е., Горбунова Н.И.*

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина  
e-mail: Kabachny@ukrfa.kharkov.ua; Blazejowski@ukr.net

В настоящее время активно исследуются различные аспекты биологического действия оксида азота, уникальной молекулы, выполняющей роль физиологического мессенджера, а в некоторых случаях цитотоксической эффекторной молекулы. При нарушении выработки оксида азота в клетках в терапевтических целях применяют доноры NO (нитросорбит, эринит, нитроглицерин, нитропруссид натрия, известные в фармакологии как нитраты, нитриты, к которым относится амилнитрит). Эти вещества с участием эндогенных окислительно-восстановительных систем способны генерировать NO, который, реагируя с тиолсодержащими соединениями (альбумин, цистеин, глутатион), приводит к образованию S-нитрозотиолов [1]. Известно, что NO действует как отрицательная обратная система, регулирующая агрегацию тромбоцитов. Роль тромбоцитарной активации в патогенезе различных сосудистых тромботических заболеваний человека и данные о том, что NO-опосредуемые эффекты снижены при гипертензии, диабете и атеросклерозе, подтверждают, что введение доноров NO этим больным может быть успешным [2]. Однако применение органических нитратов неэффективно из-за толерантности и явления «рикошета», которые были описаны еще в 20-х годах. Кроме того, важнейшее побочное действие нитратов напрямую связано с артериальным сосудорасширяющим действием. В связи с этим идеальными донорами NO являются S-нитрозотиолы [3].

Цель настоящей работы - синтез, хроматографический анализ и экспериментальное исследование антикоагулянтной активности S-нитрозоглутатиона. Синтез S-нитрозоглутатиона осуществляли по реакции S-нитрозилирования тиолат-аниона ионом нитрозония в кислой среде [3]. Для этого в ледяной бане смешивали эквимолярные растворы глутатиона восстановленного и нитрита натрия (10мМ) в 1,0 н HCl. Смесь инкубировали при 4°C в темноте в течение 40 мин и нейтрализовали раствором едкого натра. Кристаллический S-нитрозоглутатион получали осаждением ацетоном на холоду. Высушенные кристаллы использовали для приготовления рабочих растворов. Для повышения устойчивости растворов в качестве растворителя использовали фосфатный буферный раствор (pH7,0). Чистоту полученного продукта контролировали методом ВЭЖХ. Для хроматографического анализа использовали хроматограф МилиХром А-02 (Новосибирск, АТ «Еконова»); колонка 2x75 мм с сорбентом Nucleosil 100-5 с привитой фазой C18 и элюировали в градиентном режиме: элюент А – метанол- фосфатный буфер (pH2,2) + 1 мМ октил-сульфоновой кислоты в соотношении 10:90; элюент Б – метанол-фосфатный буфер (pH2,2) + 1 мМ октилсульфоновой кислоты в соотношении 5:95. Скорость элюирования – 150 мкл/мин, температура колонки - 45°C, давление – 4,5 МПа. Время удерживания S-нитрозоглутатиона – 8,8 мин. Анализ образцов проводили при помощи спектрофотометрического детектора при длине волны 338 нм. Концентрацию растворов определяли, используя коэффициент молярной экстинкции S-нитрозоглутатиона, равный 940 моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Все реагенты, использованные в эксперименте, были особо чистые (ОСЧ) и химически чистые (ХЧ). Для биологических экспериментов использовали растворы с конечной концентрацией S-нитрозоглутатиона от 10<sup>-4</sup> до 10<sup>-8</sup> М. Обогащенная тромбоцитами плазма была получена методом дифференциального центрифугирования цельной крови здоровых доноров (n=7) при 320g в течение 2 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму инкубировали с растворами S-нитрозоглутатиона при 37°C в течение 30 мин, после чего исследовали индуцируемую АДФ (10<sup>-4</sup> М) агрегацию тромбоцитов. Препаратом сравнения служил нитроглицерин («Нитро», Orion Pharma, Финляндия) в диапазоне концентраций от 10<sup>-2</sup> до 10<sup>-6</sup> М. Содержание тринитроглицерина в препарате контролировали кинетическим методом с использованием в качестве индикаторной реакцию окисления пирогаллола А пероксидом водорода.

В ходе исследования установлено ингибирование агрегации тромбоцитов при действии S-нитрозоглутатиона. При изучении зависимости агрегации тромбоцитов от концентрации исследуемых веществ обнаружены эффективные концентрации, при которых агрегация тромбоцитов снижается на 50%: для S-нитрозоглутатиона ID<sub>50</sub>= 1·10<sup>-6</sup> М, для нитроглицерина - ID<sub>50</sub>= 1,46·10<sup>-3</sup> М. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что S-нитрозоглутатион является эффективным донором NO, обладающим ярко выраженным антикоагулянтным действием и явными преимуществами в сравнение с нитроглицерином.

### **Литература:**

1. Ignarro L.J., Lippton H., Edwards J.H. et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates // J. Pharmacol. Exp. Ther.- 1981. -218.-P.739-749.
2. A.J. de Belder, R.MacAllister, M.W.Radomski et al. Effect of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation // Cardiovascular Research.-1994.-28.-P.691-694.
3. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // Биохимия.-1998.-63(7).-С.924-938.
4. Stamler J.S., Loscalzo J. Capillary zone electroforetic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives // Anal. Chem.-1992.-64(7).-P.779-785.



## SYNTHESIS AND ANTICOAGULATION S-NITROSOGLUTATHIONE ACTIVITY

*Blazhevsky M. Ye., Gorbunova N. I.*

National Pharmacy University, Kharkov, Ukraine

e-mail: Kabachny@ukrfa.kharkov.ua; Blazejowski@ukr.net

At present time different aspects of nitrogen oxide biological action, unique molecule, which was physiological messenger role, and in some case cytotoxic effector molecule are being studied. In case of nitrogen oxide production damage in cells donors NO (nitrosorbit, erinit, nitroglycerin, sodium nitroprussid know is in the pharmacology as nitrates, nitrites, to which amilnitrit refer) are used with therapeutic aim purpose. These substances with endogenous oxidative-reductive systems are able to regenerate NO, which reacting with thiol-containing compounds (albumin, cystein, glutathion) leads to S-nitrosothiols formation [1]. It is known, NO pathway acts as a negative feedback system to regulate platelet aggregation. The role of platelet activation in the pathogenesis of a variety of human vascular thrombotic diseases and the findings that NO mediated effects are diminished in hypertension, diabetes, and atherosclerosis suggest that supplementation of NO to these patients may be of benefit [2]. However, organic nitrates usage is not effective because of tolerance and "ricoshets" appearance, which were described in the 20-th. Besides, the most important side effect of nitrates is directly connected with arterial vascular enlarging action. Taking it into account ideal NO donors are S-nitrosothiols [3].

The aim of the present work is synthesis, chromatographic analysis and experimental investigation of anticoagulating S-nitrosogluthathione activity. S-nitrosogluthathione synthesis has been carried out by S-nitrosation thiolate anion nitrosonium ion in acidic media reaction [4]. For this equimolar reduced glutathione solutions and sodium nitrite (10 mM) were mixed on the cool bath in 1.0 M HCl. The mixture was incubated at 4°C in the dark during 40 min and neutralized with the sodium hydroxide solution. Crystalline S-nitrosogluthathione was obtained by the acetone precipitation in the cold. The dried crystals were used for working solutions preparations. The solutions resistance phosphate buffer solution (pH7.0) was used as a solvent. The purity of the obtained product was controlled by the HPLC method. For chromatographic analysis "MiliChrom A-02 (Novosibirsk, "Econova") with 2x75 mm column with Nucleosil 100-5 C18 sorbent was used and eluted in the gradient regime: eluent A – methanol-phosphate buffer (pH2.2) + 1 mM octylsulphonic acid in 10:90 ratio; eluent B – methanol-phosphate buffer (pH2.2) + 1 mM octylsulphonic acid in 5:95 ratio were used for the analysis. The elution rate is 150 ml/min, column temperature 45°C, pressure – 4.5 mPa. The S-nitrosogluthathione retention time is 8.8 min. The samples analysis was carried out by spectrophotometric detector under 338 nm wavelength. The solution concentration was determined using molar extinction coefficient of S-nitrosogluthathione equal to 940 mole<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. All reagents used in the experiment were especially pure and chemically clear. For biological experiments solution with final S-nitrosogluthathione concentration 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-8</sup> M were used. The platelet rich plasma was obtained by centrifuging method of the healthy donors blood (n=7) at 320g during 2 min. The obtained platelet rich plasma was incubated with S-nitrosogluthathione solution at 37°C during 30 min, then ADF-induced aggregation (10<sup>-4</sup> M) was studied. Nitroglycerine ("Nitro", Orion Pharma, Finland) was taken as a reference preparation in the 10<sup>-2</sup> – 10<sup>-6</sup> M concentration range. Trinitroglycerine content in the preparation was controlled by kinetic method using pirogallole A hydrogen peroxide as indicator oxidation reaction.

The platelets inhibiting aggregation under the S-nitrosogluthathione action has been found in the investigation. Effective concentrations at which platelets aggregation is 50% reduced for S-nitrosogluthathione ID<sub>50</sub>=1·10<sup>-6</sup> M, for nitroglycerine ID<sub>50</sub>=1,46·10<sup>-3</sup> M have been found during platelets aggregation dependence upon the tested substances concentration.

The experiment results show, that S-nitrosogluthathione is effective NO donor, which has distinctive anticoagulant action is more preferable in comparison with nitroglycerine.

### References:

1. Ignarro L.J., Lippton H., Edwards J.H. et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates // J. Pharmacol. Exp. Ther.- 1981. -218.-P.739-749
2. A.J. de Belder, R.MacAllister, M.W.Radomski et al. Effect of S-nitroso-gluthathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation // Cardiovascular Research.-1994.-28.-P.691-694.
3. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // Биохимия.-1998.-63(7).-С.924-938.
4. Stamler J.S., Loscalzo J. Capillary zone electroforetic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives // Anal. Chem.-1992.-64(7).-P.779-785.



**ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ 2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МИОЗИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА**

*Бобык В., Козлов А., Харченко В., Морозова Л., Рябенко Д. \*, Погребной П. \*\*, Дубей И., Сидорик Л.*

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

\*Национальный научный центр "Институт кардиологии им. акад. М. Д. Стражеско" АМН Украины, Киев, Украина

\*\* Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: sidorik@imbg.org.ua

Известно, что действие интерферона опосредуется через продукты 2'-5'-олигоаденилат-синтетазы – семейство низкомолекулярных 2'-5'-олигоаденилатов, обладающих противовирусной и антипролиферативной активностью.

Нами исследовано терапевтическое воздействие различных доз модифицированного (2'-5')-триаденилата (2'-5'-ОА), содержащего эпоксигруппу на 3'-конце, на развитие экспериментальной патологии, в разработанной нами уникальной модели миозин-индуцированного аутоиммунного поражения миокарда мышей линии BALB/c, подобного дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) человека.

Уровень поражения миокарда и степень воздействия различных доз 2'-5'-ОА тестировали по изменению уровня специфических антимиозиновых аутоантител, уровню АТФ-азной активности кардиального миозина и по гистоморфологическим изменениям миокарда.

Показано, что внутривенное введение 2'-5'-ОА оказывало дозозависимое благоприятное иммуномодулирующее и кардиопротекторное воздействие, особенно при применении малой дозы препарата (5 мкг/кг массы) и сохранялось на протяжении 52 суток после введения.

Полученные данные служат теоретической основой для разработки нового поколения кардиопротекторных препаратов с иммуномодулирующим эффектом, эффективных при терапии различных форм сердечной недостаточности.



**THERAPEUTIC EFFECT OF 2'-5'-OLIGOADENYLATES TREATMENT AT EXPERIMENTAL MYOSIN-INDUCED HEART INJURY**

*Bobyk V., Kozlov A., Kharchenko V., Morozova L., Ryabenko D.\* , Pogrebnoy P.\*\*,  
Dubey I., Sidorik L.*

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*National Scientific Center "Strazhesko Institute of Cardiology" MAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*\*Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: sidorik@imbg.org.ua

We examined the therapeutic effects of various doses of 2'-5'- oligoadenilates (5 and 50 mkg/kg of weight) on the development of experimental autoimmune myosin-induced myocardium damage like human dilated cardiomyopathy.

The degree of heart injury was identified in the study of specific autoantibodies level, ATPase activity of cardiac myosin and hystomorphologic changes in cardiac tissue.

It was revealed that the drug renders a dose-dependent favourable immunomodulative and cardioprotective activities.

The more expressed and prompt favourable effect is marked at the introduction of 2'-5'-oligoadenylates in a dose of 5 mkg/kg of weight.

The data obtained could serve as a theoretical basis for creation of drugs with cardioprotective and immunomodulative properties for heart failure therapy.





## АМНИОН КУРИНОГО ЭМБРИОНА КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ

Бойко О.В.

Институт биологии развития им.Н.К.Кольцова РАН, Москва, Россия  
e-mail: boikolg@gmail.com

В настоящее время плодные оболочки рассматривают как мощный адаптационный аппарат, обеспечивающий гомеостаз плода и наделенный способностью связывать, синтезировать и высвобождать физиологически активные вещества. Как тест-объект амнион куриного эмбриона обладает несомненными достоинствами для экспериментальной работы в силу детальной изученности развития зародышей кур и легкости получения датированного эмбрионального материала. Ткани провизорных органов развиваются из тех же зачатков, что и дефинитивные ткани, но дифференцируются значительно быстрее эмбриональных зачатков зародыша, что обеспечивает их раннюю специализацию, причем амнион обладает большей устойчивостью к различным повреждающим воздействиям по сравнению с самим зародышем. Период от закладки до начала дегенеративных процессов в амниотической мембране составляет менее двух недель. Гистологически амнион представляет собой двуслойную структуру из двух типов клеток - эпителиальных и гладкомышечных, разделенных базальной мембраной. В амниотической ткани отсутствуют нервные элементы, что показано как для зародышей птиц, так и млекопитающих. При этом амнион куриного эмбриона обладает чувствительностью к широкому спектру биологически активных веществ, в том числе к нейротрансмиттерам, действие которых опосредуется специфическими рецепторами, аналогичными по своим характеристикам рецепторам иннервированных тканей. В амнионе выявлено более 10 типов различных рецепторов:  $M_3$ -холинорецепторы, альфа<sub>2</sub>-, бета<sub>1</sub>-адренорецепторы, рецепторы серотонина, гистамина, уротензина II, нейротензина, вазоактивного интестинального пептида и др. Рецепторы большинства гладких мышц исследуют в присутствии нервных терминалей. Отсутствие иннервации в амниотической ткани позволяет анализировать прямые воздействия на рецепторы, участвующие в регуляции сократительных реакций, исключая пресинаптические влияния.

Нами проведена фармакологическая идентификация мускариновых холинергических и бета-адренергических рецепторов амниона куриного эмбриона путем тестирования действия специфических агонистов и ингибиторного эффекта подтип-селективных антагонистов. Дана количественная характеристика этих рецепторов с анализом участия рецепторных систем в регуляции частоты сокращений и тонуса амниона. Показано, что угнетающее действие адренергических агонистов на сократительную активность амниона опосредуется бета<sub>1</sub>-адренорецепторами и пострецепторно осуществляется через аденилатциклазную систему. Сократительная активность амниона, вызванная холинергическими агонистами, опосредуется популяцией  $M_3$ -холинорецепторов и стимуляцией фосфоинозитидной системы для передачи сигнала.

Чувствительность амниона к карбахолу и ацетилхолину достоверно не отличается, величины  $-\log EC_{50}$  составляют  $4.88 \pm 0.12$  и  $5.05 \pm 0.07$ , соответственно. Антагонист мускариновых рецепторов атропин эффективно блокирует холинергическую реакцию ( $-\log IC_{50} = 8.57$ ). Для специфических антагонистов порядок холинолитической активности в отношении реакции на КБХ составил следующую последовательность: 4-DAMP ( $8.29 \pm 0.09$ ) > тропикамид ( $6.97 \pm 0.05$ ) > пирензепин ( $5.85 \pm 0.09$ ) > метоктрамин ( $5.63 \pm 0.08$ ). Полученные кинетические параметры близко совпадают с установленными для  $M_3$ -холинорецепторов в гладких мышцах изолированного мочевого пузыря мыши: 4-DAMP 7.6–8.4, пирензепин 6.1–6.4, метоктрамин 5.6–6.1 (Choppin, 2002)

Чувствительность бета-адренорецепторов амниона к норадреналину составляла  $7.11 \pm 0.03$ . По данным разных авторов, величина  $-\log IC_{50}$  ингибитора бета-адренорецепторов пропранолола для иннервированных тканей находится в интервале 8.0 - 8.8. В амнионе куриного эмбриона она составляла 8.3, а для специфических бета-антагонистов метопролола и бутоксамина - 7.0 и 5.6. Фармакологическая специфичность метопролола как бета<sub>1</sub>-антагониста и бутоксамина как бета<sub>2</sub>-антагониста установлена при исследовании их способности тормозить связывание [<sup>125</sup>I]-иодгидроксibenзилпиндолола мембранами сердца и легкого, а также их действия на активность аденилатциклазы.

Таким образом, амнион куриного эмбриона является перспективным объектом для исследования функциональной активности регуляторных рецепторных систем и ее модуляции биологически активными веществами в условиях отсутствия иннервации.

*Работа поддержана РФФИ, грант № 09-04-00111а*



## **CHICK AMNION AS TEST OBJECT TO STUDY A DIRECT ACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON REGULATORY RECEPTOR SYSTEMS**

*Boiko O.V.*

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
e-mail: boikolg@gmail.com

Today extra-embryonic membranes are considered to be a potent adaptive system assuring fetal homeostasis and able to bind, synthesize and release physiologically active substances. Chick amnion as test object offers a certain advantage for experimental research due to the detailed elaboration of chick embryo development and easiness of getting dated embryonic stages. Tissues of provisional organs were found to originate from the same germs as definitive ones but differentiate significantly faster than embryonic germs to provide early specialization, besides being more resistive to different damaging factors in comparison with embryo itself. The time interval from amniotic membrane anlage to the beginning of degenerative process is less than two weeks. Histologically amnion represents a bilayer structure which consists of two cell types - epithelial and smooth muscle separated by basement membrane. Amniotic tissue is devoid of nerve elements as it was shown for both avian embryo and mammalian fetus. However chick amnion exhibits responsiveness to the wide spectrum of biologically active substances, including neurotransmitters, whose action is mediated by specific receptors similar in basic characteristics to the receptors of innervated tissues. Amnion expresses more than 10 different types of receptors: muscarinic  $M_3$  receptors,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -adrenoceptors, those of 5-hydroxytryptamine, histamine, urotensin II, neurotensin, vasoactive intestinal peptide and others. Receptors of smooth muscles in most cases are studied in the presence of nerve terminals. Lack of innervation in amniotic tissue allows us analyse a direct action on receptors, participating in the regulation of contractile responses, excluding presynaptic effects.

We performed the pharmacological identification of muscarinic cholinergic receptors and beta-adrenergic receptors in chick amnion by testing of specific agonist action and inhibitory effect of selective antagonists. Quantitative characteristics of the receptors were determined and receptor systems participating in regulation of the tone and frequency of amnion contractions were analyzed. It was shown that inhibitory action of adrenergic agonists on contractile activity in amnion is mediated by  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation and postreceptor signal is realized via adenylate cyclase system. Contractile activity of the amnion induced by cholinergic agonists is mediated by a population of  $M_3$ -cholinergic receptors and stimulation of phosphoinositide system for the signal transmission.

The sensitivity of amnion to carbachol and acetylcholine differs insignificantly:  $-\log EC_{50}$  values were  $4.88 \pm 0.12$  и  $5.05 \pm 0.07$ , respectively. Atropine, an antagonist of muscarinic receptors, blocked cholinergic responses efficiently ( $-\log IC_{50} = 8.57$ ). The order of cholinolytic activity of selective antagonists in the case of carbachol response was 4-DAMP ( $8.29 \pm 0.09$ ) > tropicamide ( $6.97 \pm 0.05$ ) > pirenzepine ( $5.85 \pm 0.09$ ) > methoctramine ( $5.63 \pm 0.08$ ). The kinetic parameters obtained are very close to the values determined in the smooth muscles of the mouse isolated urinary bladder, where they were 7.6-8.4 for 4-DAMP, 6.1-6.4 for pirenzepine, and 5.6-6.1 for methoctramine (Choppin, 2002)

The responsivity of beta-adrenoceptors to noradrenaline in amnion was shown to be  $7.11 \pm 0.03$ . According to the data from earlier studies, the  $-\log IC_{50}$  value of beta-adrenoceptor blocker propranolol for innervated tissues was found to be in the range from 8.0 to 8.8. In the chick amnion it was estimated as 8.3 and for specific beta<sub>1</sub>-antagonists metoprolol and butoxamine - 7.0 and 5.6. Pharmacological selectivity of metoprolol as specific beta<sub>1</sub>-antagonist and butoxamine as beta<sub>2</sub>-antagonist was shown by testing for their ability to inhibit the binding of [<sup>125</sup>I]-iodohydroxybenzylpindilol by membranes of heart and lung and for their effect on the activity of adenylate cyclase.

Thus, chick amnion is of particular interest for the studies of functional activity of regulatory receptor systems and its modulation by biologically active substances in the absence of innervation.

*The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no 09-04-00111a.*



## ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА Д5 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ В ОРГАНИЗМ КРЫСЫ

Бондаренко О.Б.

Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, Харьков, Украина  
e-mail: tdyubko@mail.ru

С каждым годом возрастает интерес к применению в практической медицине и ветеринарии биологически активных препаратов из натурального сырья животного происхождения, которые, в отличие от синтетических препаратов, не являются для организма чужеродными и не вызывают аллергических реакций. Для повышения селективности и биологической эффективности действия препаратов проводятся поиски новых лекарственных форм. Используя компоновки различных препаратов, удается получать высокоактивные биостимуляторы, которые можно применять не только внутривенно или внутривенно, но и подкожно. В работе исследовали влияние нового биологически активного препарата Д5, содержащего компоненты термического расщепления тканей животных, на физиологические и биохимические показатели организма крысы, а также оценивали его противовоспалительную и анальгезирующую активность при различных способах введения. Благодаря отсутствию веществ белковой природы, которые могли бы подвергаться протеолитическому расщеплению, препарат Д5 не обладает ни гистологической, ни видовой специфичностью.

Исследования проведены на 56 белых крысах линии Wistar, массой 200-250 г. Анализировали показатели ЭКГ, клиническую картину крови и мочи, биохимические показатели работы печени и почек. Эксперименты проводили в соответствии с Общими принципами экспериментов на животных. Одобрены 1 Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласованы с положениями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985). ЭКГ регистрировали на компьютерном электрокардиографе, входящем в состав программного комплекса «Полиспектр» фирмы «НейроСофт» (Россия). Результаты обрабатывали статистически с использованием компьютерного пакета программ „Statistica, v. 5.5”. Острое воспаление моделировали субплантарным введением 1 %-го раствора каррагинина в дозе 0,08 мл. Препарат Д5 вводили подкожно за 20 мин до введения каррагинина, внутривенно – за 30 мин до введения каррагинина. Для определения анальгезирующей активности препаратов крысам внутривенно вводили 0,6 % раствор уксусной кислоты из расчета 10 мл на 10 г массы тела животного. Спектры флуоресценции белков сыворотки крови регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) при возбуждении 280 нм. Уровень гемолиза эритроцитов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer) при 575 нм.

Показано, что при подкожном введении в дозе 0,5 мл/кг в течение 14 суток Д5 не оказывает отрицательного влияния на внешний вид внутренних органов, а также функциональное состояние сердечной мышцы, печени и почек крысы. Также не обнаружено аллергических реакций (покраснения, почесывания) в месте инъекции препарата. Препарат Д5 не влияет на показатели сердечной деятельности крыс. Имел место лишь статистически недостоверный сосудорасширяющий эффект. Подкожное введение крысам Д5 не влияло на диурез и удельную плотность мочи, которые находились в пределах физиологической нормы. Препарат также не влиял значительно на функцию почек, о которой судили по уровню креатинина в крови и моче. Длительное введение препарата Д5 не влияло на содержание и активность аминотрансфераз (аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы) в сыворотке крови, что свидетельствует об отсутствии у Д5 гепатотоксического эффекта.

Препарат Д5 не изменял основные клинические показатели периферической крови. Содержание в эритроцитах гемоглобина, показатель СОЭ, а также количество эритроцитов и лейкоцитов в крови были в пределах нормы. Отмечалось лишь некоторое изменение лейкоцитарной формулы, выраженное в незначительном увеличении количества нейтрофилов после подкожного введения препарата. Оценка влияния Д5 на сохранность эритроцитов *in vitro* показала, что при объемном соотношении 1:1 при комнатной температуре (20 °С) он не оказывает гемолизирующего влияния на красные клетки крови. По данным собственной флуоресценции белков сыворотки крови и альбумин-специфичного флуоресцентного зонда K-35 обнаружено, что компоненты Д5 связываются с сывороточным альбумином крови.

Установлено, что препарат Д5 обладает противовоспалительным и анальгезирующим действием, которое зависит от дозы и способа его введения в организм. При подкожном введении Д5 оказывает умеренно выраженный противовоспалительный эффект на модели каррагининового отека, который зависит от дозы и способа его введения в организм. С увеличением дозы противовоспалительная активность препарата повышается. Внутривенное введение препарата оказывает сильно выраженное противовоспалительное действие, сопоставимое с действием нестероидных противовоспалительных средств. Препарат оказывает дозозависимый анальгезирующий эффект на уровне 55,8-63,3 %, наиболее выраженный при подкожном введении в отличие от перорального.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что продолжение работ по оптимизации лекарственных форм биологически активного препарата Д5 является перспективным. Препарат Д5 может быть использован в составе композиций, предназначенных для повышения защитных сил организма при различных патологических и стрессовых состояниях.



## **EVALUATION OF D5 PREPARATION BIOLOGICAL EFFICIENCY DURING DIFFERENT METHODS OF ITS ADMINISTRATION INTO RAT ORGANISM**

*Bondarenko O.B.*

Usikov Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine  
e-mail: [tdyubko@mail.ru](mailto:tdyubko@mail.ru)

Every year witness a growing interest in applying biologically active preparations from zoogenous stock materials in practical medicine and veterinary science. These substances, in contrast to synthetic preparations, are not recognized as alien by the organism, hence, they do not induce allergic responses. Thus, the search for new medical forms, which can increase selective ability and biological efficiency of these preparations, continues. Combinations of various preparations make it possible to compose highly active biological stimulants, which may be used not only intragastric or intravenously, but subcutaneously as well. The given research dealt with studying the action of a new biologically active preparation D5, which contained components of animal tissue thermolysis, on physiological and biochemical features of the rat organism. The anti-inflammatory and analgesic activities of a D5 preparation during different methods of its administration were studied. Due to the absence of albuminous substances, which may undergo proteolytic cleavage, a D5 preparation possessed neither histological nor trivial specificities.

White Wistar rats in the amount of 56 species with the body weights of 200-250 g were used in experiments. The ECG findings, blood clinical picture, urine, biochemical features of liver and kidney functioning were investigated. The anti-inflammatory and analgesic activities of the preparation were also studied. The experiments were conducted in accordance with the General Principles of Experiments on Animals, approved by the 1<sup>st</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2001), and coordinated with the regulations of the European Convention on Protection of Vertebrates, Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985). The ECG was registered with a computerized electrocardiograph, incorporated within a Polyspektr programmable complex, produced by a NeuroSoft company (Russia). The results thus obtained were processed statistically using a Statistica v.5.5<sup>o</sup> computerized program package. The acute inflammation was simulated by subplantar injection of 1%-carrageenin solution at a dose of 0.08 ml. A D5 preparation was injected subcutaneously in 20 min prior to administration of carrageenin and intragastrically – in 30 min prior to carrageenin administration. Evaluation of the analgesic activity of preparations involved intraperitoneal injections to rats of 0.6%-solution of acetic acid at the rate of 10 ml per 10 g of the animal body weight. Fluorescence spectra of blood serum proteins were registered with a Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian) at an excitation of 280 nm. The level of RBC hemolysis was evaluated with the help of a Lambda 35 spectrofluorometer (Perkin Elmer) at 575 nm.

Subcutaneous injection of a D5 preparation at a dose of 0.5 ml/kg during 15 days did not affect surface appearance of the inner organs and functional state of the cardiac muscle, liver and kidneys of rats. Allergic responses (rubor, scratching) were also not observed at the injection site. A D5 preparation did not affect the features of cardiac activity of rats. Only vasodilator response, though statistically insignificant, was evident. Subcutaneous injection of a D5 preparation did not affect diuresis and specific density of urine, which stayed within safe normal limits. The preparation did not influence kidney functioning as well, which was evaluated by the level of creatinine in blood and urine. Prolonged injection of a D5 preparation produced no effect on the amount and activity of transferases (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) in blood serum, which was indicative of the absence of a hepatotoxic action of a D5 preparation.

A D5 preparation did not alter basic clinical features of peripheral blood. The content of hemoglobin in RBC, erythrocyte sedimentation rate and the amount of RBC and leukocytes in blood were found to be safely within the normal limits. Slight alteration of the leukogram was observed, though, manifested by a minor increase in the amount of neutrophiles after subcutaneous injection of the preparation. Evaluation of the action of a D5 preparation on survival of RBC showed that in a 1:1 volume ratio at room temperature (20°C) it did not exercise a haemolysing action on red blood cells. The data on the intrinsic fluorescence of blood serum proteins and a K-35 albumin-specific fluorescent probe demonstrated that the D5 components joined and interlinked with the blood serum albumin.

A D5 preparation was found to possess the anti-inflammatory and analgesic actions, which depended on the dose and method of its administration into the organism. Subcutaneous injection of a D5 preparation produced a moderately manifested anti-inflammatory effect on a model of carrageenan quelling, which was dependent on the dose and method of its administration into the organism. A rise in the dosage increased the anti-inflammatory activity of the preparation. Intragastric administration of the preparation resulted in a strongly manifested anti-inflammatory action, comparable with the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The preparation exercised a dose-dependent analgesic influence at the level of 55.8-63.3%, which became stronger manifested after subcutaneous injection as compared with peroral administration.

On the whole, the results obtained make it possible to conclude that further studies and optimization of medicinal forms of a biologically active preparation D5 seem promising. A D5 preparation may be used as integral part of the compositions, designed for increasing body defenses under various pathological and stressful states.



## ГИДРОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ И КОРРЕКЦИЯ НЕХОЛЕСТАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

*Буко В.У., Лукивская О.Я.*

Институт фармакологии и биохимии Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь  
e-mail: buko@biochem.unibel.by; vu.buko@tut.by

Гидрофильные желчные кислоты, урсодезоксихолевая (УДХК) и её тауриновый конъюгат, тауроурсодезоксихолевая (ТУДХК) кислоты, традиционно используются для лечения холестатических поражений печени. УДХК улучшает биохимические показатели и стабилизирует мембраны печени у крыс с алкогольным (АСГ) и неалкогольным (НАСГ) стеатогепатитами. В то же время, клинический опыт использования УДХК для лечения АСГ и НАСГ у пациентов оказался малоуспешным, что объясняется использованием в клинике относительно низких доз препарата.

Нами исследовался дозозависимый гепатопротективный эффект УДХК (10-80 мг/кг) у крыс с НАСГ, вызванным скормливанием диеты, дефицитной по метионину и холину (МХДД). Защитный эффект УДХК возрастал с повышением дозы препарата. Только максимальная доза УДХК (80 мг/кг) полностью нормализовала биохимические показатели и гистологическую картину печени у крыс. Кроме того, УДХК обладала антиоксидантными свойствами и снижала содержание TNF $\alpha$  и эндогенного этанола в крови. ТУДХК также оказывала защитное действие у крыс с НАСГ, вызванным МХДД, снижая содержание триглицеридов и площадь суданофильного окрашивания в печени. Гомологи УДХК, нор-УДХК и бис-нор-УДХК, являются перспективными препаратами для предупреждения и лечения фиброза печени.

Мы оценили эффект УДХК в комбинации с перспективными гепатопротекторами, симвастатином, пентоксифиллином и безафибратом, у крыс, кормленных МХДД. Сама УДХК и все комбинации нормализовали активность АСТ и АЛТ сыворотки крови, снижали содержание триглицеридов печени. Только комбинация УДХК с безафибратом была более эффективной, чем монопрепарат УДХК. Применение УДХК у крыс с АСГ значительно улучшает морфологию печени, снижает активность маркерных ферментов сыворотки крови и нормализует все показатели, характеризующие окислительный стресс.

Можно заключить, что при нехолестатических поражениях печени гепатопротективный эффект УДХК обусловлен её антиоксидантными свойствами, которые позволяют УДХК контролировать метаболические процессы через изменение свойств мембран печени и мембранных белков. В печени животных с НАСГ и АСГ, УДХК стабилизирует микросомальные, митохондриальные и плазматические мембраны, нормализует содержание и активность цитохрома P-450 2E1 в микросомах печени, процессы митохондриального окисления и окислительного фосфорилирования в печени. Мы считаем, что УДХК в дозировках, превышающих рутинные дозы, используемые в клинике для лечения стеатогепатитов (13-15 мг/кг), а также новые производные УДХК, являются перспективными средствами для лечения АСГ и НАСГ.

### **Литература:**

1. Lukivskaya O., Maskevich A., Buko V. Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver. *Alcohol*, 2001; 25: 99-105
2. Буко В.У., Лукивская О.Я., Хоха А.М. Метаболические последствия алкогольной интоксикации. Минск, Беларуская наука, 2005, 207 С.
3. Lukivskaya O., Zavodnik L., Knas M., Buko V. Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis. *Adv. Med. Sci.*, 2006; 51: 9-14
4. Lukivskaya O., Patsenker E., Buko V.U. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: Link with oxidative stress. *Life Sci.*; 2007; 80: 2397-2402
5. Dudzik D., Knas M., Borzym-Kluczyk M., Lukivskaya O, Buko V. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) – patogenesis, diagnosis, treatment. *Medical Science Review.*, 2008; 8: 48-59



## HYDROPHYLIC BILE ACIDS AND CORRECTION OF NON-CHOLESTATIC LIVER DISEASES

*Buko V.U., Lukivskaya O.Ya.*

Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, Belarus  
e-mail: buko@biochem.unibel.by; vu.buko@tut.by

Hydrophilic fatty acids, ursodeoxycholic acid (UDCA) and its taurine conjugate, tauro-ursodeoxycholic acid (TUDCA), are traditionally used to treat cholestatic liver diseases. UDCA improves biochemical parameters and stabilizes liver membranes in rat ASH and NASH. However, clinical experience on UDCA administration in patients with ASH and NASH is unsuccessful, which is partially explained by relatively low dosage of UDCA applied in the clinics.

We studied a dose-dependent hepatoprotective effect of UDCA (10-80 mg/kg b.w.) in rats with NASH induced by a choline- and methionine-deficient diet (CMDD). We found that hepatoprotection by UDCA increased as the UDCA dose raised. Only the maximal dose of UDCA (80 mg/kg) completely normalized biochemical parameters and liver histological picture in the rats. Additionally, we demonstrated that UDCA had antioxidant properties and decreased TNF production and blood concentration of endogenous ethanol. TUDCA also developed a protective effect in rats with NASH induced by CMDD, decreasing triglyceride content and the square of sudanophylic staining in the liver. Some homologues of UDCA, *nor*-UDCA and *bis-nor*-UDCA, as well as UDCA-N-acetylcysteine, and UDCA-L-cysteine, can be promising drugs in treatment of both ASH and NASH and prevention of liver fibrosis.

We tested UDCA in combination with the promising hepatoprotectors: simvastatin, pentoxifylline and bezafibrate in rats fed on CMDD. UDCA alone and all the combinations normalized serum AST and ALT activities and decreased liver triglycerides content. Only the combination with bezafibrate was a more effective hepatoprotector compared to UDCA alone. The UDCA treatment of rats with ASH significantly improved the liver morphology, decreased serum marker enzyme activities, liver triglyceride content and normalized all the indices of oxidative stress.

We can conclude that the hepatoprotective effect of UDCA stipulated by its antioxidant properties is indeed the factor enabling UDCA to control metabolic processes by changing the properties of liver membranes and membranous proteins. In these rats UDCA stabilized liver microsomal, mitochondrial and plasmatic membranes; normalized cytochrome P-450 2E1 content and activity in liver microsomes as well as mitochondrial oxidation and oxidative phosphorylation in the liver. We believe that UDCA in dosage higher than routinely used in the clinics to treat steatohepatitis (13-15 mg/kg) and the novel UDCA derivatives are medicine, having prospects for treatment of both ASH and NASH.

### References:

1. Lukivskaya O., Maskevich A., Buko V. Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver. *Alcohol*, 2001; 25: 99-105
2. Buko V.U., Lukivskaya O.Ya., Khokha A.M. Metabolic consequences of alcoholic intoxication. Belaruskaya Navuka Publishers, Minsk, 2005. 207 P. (monograph, in Russian)
3. Lukivskaya O., Zavodnik L., Knas M., Buko V. Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis. *Adv. Med. Sci.*, 2006; 51: 9-14
4. Lukivskaya O., Patsenker E., Buko V.U. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: Link with oxidative stress. *Life Sci.*; 2007; 80: 2397-2402
5. Dudzik D., Knas M., Borzym-Kluczyk M., Lukivskaya O, Buko V. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) – patogenesis, diagnosis, treatment. *Medical Science Review.*, 2008; 8: 48-59



**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ**

*Буланцева Е.А., Торопкина А.С., Проценко М.А., Кораблева Н.П.*

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва Россия  
e-mail: protsenko@inbi.ras.ru

К числу физиологически активных соединений нового поколения относятся регуляторы роста, позволяющие синхронизировать созревание плодов, снизить потери при сборе урожая и прогнозировать продолжительность хранения. Комплексный препарат этацид синтезирован на основе этиленвыделяющего регулятора роста и антисептика метацида, относящегося к классу гуанидиновых соединений и обладающего физиологическим эффектом. У плодов яблони и бананов одним из признаков созревания является увеличение выделения этилена. Этилен синтезируется в растениях в малых количествах. По мере роста и созревания количество этилена увеличивается и наступает массивное его выделение, включается система 2 биосинтеза этилена, называемая метиониновым циклом. Обработка этацидом плодов яблони сортов Антоновка и Мантуанское, бананов сортов Королевский и Кавендиш вызывала увеличение выделения этилена в зависимости от физиологического состояния плодов и снижала поражаемость плодов фитопатогенными микроорганизмами. Белковый ингибитор полигалактуроназы (БИПГ) участвует в формировании структуры клеточных стенок и консистенции тканей созревающих плодов, действуя на фермент полигалактуроназу фитопатогенных микроорганизмов и способствуя снижению поражаемости плодов при хранении. Активность БИПГ выявлена в плодах яблони и банана. Его содержание изменялось в зависимости от стадии зрелости плодов и коррелировало с интенсивностью выделения этилена в контроле и при действии этацида. Последнее свидетельствует о том, что БИПГ участвует в регуляции созревания плодов и устойчивости к фитопатогенам. В результате проведенных исследований выявлены параметры биотехнологии для применения этацида на плодах с целью повышения их лежкоспособности и прогнозирования длительности хранения.



**THE DEVELOPMENT OF APPLICATION BIOTECHNOLOGY OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE NEW GENERATION COMPOUNDS FOR THE INCREASING OF PLANT PRODUCTIVITY**

*Bulantseva E.A., Toropkina A.C., Protsenko M.A., Korableva N.P.*

A.N.Bach institute of biochemistry RAS, Moscow, Russia  
e-mail: [protsenko@inbi.ras.ru](mailto:protsenko@inbi.ras.ru)

The new generation of plant growth regulators are among the physiologically active compounds that allow to synchronize fruit ripening, decrease losses at harvest and forecast storage longevity. Complex compound ethacyde was synthesized on the base of ethylene releasing growth regulator and antiseptic methacid that belongs to the class of guanidine compounds and possess physiological effect. In banana and apple fruits, one of the sign of maturation is the increase of ethylene release. Ethylene is synthesized in plants in low quantity. At growth and aging, the synthesis of ethylene increases and massed release occurs. The system two of ethylene biosynthesis is turned on, that is named methionine cycle. The treatment with ethacyde of Antonovka and Mantuanskoe apple fruits, and Korolevski and Kavendish banana fruits leads to increase in ethylene release depending on physiological condition and decreased fruit infections during storage. Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) participates in the formation of cell wall structure and tissue consistence of ripening fruits. It also influence on polygalacturonase secreted by phytopathogenic microorganisms and improve the decrease of fruit infections during storage. PGIP activity was revealed in apple and banana fruits. Its amount varied depending on the stage of fruit maturity and correlated with the intensity of ethylene release in control fruits and at the action of ethacyde. Such correlation indicates the participation of PGIP in the regulation of fruit ripening and the control of resistance to pathogenic infections. The parameters of biotechnology for ethacyde application on fruits for increase their kipping quality and for the prediction of storage duration.





## АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПОХІДНИХ ТІОСУЛЬФОНАТІВ НА АКТИВНІСТЬ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФАЗИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА *IN VIVO*

Бура М.В., Генеза А.Б., Яремкевич О.С.<sup>\*</sup>, Мандзинець С.М., Лубенець В.І.<sup>\*</sup>, Новіков В.П.<sup>\*</sup>, Санагурський Д.І.

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна  
Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна  
e-mail: mcelevych@yahoo.com

Інтенсивний розвиток хімії сірковмісних органічних сполук зумовлений їх важливим науковим та практичним значенням. Серед них особливе місце займають естери тіосульфокислот загальної формули  $\text{RSO}_2\text{SR}'$ , що є аналогами природного антибіотику аліцину. Хоча ці сполуки відомі давно, але до цього часу вони є цікавими моделями для вивчення взаємозв'язку між структурою, реакційною здатністю і біологічною активністю. Тіосульфонати є активнішими сульфенілюючими реагентами, ніж дисульфідиди і разом з тим стабільнішими в порівнянні з сульфенгалогенідами. Завдяки високій реакційній здатності та широкому спектру біологічної дії тіосульфонати, а також похідні хіноліну, тіазолу, бензімідазолу, бензотіазолу та хінонів запропоновані як лікарські засоби, пестициди, консерванти фруктів та овочів, біоциди для захисту матеріалів від біопшкоджень. Враховуючи практичну цінність тіосульфонатів з одного боку і гетеро- та карбоциклічних фрагментів з іншого, поєднання їх в одній молекулі є, без сумніву, позитивним фактором, який дозволяє одержати сполуки з новим спектром біологічної дії. До теперішнього часу методи їх синтезу та властивості практично не досліджені, тому особливо актуальним є вивчення їхньої біологічної дії.

У результаті проведених досліджень *in vitro* встановлено, що дія досліджуваних тіосульфонатів метилтіосульфонату та параамінобензолтіосульфонату калію (у концентраціях  $10^{-3}$  та  $10^{-4}$  та  $10^{-4}$  та  $10^{-9}$  М відповідно) упродовж 6 годин розвитку зародків веде до виражених змін активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем. Для детальнішого розуміння механізмів впливу новосинтезованих тіосульфонатів проведено серію досліджень впливу параамінобензолтіосульфонату ( $10^{-4}$  та  $10^{-8}$  М) та толуентіосульфонату ( $10^{-3}$  та  $10^{-9}$  М) калію *in vivo* на активність АТФази зародків упродовж досліджуваних стадій синхронного поділу бластомерів.

Як встановлено у ході проведених досліджень вплив обидвох тіосульфонатів *in vivo* призводив до зниження, у більшості випадків достовірно, активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем. При дії високих концентрацій параамінобензолтіосульфонату ( $10^{-4}$  М) та толуентіосульфонату ( $10^{-3}$  М) на перших годинах розвитку зародків виявлено вагоме достовірне зниження активності мембранного ферменту в обидвох випадках. При дії першого тіосульфонату у зазначеній концентрації спостерігали зниження активності АТФази на  $78,4 \pm 10,4$  %, а за умов впливу толуентіосульфонату – на  $75,5 \pm 4,1$  % у порівнянні з контролем. Тобто, слід відмітити, що на першій годині розвитку інгібувальний ефект тіосульфонатів *in vivo* є однаковим. Упродовж наступної досліджуваної стадії (16 бластомерів) вплив тіосульфонатів у низьких концентраціях не призводив до значних змін активності АТФази зародків у порівнянні з першою стадією розвитку.

Упродовж 3,5 годин розвитку (стадія 64 бластомерів) спостерігали частково стрімке відновлення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків за умов впливу досліджуваних тіосульфонатів, ймовірно за рахунок включення захисних механізмів у зародків. За дії обидвох досліджуваних речовин спостерігали достовірне зниження активності ферменту зародків на стадії 64 бластомерів у середньому на  $46,1 \pm 1,9$  % у порівнянні зі значенням активності у контролі, яке становило  $15,3 \pm 0,8$  мкмоль  $\text{P}_i$ /год на 1 мг білка. На 8 та 10 поділах бластомерів відмічено стрімке достовірне зростання активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з першою годиною розвитку, тобто активність ферменту відновлювалася до значень в контролі. Слід зазначити, що за умов впливу тіосульфонатів у низьких концентраціях, зниження активності ферменту у порівнянні з контролем було достовірним лише на стадії 8 поділу, але не на останній досліджуваній стадії, що свідчить про протилежний ефект дії тіосульфонатів упродовж раннього розвитку зародків.

Таким чином можна зробити висновок, що тіосульфонати у високих концентраціях ( $10^{-3}$  та  $10^{-4}$  М) хоч і є модуляторами активності АТФази зародків, однак їх інгібувальний ефект упродовж раннього розвитку є вагомих, і ферментативна активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи не може повністю відновитися до початкового рівня. Ймовірно тіосульфонати можуть включитися в ті ланки метаболізму зародків, які безпосередньо пов'язані з синтезом та формуванням бластодерм зародків, що й призводить до порушення функціонування систем мембранного транспорту. Водорозчинні фенольні антиоксиданти у порівнянні із ліпофільними аналогами характеризуються високою біологічною доступністю і швидкістю транспорту в організмі, що робить їх незамінними в екстрених випадках вільно-радикальних патологій. Оскільки тіосульфонати володіють більш поліфункціональним механізмом антиокислювальної дії, й враховуючи отримані результати, можна зробити висновок, що вони є перспективними речовинами в якості біоантиоксидантів, антиатерогенних і протизапальних препаратів.



**ANALYSIS OF EFFECT THIOSULFONATE DERIVATIVES ON Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPASE ACTIVITY OF LOACH EMBRYOS IN VITRO**

*Bura M., Henega A, Yaremkevych O.\*, Mandzynets S., Lubenets V.\*, Novikov V.\*, Sanagurski D.*

Ivan Franko National University of L'viv, Lviv, Ukraine

<sup>1</sup>Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

e-mail:mcelevych@yahoo.com

The intensive development of sulfur-containing organic materials determine of great importance for science and practice. The esters thiosulfuric acid of general formula RSO<sub>2</sub>SR' take up special place. It is analogue of alliin. These compounds are known for a long time and it is an interesting model for examination of relationship with structure, reactive ability and biology activity. Thiosulfonates is more activity and stability reagent as disulfide. Thanks to high reaction and wide spectrum of biological activity thiosulfonates and derivates of quinolinic acid, tiazol, benzimidazole, benzotiazol, quinine were proposed as drugs, pesticides, food additive for fruits and vegetables, biocide for prevent to damage of materials. Thiosulfonates have a good practice value and hetero-, carbocyclic fragment in their molecule. It is a positive factor to get new compound with new spectrum of biological action. The investigation of biological action of thiosulfonate is special of interest at this time.

We shown that the action of thiosulfonates (methyl thiosulfonate and paraaminobenzol thiosulfonate salt of potassium) in concentration 10<sup>-3</sup>÷10<sup>-8</sup> and 10<sup>-4</sup>÷10<sup>-9</sup>M, respectively, during 6 hour development to lead significant changes activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in comparison of control. We take an series of experiments of action new synthesizing thiosulfonates for detail understanding molecular mechanism. We used paraaminobenzol thiosulfonate salt of potassium (10<sup>-4</sup> та 10<sup>-8</sup> M) and salt of potassium (10<sup>-3</sup> та 10<sup>-9</sup> M). We investigated the activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase membrane of loach embryos during synchronous division of blastomers in vivo with thiosulfonates.

We observed that affect both thiosulfonates in vivo to lead to significant decrease activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in comparison of control. The high concentration paraaminobenzol thiosulfonate (10<sup>-4</sup> M) and toluene thiosulfonate (10<sup>-3</sup> M) on the first hours of development embryos to show significant decrease activity membrane enzyme for both compounds. The paraaminobenzol thiosulfonate reduced activity of ATPase to 78,4±10,4 %, and toluene thiosulfonate - 75,5±4,1 % in comparison of control. This is to say that on the first hour of development the thiosulfonate inhibition in vivo is the same. On the next stage (16 blastomers) low concentration of thiosulfonates did not to lead significant changes of activity ATPase membrane embryos in comparison the first stage of development.

On stage of 64 blastomers we observed partly rapid recovery activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of embryos in experimental conditions. This recovery can explain to start protective cell mechanisms. The affect to examine substance we observed reliable decreasing activity of enzyme in average on 46,1±1,9 % in comparison control magnitude, it was 15,3±0,8 mkmol P<sub>i</sub>/hour on 1 mg protein. On stages 8 and 10 division of blastomers to mark rapid significant increasing of activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of loach embryos in comparison the first stage of development it does mean that activity recovered to control magnitude. It should be noted that action of thiosulfonate, in low concentration, to lead to significant decreasing only on stage 8 division of blastomers in comparison of control not last division that indicate about opposite result of action thiosulfonates during early development of loach embryos.

Thus we can conclude that thiosulfonates in high concentration (10<sup>-3</sup>÷10<sup>-4</sup> M) is modulated activity of ATPase of embryos but these inhibition effect is significant during early development. The enzyme activity cannot to completely recovery to primary level. Probably thiosulfonate can inclusion in the metabolism of embryo which to bind with synthesis and formation blastoderms of embryos. These compounds can broken functioning of system membrane transport. Water soluble antioxidants in comparison to lipophilic analogues characterized high biological accessible and velocity of transport in organism. This is to make these substances irreplaceable in cases free-radical pathologies. To take to take into consideration we can conclude that thiosulfonates is perspective substance as bioantioxidants and anti-inflammatory drugs.



## ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КОМПЛЕКСУ МОДУЛЯТОРА ТА ПОПЕРЕДНИКІВ БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ (CoQ) НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ ТКАНИН ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ *in vivo* АДРІАМІЦИНУ

*Бурлака<sup>1</sup> А.П., Сидорик<sup>1</sup> Є.П., Лук'ячук<sup>1</sup> Є.В., Ганусевич<sup>1</sup> І.І., Делеменчук<sup>2</sup> Н.В.,  
Кучменко<sup>2</sup> О.Б., Петухов<sup>2</sup> Д.М., Донченко<sup>2</sup> Г.В.*

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна  
e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

Адріаміцин (А) є ефективним протипухлинним антибіотиком, який широко використовується в онкологічній практиці. Застосування А супроводжується достовірним зниженням вмісту убіхінону (CoQ), дефіцит якого призводить до порушення біоенергетичного обміну, що може стати однією із причин розвитку адріаміцинової кардіоміопатії (АК). Убіхінон є важливим транспортером електронів та протонів, а також антиоксидантом, біосинтез якого часто порушується за стресових умов та різних патологічних станів.

Сучасні хіміотерапевтичні препарати, зокрема А, можуть посилювати окисні пошкодження не тільки в пухлинних, а і в здорових клітинах, що є обмежувальним фактором їх застосування.

Тому метою роботи було дослідити дію комплексу природних біологічно активних сполук, що активують ферментні системи біосинтезу CoQ та CoQ-залежні оксидоредуктази ланцюгу транспорту електронів мітохондрій, та функціональні зміни клітин різних тканин щурів за умов розвитку АК.

Дослідження проведені на 40 щурах лінії Wistar масою 230-280 г розводки віварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, які утримувались на стандартному раціоні. А (Доксорубіцин-КМП, ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) вводили 20 тваринам внутрішньобрюшинно в дозі 2,2 мг / кг ваги тіла щоденно протягом 8 діб, а іншим 20 на фоні введення А перорально вводили комплекс модулятора і попередників біосинтезу CoQ, який складався із  $\alpha$ -токоферол ацетату, параоксисбензойної кислоти і метіоніну. Оцінку ступеня пошкодження електронтранспортного ланцюга мітохондрій та міжклітинного матриксу проводили методом ЕПР на комп'ютеризованому спектрометрі PE-1307 та зимографії в ПААГ, відповідно.

В мітохондріях тканин серця, печінки, нирок та мозку тварин виявлено пошкодження CoQ-залежних ферментів, зокрема, НАДН-CoQ-оксидоредуктази електронтранспортного ланцюга, метаболітами А хінонної природи. Пошкодження дихального ланцюга мітохондрій пов'язане з активацією синтезу NO mNOS та утворенням комплексів NO-FeS в залізо-сірчаних білках N-1a, N-1b та N-2 цього мультиферментного комплексу, що ініціює генерування супероксидних радикал-аніонів, розвиток клітинної гіпоксії та активує матриксні металопротеїнази. Крім цього, молекулярна перебудова А цитохромом P-450 в ендоплазматичному ретикулумі клітин печінки, нирок та мозку і цитозольною НАДН-дегідрогеназою кардіоміоцитів призводить до формування ліпофільних деоксигліконів, які, на відміну від А, здатні проникати через внутрішню мембрану мітохондрій та пошкоджувати їх компоненти, посилювати генерування радикалів кисню. 7-деоксиглікон, основний метаболіт А, конкурує з CoQ - акцептором електронів, витісняючи його із електронтранспортного ланцюга, що спричинює "витік" електронів на молекулярний кисень з утворенням O<sub>2</sub><sup>•</sup>. Знайдено високі рівні активності матриксних металопротеїназ (ММП-2 та -9, або желатиназ) у всіх досліджених тканинах (найвищі в тканинах нирок), які в 2-3 рази перевищують контрольні значення. Комплекс біологічно активних сполук, розроблений в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна, захищає мітохондрії клітин серця, мозку та нирок від пошкоджуючого впливу А, відновлюючи електронний транспорт в дихальному ланцюгу, та знижує активність матриксних металопротеїназ. В клітинах печінки протекторна дія препарату менш виражена.

Таким чином, протипухлинний препарат А, пошкоджуючи молекулярні компоненти дихального ланцюга мітохондрій здорових клітин, ініціює генерування супероксидних радикал-аніонів, розвиток гіпоксії та активацію матриксних металопротеїназ.

Досліджуваний препарат є мітохондріальнотропним, виявляє спроможність до відновлення транспорту електронів в дихальному ланцюгу мітохондрій, пошкоджених А, та зменшує деструкцію міжклітинного матриксу.



**STUDIES ON EFFECT OF COMPLEX OF PRECURSOR AND MODULATORS OF UBIQUINONE (CoQ) BIOSYNTHESIS ON FUNCTION OF RAT TISSUES' MITOCHONDRIA UNDER *IN VIVO* TREATMENT WITH ADRIAMYCIN**

*Burlaka<sup>1</sup> A.P., Sydoryk<sup>1</sup> Ye.P., Lukyanchuk<sup>1</sup> Ye.V., Hanusevich<sup>1</sup> I.I., Delemenchuk<sup>2</sup> N.V., Kuchmenko<sup>2</sup> O.B., Petukhov<sup>2</sup> D.M., Donchenko<sup>2</sup> G.V.*

<sup>1</sup> Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

Adriamycin (A) is a potent and broad-spectrum antineoplastic agent that plays a major role in cancer chemotherapy. Its use has been hampered by adverse effects that include reliable decrease in ubiquinone (CoQ) content. Deficiency of CoQ leads to disruption of bioenergetic balance, which may be one of causes of A-induced cardiomyopathy (AC). CoQ is an important electron and proton carrier, as well as antioxidant. Its biosynthesis may be inhibited under stressful conditions and a number of pathologies.

Modern chemotherapeutic agents, such as A, may exacerbate oxidative damage not only to transformed, but also to normal cells, which is a factor that limits their application.

Therefore, the aim of the present work was to study an effect of complexes of biologically active substances, which are activators of CoQ biosynthesis' enzyme systems and of CoQ-dependent oxidoreductases of mitochondrial electron-transport chain, and functional changes in cells of rat tissues under AC.

Experiment was performed on 40 male Wistar rats from vivarium of Palladin Institute of Biochemistry and had free access to water and standard fodder for the duration of the experiment. A (Doxorubicin-KMP, by OJSC Kyivmedpreparat, Ukraine) was administered to 20 animals intraperitoneally in dose of 2.2 mg/kg of body mass daily for 8 days. The rest of animals received in addition to A administration and oral dose of complex of modulator and precursors of CoQ biosynthesis, that consisted of  $\alpha$ -tocopherol acetate, 4-hydroxybenzoic acid and methionine. Level of damage to electron-transport chain and extracellular matrix was assayed using EPR spectroscopy with RE-1307 spectrometer and by zymography in PAAG, accordingly.

Damage to CoQ-dependent enzyme systems, e.g. NADH-CoQ-oxidoreductase of electron-transport chain, induced by quinolic methabolites of A was found in mitochondria of heart, liver, kidney and brain tissues. Damage to mitochondrial respiratory chain is due to activation of NO synthesis by mNOS and production of NO-FeS complexes in FeS-proteins N-1a, N-1b and N-2 of this polyenzyme complex. This in turn leads to generation of superoxide-anion radicals, development of cellular hypoxia and activation of metalloproteinases in matrix. Moreover, molecular rebuild of cytochrome P-450 by A in endoplasmic reticulum of liver, kidney and brain cells and by cytosolic NADH-dehydrogenase in cardiomyocytes leads to formation of lyophilic deoxyaglicones, which unlike A are able to permeate mitochondrial inner membrane, damage their contents, and increase production of ROS. 7-deoxyaglicone that is the main methabolite of A is a competitor to CoQ as an electron acceptor and may inhibit its functioning in electron-transport chain, which leads to electron leakage on molecular oxygen, generating  $O_2^-$ . High activities of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9, or gelatinases) were found in all studied tissues (especially in kidney tissue). These were 2-3 times higher than control values. Complex of biologically active substances developed in Palladin Institute of Biochemistry protects heart, brain and kidney cells' mitochondria from adverse effects of A, restores electron transport through respiratory chain, and decreases activity of matrix metalloproteinases. Protective activity of complex in liver tissue is less prominent.

Therefore, anticancer agent A by damaging molecular components of respiratory chain of normal cells' mitochondria initiates generation of superoxide-anion radicals, development of hypoxia and activation of matrix metalloproteinases.

The experimental complex is mitochondrially targeted, is capable of restoring electron transport through respiratory chain of mitochondria damaged by A, and decreases destruction of extracellular matrix.



## **ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ ПРЕПАРАТІВ НА БАЗІ ІНДУКТОРІВ ІНТЕРФЕРОНУ НА АКТИВНІСТЬ 2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТ-СИНТЕТАЗИ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ЩУРІВ ЗА ДІЇ ТРАНСФОРМОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА**

*Чайка В.О., Лаврова К.В., Короткий О.Г.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: rigik1979@mail.ru

У наш час актуальною проблемою є дослідження молекулярних механізмів прояву реакції організму людини на дію пошкоджуючих факторів оточуючого середовища, які мають місце за умов перебування в космосі. Відомо, що в першу чергу ураження зазнає імунна система, яка є найбільш чутливою до будь-яких стресових факторів, таких як іонізуюча радіація, зміна температури, гравітації та ін. Для оцінки імунних реакцій і розробки шляхів корекції порушень актуальними є дослідження функціонування імуннокомпетентних клітин і, зокрема, вивчення процесів сигнальної трансдукції як показника їх функціонального стану. Особливу увагу звертають на себе месенджерні каскади, що індукуються інтерфероном – цитокином, залученим до процесів захисту організму від вірусів, онкологічних процесів, а також до механізмів активації імунної системи. Ключовий фермент системи інтерферону 2',5'-олігоаденілат-синтетаза істотно змінюється за патологічних станів, і тому за певних умов виникає необхідність у корекції рівня її активності. Тому цей фермент може бути зручною мішенню для дії різних фармакологічних препаратів. Серед препаратів, які б ефективно впливали на активність досліджуваного ферменту особливий інтерес представляють біологічно-активні препарати на базі індукторів інтерферону.

Нами було досліджено активність ключового ферменту системи інтерферону - 2,5-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах щурів за дії мікрогравітації на фоні введення різних індукторів інтерферону. Було вивчено вплив наступних індукторів інтерферону: полі(І)-полі(С), циклоферону та тилорону, які вводили щурам внутрішньочеревинно в дозах 50 мг/кг ваги, 62 мг/кг ваги та 60 мг/кг ваги 2 рази на добу, відповідно, протягом 4-х днів за описаними методиками. Кліноstatування тварин проводили протягом 60 хв. на горизонтальному кліноstatі. Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах визначали спектрофотометричним методом Justensen.

Показано, що вплив модельованої мікрогравітації приводить до росту олігоаденілатсинтетазної активності в лімфоцитах тимуса й селезінки щурів, що інтенсифікується зі збільшенням часу. Установлений ефект може бути результатом запуску компенсаторних механізмів лімфоїдних клітин у відповідь на дію стресових факторів, які реалізуються через систему трансдукції сигналу інтерферону.

За умов кліноstatування щурів максимальну зміну ферментативної активності у спленоцитах викликало введення циклоферону, при якому активність ферменту зросла на 80 % у порівнянні з контролем без кліноstatування та на 20 % у порівнянні з контролем за умов кліноstatування. У тимоцитах максимальну зміну активності 2,5А-синтетази викликало введення тилорону, внаслідок якого активність ферменту зросла на 80 % у порівнянні з контролем без кліноstatування та на 10 % у порівнянні з контролем за умов кліноstatування. Отримані дані дають підстави розглядати підвищення активності 2,5А-синтетази як результат активації цього ферменту в лімфоцитах за умов впливу мікрогравітації, що може бути наслідком постстресової стимуляції процесів трансдукції сигналу в системі 2',5'-олігоаденілату.

Таким чином, що біологічно активні препарати на базі індукторів інтерферону стимулюють активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоцитах селезінки й тимуса щурів, що дозволяє провести корекцію патологічних змін у клітинах і посилити компенсаторні реакції імунної системи у відповідь на дію факторів космічного польоту.



**INFLUENCE OF BIOLOGICALLY-ACTIVE PREPARATIONS ON BASE INTERFERON INDUCTOR ON 2',5'-OLIGOADENYLATE-SYNTHETASE ACTIVITY OF RATS IMMUNOCOMPETENT CELLS UNDER THE ACTION OF TRANSFORMED ENVIRONMENT**

*Chayka V.O., Lavrova K.V., Korotkiy O.G.*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv< Ukraine  
e-mail: rigik1979@mail.ru

Presently, researches of molecular mechanisms of human body reaction on environment damaging factors action which take place under space conditions are actual problem. It is known, that first of all defeat will be tested by immune system which is the most sensitive to any stressful factors, such as ionizing radiation, change of temperatures, gravitation, etc. For an immune reactions estimation and correction ways development, functioning researches of immunocompetent cells and, in particular, studying of signal transduction processes as indicator of their functional condition are actual. Special attention turn on itself messenger cascades which are induced by interferon - cytokine involving to antiviral protection processes, oncologic processes, and also to immune system activation mechanisms. Key enzyme of interferon-dependent 2',5'-oligoadenylate system is essential varieties under pathologic conditions and consequently under certain conditions there is a necessity for its activity level correction. Therefore this enzyme can be a convenient target for different pharmacological preparations action. Among preparations which effectively would influence investigated enzyme activity the special interests represent biologically-active preparations on base interferon inducers.

The activity of key enzyme of interferon system - 2',5'-oligoadenylate-synthetase in the rat spleen and thymus lymphoid cells under the action of transformed environment on introduction of different interferon inductor was investigated. Influence of the following interferon inductor was studied: poly (I) poly (C), cyclopheron and thiloron (intraperitoneal introduction in doses of 50 mg/kg, 62 mg/kg and 60 mg/kg 2 times in day, accordingly, on an extent of 4 days behind the described techniques). Rat clinostation spent to 60 minutes on horizontal clinostat. The lymphoid cells 2',5'-oligoadenylate-synthetase activity was defined according to spectrophotometric method by Justensen.

It was shown, that simulated microgravitation influence leads to enhancement of the 2',5'-oligoadenylate-synthetase activity in the rat spleen and thymus lymphoid cells, which was intensified with time increase. The established effect can be result of lymphoid cells compensatory mechanisms in reply to stressful factors action which are realized through interferon-dependent signal transduction system.

The most appreciable influence on investigated enzyme activity in rat spleen cells was observed for cyclopheron which leads to increasing of enzyme activity on 80 % in comparison with the control without clinostation and on 20 % in comparison with the control under clinostation conditions. In thymus lymphoid cells the maximum change of 2',5'-oligoadenylate-synthetase activity was shown for thiloron introduction accordingly to which enzyme activity was grown on 80 % in comparison with the control without clinostation and on 10 % in comparison with the control under clinostation conditions. The obtained data allow to consider 2',5'-oligoadenylate-synthetase activity increase as result of this enzyme activation in lymphoid cells under microgravitation conditions which can be a consequence a poststressful stimulation of signal transduction processes in 2',5'-oligoadenylate-system.

Thus, biologically active preparations on base interferon inductor stimulate 2',5'-oligoadenylate-synthetase in the rat spleen and thymus lymphoid cells which allows to spend correction of pathological changes in cells and to reinforce immune system compensatory reactions in reply to space flight factors action.



## БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ РЕЦЕПТОРОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

*Чуян Е.Н., Махонина М.М.*

Таврический национальный университет имени В.И.Вернадского, Симферополь, Украина  
e-mail Elena-chuyan@rambler.ru; timur@crimea.edu

Изучено биологическое действие изолированного и комбинированного с экспериментально вызванной стресс-реакцией (гипокинезия) электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) ( $\lambda=7,1$  мм, плотность потока мощности  $0,1$  мВт/см<sup>2</sup>) в условиях выключения системы опиоидных пептидов (ОпП), одной из основных стресс-лимитирующих систем организма, с помощью введения антагониста всех субтипов опиоидных рецепторов – налоксона.

Применение автоматизированного морфометрического анализа препаратов крови позволило получить количественную оценку цитохимических реакций (оптическую плотность, площадь активной цитоплазмы (площадь включений), количественный показатель ферментативной активности клеток крови) и значительно повысить эффективность использования методов цитохимического анализа.

Под действием ЭМИ КВЧ было зафиксировано увеличение функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов крови, что блокировалось предварительным введением налоксона. Блокада рецепторов ОпП уменьшала действие ЭМИ КВЧ на изменение концентрации цитокинов (интерлейкинов-1 $\beta$ , 2, 4, 6; фактора некроза опухоли- $\alpha$ ) в сыворотке крови крыс, как при его изолированном, так и комбинированном с гипокинезией действии. Следовательно, блокада рецепторов ОпП нивелировала действие ЭМИ КВЧ на изменение как неспецифической резистентности, так и иммунологической реактивности.

Выявленное люминесцентным, морфометрическим и цитохимическим методами снижение активности симпатoadренальной системы, происходящее у крыс под влиянием изолированного и комбинированного с гипокинезией миллиметрового излучения низкой интенсивности, блокировалось предварительным введением антагониста опиоидных рецепторов налоксона.

Под влиянием изученных факторов произошло изменение активности содержания гормонов и медиаторов других стресс-лимитирующих систем организма, в частности, серотонина и мелатонина в крови. Так, показано, что введение налоксона животным нивелировало действие ЭМИ КВЧ на увеличение концентрации мелатонина в сыворотке крови и содержания серотонина в лейкоцитах, как при его изолированном, так и комбинированном с гипокинезией действии.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из механизмов биологического действия низкоинтенсивного излучения миллиметрового диапазона является увеличение функциональной активности системы опиоидных пептидов, что является средством успешной профилактики и коррекции развития стресс-реакции и осуществляется, во-первых, за счет ограничения активности симпатoadренальной системы путем угнетения процессов выделения и рецепции катехоламинов, во-вторых, увеличения неспецифической резистентности и иммунологической реактивности, в-третьих, путем стимуляции образования и выделения серотонина и мелатонина, то есть потенцирования активации других стресс-лимитирующих систем организма.



**BIOLOGICAL ACTION OF ELECTROMAGNETIC FIELDS OF EXTREMELY HIGH FREQUENCY IN THE  
CONDITIONS OF OPIOID PEPTIDE RECEPTORS BLOCKING**

*Chuyan E.N., Makhonina M.M.*

Tavrida National V.I.Vernadsky University, Ukraine, Simferopol, Ukraine  
e-mail Elena-chuyan@rambler.ru; timur@crimea.edu

Study of biological action of electromagnetic fields of extremely high frequency ( $\lambda=7,1$ , mm, power flow density  $0,1 \text{ mW/sm}^2$ ) isolated and combined with experimentally evoked stress reaction (hypokinesia) in the conditions of opioid peptide system disabling, which is the one of the main stress-limiting organism systems, by injection of naloxone that is an antagonist of all sub-types of opioid peptide receptors.

Obtained results are an evidence that one of the mechanisms of biological action of low-intensity emission of millimeter range is an increase of functional activity of opioid peptide system which is a remedy of effective prophylaxis and correction of stress-reaction development. It is realized, firstly, by means of activity limitation of sympathoadrenal system through depression of the processes of catecholamine release and reception, secondly, by means of an increase of nonspecific resistance and immunological reactivity, thirdly, by means of stimulation of generation and release of serotonin and melatonin, that is, potentiation of activity of other stress-limiting organism systems.





## НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОКИСЛОВ АЗОТА И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В МАТКЕ

Данилович Ю.В., Данилович Г.В.

Институт биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Исследовано влияние гормонов (эстрогена, прогестерона и их аналогов – эрдистерона и диэтилстильбэстрола, нМ) на продукцию NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стромальными клетками эндометрия. Стероиды оказывают влияние на конститутивные ферментные системы (мембранная или негеномная фаза действия) и на экспрессию генов (актиномицин Д – чувствительное), причем их действие связано с повышением концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> в клетках. Показано, что прогестерон более эффективно стимулирует биосинтез NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по сравнению с эстроном как в определенные периоды сигнальных событий в клетках (5–30 с), так и при длительном воздействии (1–3 ч). Аналоги стероидных гормонов – эрдистерон и диэтилстильбэстрол – характеризуются значительно меньшим эффектом. Полученные результаты позволяют предположить, что прогестерон играет важнейшую роль в механизмах эндометрий-зависимой релаксации миометрии. Пептидный гормон окситоцин снижает продукцию NO эндометрием и нивелирует соответствующее стимулирующее действие прогестерона, что может свидетельствовать о существенной роли эндометрия в процессах инициации сократительной активности матки при родах.

Изучено изменение уровня сGMP в суспензии миоцитов матки крыс при действии нитропруссид натрия (донатор NO), нитрит-анионов и пероксида водорода в условиях влияния прогестерона на миоциты. Суспензию клеток выделяли с использованием коллагеназы и соевого ингибитора трипсина. Определение количества сGMP проводили с использованием стандартных тест-наборов производства «Amersham» (Великая Британия). Базальный уровень сGMP в неактивированных миоцитах составляет 1,5 ± 0,17 пмоль сGMP/мг белка (n = 5). Показано, что инкубация миоцитов с 0,1 мМ ацетилхолином на протяжении одного часа приводит к увеличению содержания сGMP в суспензии почти в два раза, которое полностью угнетается в присутствии 0,1 мМ метиленового синего, что свидетельствует об активности растворимой гуанилатциклазы в миометрии. Обработка клеток 10 нМ прогестероном на протяжении одного часа не вызывает существенных изменений в содержании сGMP. Добавление в этих условиях к суспензии 0,1 мМ нитропруссид натрия или 10 нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводит к повышению уровня сGMP до 3,1 ± 0,6 и 6,8 ± 0,4 пмоль сGMP/мг белка соответственно. Слабо проникающий в клетку NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (10 нМ) не вызывает изменений в уровне сGMP. Полученные нами результаты свидетельствуют, что именно длительное влияние активных метаболитов азота и кислорода на фоне действия прогестерона обеспечивает повышение уровня сGMP в миометрии матки.

Также идентифицированы тапсигаргин- и K<sup>+</sup>-индуцированные пути входа Ca<sup>2+</sup> в миоциты. Транспорт катиона, активированный высококальциевой деполяризацией чувствителен к кадмию и нифедипину, а тапсигаргином – к низким концентрациям лантана. Направленность действия оксида азота, нитрит-анионов и пероксида водорода на пассивный вход Ca<sup>2+</sup> в миоциты зависит от кокретного пути его поступления в клетки (специфики трансдукции Ca<sup>2+</sup> сигнала): в случае K<sup>+</sup>-индуцированного транспорта нитропруссид натрия и нитрит-анионы стимулировали его, а H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – подавлял, в тапсигаргин-индуцированном процессе нитропруссид натрия угнетал пассивный транспорт, тогда как NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> его усиливали.

Было изучено действие окислов азота и пероксида водорода на активность Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы (транспортной) и Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы (Ca<sup>2+</sup>-независимой) сарколеммы. Установлено, что 0,1 мМ нитропруссид натрия и 10<sup>-8</sup>–10<sup>-5</sup> М нитрит-анионы существенно снижают Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азную активность, тогда как Mg<sup>2+</sup>-АТФ-аза оказывается резистентной к их действию. При относительно высокой концентрации - (0,1 мМ) наблюдается заметная стимуляция транспортной АТФ-азы. Пероксид водорода (10<sup>-8</sup>–10<sup>-4</sup> М) в зависимости от концентрации подавляет активность обоих ферментов. Однако Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТФ-аза оказывается более чувствительной к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (кажущаяся K<sub>i</sub> = 0,42 ± 0,1 мкМ) по сравнению с Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азой (кажущаяся K<sub>i</sub> = 3,1 ± 0,9 мкМ). В присутствии 1 мМ дитиотреитола (восстановителя SH-групп на поверхности мембраны) действие исследуемых веществ значительно уменьшается. Реагенты на карбоксильные (дициклогексилкарбодимид) и аминные группы (тринитробензолсульфоновая кислота) мембран ингибируют активность обоих ферментов в сарколемме. В присутствии этих веществ действие нитропруссид натрия и нитрит-анионов очень слабое.

В дальнейшем изучали влияние NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на Ca<sup>2+</sup>-связывающие свойства кальмодулина. Показано снижение сродства Ca<sup>2+</sup> к кальмодулину и граничного количества мест связывания катиона при действии физиологических концентраций нитрит-анионов и пероксида водорода (нМ). Увеличение концентрации действующих веществ выше физиологической нормы значительно снижает указанные эффекты. Эти данные свидетельствуют о возможном угнетении Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимых цитозольных реакций в миометрии под влиянием окислов азота и пероксида водорода, что приведет к его релаксации.



## **SOME BIOCHEMICAL MECHANISMS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF NITRIC OXIDES AND HYDROGEN PEROXIDE IN UTERA**

*Danylovykh Iu.V., Danylovykh G.V.*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua

The influence of based estrogens (estrone), hystogenes (progesterone) and their analogs (ecdysterone and diethylstilbestrole), nM, on production of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by endometrium stroma cells was studied. It is supposed, that the steroids in the experiment conditions affect both the constitutive enzyme systems (membrane or nongenomic phase of activity), and the level of a gene expression (actinomycin D sensitive) and their activity is connected with the rising of concentration of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in cells. It is shown, that progesterone in hormonal concentrations boosts biosynthesis of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in comparison with estrone, both in real time of signalling events in the cells (5-30 s), and at long-term action (1-3 h) more effectively. The analogs of steroid hormones, ecdysterone and diethylstilbestrole, were considerably by characterized less effect. The obtained results allow to assume a prime role of progesterone in mechanisms of the endometrium-dependent relaxation of the myometrium. Peptide hormone oxytocine reduces NO production by endometrium and destroys the conforming promoting effect of progesterone, that can testify to the important role of endometrium in processes of initiation of contractile activity of a uterus in labors.

The level of cGMP in myocytes of uterus of rats at an action active metabolities of nitrogen and oxygen in the conditions of influence of progesteron on myocytes was studied. Cell suspension was selected with the use of collagenase and soy-bean inhibitor of tripsin. Determining the amount of cGMP was conducted with the use of standard kit produced by "Amersham" (Great Britain). The basal level of cGMP in unactivated myocytes made 1.5 +/- 0.17 pmol cGMP/mg of protein (n = 5). It is shown that incubation of myocytes with 0.1 mM acetylcholin during 1 hour resulted in 2 times growth of cGMP content in suspension approximately, this increase is fully suppressed in the presenced 0.1 mM methilene blue, that specifies activity of soluble cGMP in myocytes. Treatment of cells with 10 nM progesteron during 1 hour did not cause substantial changes in the level of cGMP. At the same time addition of 0.1 mM sodium nitroprussid (NO donor) or 10 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to suspension resulted in such conditions in the increase of level of cGMP to 3.1 +/- 0.6 and 6.8 +/- 0.4 pmol cGMP/mg of protein. Poor penetration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (10 nM) to the cells did not cause changes in the level of cGMP. The results got by us testify that the long-term influence of active metabolities of nitrogen and oxygen, instead of progesteron, provides the increase of the level of cGMP in the myometrium.

The thapsigargin- and K<sup>+</sup>-induced ways of the entrance of Ca<sup>2+</sup> into the uterine myocytes are identified. The entry of a cation, activated by high-potassium depolarization is sensitive to cadmium and nifedipine and thapsigargin-dependent – to low concentrations of lanthanum. The direction of the action of sodium nitroprusside, nitrite-anion and hydrogen peroxide on the passive entrance of Ca<sup>2+</sup> into myocytes depends on the specific way of its entry the cells (Ca<sup>2+</sup> transduction specific): K<sup>+</sup>-induced entrance are depressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and potentiated by NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and sodium nitroprusside, thapsigargin-induced entrance are depressed by sodium nitroprusside and potentiated by NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The action of nitric oxides and hydrogen peroxide on Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase (Ca<sup>2+</sup>-independent) enzymatic activity in sarcolemma fraction is investigated. It is established, that 0.1 mM sodium nitroprusside and 10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup> M nitrite-anions essentially reduce Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity whereas Mg<sup>2+</sup>-ATPase proved to be absolutely resistant to them. At rather high concentration of nitrite-anions (0.1 mM) appreciable stimulation of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase was observed. Hydrogen peroxide (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup>), depending on the concentration suppressed both enzymes activity. However, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase proved to be more sensitive to the action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (seeming K<sub>i</sub> = 0.42 +/- 0.1 microM), than Mg<sup>2+</sup>-ATPase (seeming K<sub>i</sub> = 3.1 +/- 0.9 microM). At presence of 1 mM dithiothreitol (a reducer of -SH groups of the membrane surface) action of investigated substances considerably decreased. Reagents on carboxic- (dicyclohexilcarbodiimid) and amino- groups of the membrane (trinitrobenzolsulfonic acid) inhibited both Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase, and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity in membrane fractions. In the presence of noted reagents sodium nitroprusside and nitrite-anions action was not almost shown.

The effect of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Ca<sup>2+</sup>-binding properties of calmodulin has been studied. The decrease of Ca<sup>2+</sup> affinity for calmodulin and limiting quantity of the sites of cation cross-linking by the protein molecule under the effect of physiological concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was obtained. The increase of the acting substances concentration above physiological one results in the considerable decrease of the observed effects. The investigation results indicate to possible inhibition of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent cytosole reaction of the smooth-muscle cells under the effect of nitric oxides and hydrogen peroxide, and this will result in the myometrium relaxation.



**АКОНИТИН-СОДЕРЖАЩИЙ АГЕНТ ВС1 (ДОНОВИТ) ПРОЯВЛЯЕТ ВЫРАЖЕННОЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕЙ С АНГИОГЕНЕЗ-ЗАВИСИМЫМ РОСТОМ**

Дасюкевич<sup>1</sup> О.И., Колесник<sup>1</sup> Д.Л., Пясковская<sup>1</sup> О.Н., Гарманчук<sup>2</sup> Л. В., Соляник<sup>1</sup> Г.И.

<sup>1</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup>Киевский Национальный Университет им. Тараса Шевченко, Киев, Украина  
e-mail: gis@onkonet.kiev.ua; grigor.72@mail.ru

В последнее время большой интерес привлекает к себе группа дитерпеноидных алкалоидов, для некоторых представителей которой была продемонстрирована высокая противоопухолевая активность и выявлено значительное антиангиогенное действие. Ярким представителем дитерпеноидных алкалоидов является аконитин – токсичное вещество растительного происхождения, относящееся к классу нейротоксинов, основным механизмом действия которого является ингибирование натриевых каналов. Важная роль, которую эти каналы играют в жизнедеятельности клеток, а также повышенная экспрессия их на малигнизированных клетках дают основания рассматривать Na(+) каналы как перспективную молекулярную мишень для противоопухолевой и антиметастатической терапии. Модификаторы Na(+) каналов, к которым относится и аконитин, представляют новый арсенал для создания эффективных противоопухолевых препаратов.

*Цель исследования.* Изучить специфичность противоопухолевого действия аконитин-содержащего агента ВС1 и возможные механизмы его реализации.

*Материалы и методы.* В качестве экспериментальных моделей использовали опухоли с ангиогенез-независимым ростом (исходный вариант карциномы легкого Льюис LLC и асцитный вариант карциномы Эрлиха EC/a) и опухоли с ангиогенез-зависимым ростом (вариант карциномы легкого Льюис LLC/R9 и солидный вариант карциномы Эрлиха EC/s). Терапевтический эффект оценивали: по кинетике роста первичной опухоли; количеству и объему метастатического поражения легких; продолжительности жизни животных. В системе *in vitro* изучали цитотоксическое/цитостатическое действие ВС1, его способность индуцировать апоптоз и влиять на электрокинетические характеристики ( $\zeta$ -потенциал) эндотелиальных и опухолевых клеток.

*Результаты.* Установлено, что ВС1 при его метромном введении животным проявлял выраженное противоопухолевое действие в отношении опухолей с ангиогенез-зависимым ростом (LLC/R9 и EC/s). Высокая противоопухолевая и антиметастатическая активность ВС1 в отношении LLC/R9 подтверждалась выраженным торможением роста первичной опухоли (более чем на 70%;  $p < 0.05$ ) и значительным снижением уровня метастатического поражения легких (количество метастазов и их суммарный объем были на 88% и 93% ниже, чем соответствующие показатели в контроле,  $p < 0.05$ ). Эффект носил дозозависимый характер и усиливался при уменьшении дозы агента. О высокой противоопухолевой эффективности ВС1 в отношении EC/s свидетельствовало торможения роста опухоли у мышей практически на 80% по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). В отличие от LLC/R9 и EC/s, ВС1 в режиме антиангиогенной терапии был не эффективным в отношении LLC и EC/a.

Показано, что чувствительность эндотелиальных клеток к цитотоксическому/цитостатическому действию ВС1 выше, чем чувствительность клеток обоих вариантов карциномы легкого Льюис. Причем,  $IC_{50}$  для активно пролиферирующих эндотелиальных клеток на порядок ниже, чем  $IC_{50}$  для эндотелиоцитов в стационарной фазе роста ( $IC_{50} = 0,95 \pm 0,06$  мкг/мл и  $IC_{50} = 8,7 \pm 2,1$  мкг/мл соответственно,  $p < 0.05$ ).

Выявлено, что при низких нецитотоксических концентрациях ( $IC_{50}/20$ ) ВС1 индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток и инвертирует их поверхностный заряд (с положительного на отрицательный). Двукратное увеличение концентрации ВС1 не приводит к индукции апоптоза и инверсии заряда эндотелиальных клеток. В отличие от эндотелиальных клеток, ВС1 в широком диапазоне концентраций не влиял на знак поверхностного заряда клеток обоих вариантов карциномы Льюис. При этом в низких концентрациях ВС1 обуславливал снижение абсолютного значения плотности поверхностного заряда клеток LLC/R9 (на 20-30%), не влияя на соответствующий показатель клеток LLC. Уровень ВС1-индуцированного апоптоза в опухолевых клетках зависел от концентрации агента в среде инкубации и был практически одинаковым для обоих вариантов клеток карциномы Льюис.

*Выводы.* Аконитин-содержащий агент ВС1 проявляет выраженное противоопухолевое и антиметастатическое действие в отношении опухолей с ангиогенез-зависимым ростом. Антиангиогенный механизм противоопухолевого действия ВС1 обусловлен как его проапоптотическим действием в отношении эндотелиальных клеток, так и способностью ингибировать морфогенез сосудов за счет инвертирования поверхностного заряда эндотелиальных клеток. Способность ВС1 индуцировать снижение величины поверхностного заряда опухолевых клеток может также вносить вклад в его антиметастатическую активность.



**ACONITINE-CONTAINING AGENT BC1 (DONOVIT) EXHIBITS APPARENT ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY ON TUMORS WITH ANGIOGENESIS-DEPENDENT GROWTH**

*Dasyukevitch<sup>1</sup> O. J., Kolesnik<sup>1</sup> D. L., Pyaskovskaya<sup>1</sup> O.N., Garmanchouk<sup>2</sup> L.V., Solyanik<sup>1</sup> G.I.*

<sup>1</sup>R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: gis@onkonet.kiev.ua; grigor.72@mail.ru

Recently a lot of interest was attracted to the group of diterpenoid alkaloids because for some of them high antitumor activity was demonstrated and significant antiangiogenic action was revealed. One of outstanding representatives of diterpenoid alkaloids is aconitine – a toxic substance of plant origin that is attributed to class of neurotoxins, main mechanism of action of which is inhibition of sodium channels. The importance of these channels for cells and also their increased expression on the surface of malignant cells make the ground to consider Na(+) channels as perspective molecular targets in antitumor and antimetastatic therapy. Na(+) channel-modifiers (to which aconitine also belongs) represent the new base for development of effective antitumor drugs.

*Aim of the research.* Studying of peculiarities of antitumor action of aconitine-containing agent BC1 and possible ways of its realization.

*Materials and methods.* As experimental models tumors with angiogenesis-independent growth (initial variant of Lewis lung carcinoma LLC and ascite variant of Ehrlich carcinoma (EC/a) and tumors with angiogenesis-dependent growth (variant of Lewis lung carcinoma LLC/R9 and solid variant of Ehrlich carcinoma (EC/s) were used. The therapeutic effect was assessed: (i) by measuring growth kinetics of primary tumor; (ii) by estimating the number and volume of lung metastatic lesions; (iii) by evaluating of animals life duration. In vitro cytotoxic/cytostatic effect of BC1 was also studied, as well as its ability to induce apoptosis and to influence electrokinetic characteristics ( $\zeta$ -potential) of endothelial and tumor cells.

*Results.* It was determined that BC1, when administrated metronomically, reveals evident antitumor effect on tumors with angiogenesis-dependent growth (LLC/R9 and EC/s). High antitumor and antimetastatic activity of BC1 on LLC/R9 was proved by apparent growth inhibition of the primary tumor (for more then 70%;  $p < 0.05$ ) and by significant reduction of metastatic lesion rate (the number of metastases and their total volume were by 88% and 93% lower then corresponding control indices,  $p < 0.05$ ). The achieved effect was dose-dependent and increased with the agent dose reduction. High antitumor activity of BC1 on EC/s revealed tumor growth suppression in all animals practically to 80% in comparison with the control ( $p < 0.05$ ). In contrast to inhibitory effect on LLC/R9 and EC/s, BC1 was not effective against LLC и EC/a.

It was shown that sensitivity of endothelial cells to cytotoxic/cytostatic effect of BC1 was higher then the sensitivity of both variants of Lewis lung carcinoma cells. The value of  $IC_{50}$  for actively proliferating endothelial cells was significantly lower than that of endotheliocytes in stationary growth phase ( $IC_{50} = 0,95 \pm 0,06$  mkg/ml and  $IC_{50} = 8,7 \pm 2,1$  mkg/ml, accordingly,  $p < 0.05$ ).

It was revealed that in low non-cytotoxic concentrations ( $IC_{50}/20$ ) BC1 induced apoptosis in endothelial cells and inverted their surface charge (from positive to negative). Double increase in BC1 concentration did not lead to apoptosis induction and endothelial cell charge inversion. In contrast to endothelial cells, BC1 in therapeutic concentration rates did not influence cell surface charge value in both variants of Lewis lung carcinoma cells. BC1 in low concentrations caused reduction of the absolute value of surface charge density of LLC/R9 cells (by 20-30%), not influencing the charge value of LLC cells. The level of BC1-induced apoptosis in tumor cells was dependent on agent concentration in incubation medium and it was practically equal for both variants of Lewis carcinoma cells.

*Conclusions.* Aconitine-containing agent BC1 shows significant antitumor and antimetastatic effect on tumors with angiogenesis-dependent growth. Antiangiogenic mechanism of antitumor action of BC1 is determined both by pro-apoptotic effect on endothelial cells and by its ability to inhibit vessel morphogenesis by inversion of surface charge of endothelial cells. The ability of BC1 to decrease of surface charge value of tumor cells may also contribute into its antimetastatic activity



## **БИОПРОФІЛАКТИКА ЯК ПРІОРИТЕТНА ПРОБЛЕМА ПРОФІЛАКТИЧНОЇ МЕДИЦИНИ НА ПРИКЛАДІ ПЕКТИНІВ**

*Демченко П.І.*

Національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: kostatram@gmail.com

Екологічне забруднення в Україні чинить негативний ефект на екосистеми та здоров'я людини. Постійно зростає діяння нових професійних та екологічних чинників, до яких у людини немає еволюційно пристосованих адаптаційних механізмів. Розробка універсальних профілактичних засобів може бути розв'язана шляхом створення композицій, що містять компоненти, які є селективно ефективними до певних класів ксенобіотиків. На даний момент багато вчених працюють над питаннями розробки профілактичних засобів природного походження, спрямованих на попередження захворювань, що викликаються екзогенними токсичними речовинами. Щоб ідентифікувати такий напрямок медицини, запропоновано термін «біологічна профілактика». Вона означає методи та способи не лише поліпшення умов праці або довкілля за фізичними, хімічними або іншими показниками, від яких залежить діяння шкідливих чинників, але й підвищення опірності організму або популяції до таких діянь.

Пектинові препарати відносять до таких засобів біологічної профілактики, які, на відміну від синтетичних протекторів практично не мають токсичних властивостей, а відтак і пов'язаного з ними обмеженого часу їх використання. Основним джерелом пектину у промисловості є вижимки з яблук або цитрусових, що переважно цікавить кондитерів, які є основними споживачами цієї продукції та використовують значні кількості пектину для розробки нових або поліпшення властивостей діючих технологічних ліній. З другого боку, світове використання пектину у медичній практиці є основним, якщо не єдиним, способом використання бурякового пектину. Слід окремо зауважити, що такий напрямок використання так званих пектиновмісних порошоків разом з пектином, у першу чергу з буряковим, є вельми перспективним.

Нами розроблено і запатентовано технології, які можуть бути рекомендовані для виробництва основного продукту – пектину та різних пектиновмісних харчових продуктів. Використання пектино-вітамінних препаратів з медичною метою є окремим і також добре розвиненим напрямком діяльності. Поєднання декількох пектинів, зокрема бурякового, яблучного, виноградного, з різними хімічними характеристиками, збагачених значною кількістю вітамінів, дозволило нам розробити оригінальну пектино-вітамінну композицію. Нормативна та технічна документація, розроблена відповідно до чинного законодавства, схвалена МОЗ України.

Пектинопрофілактика спрямована як на специфічні контингенти працюючих, так і на групи ризику серед населення. Методологія використання та дозування пектинових препаратів розписана в інформаційних листках, які додаються до кожної упаковки відповідно до чинного законодавства. Препарати не мають побічних ефектів, поєднання з медикаментами іншої дії допускається. Основним компонентом препаратів, розроблених нашою групою, завжди є низькоетерифікований буряковий пектин (пектиновмісний порошок), який є вельми ефективним для різних ксенобіотиків. Також слід окремо зауважити, що доцільно застосовувати пектинопрофілактику на робочих місцях, використовуючи препарати у таблетованій або дражованій формі для забезпечення добової потреби в пектині на робочих місцях зі шкідливими умовами праці. Вмісту пектину у соках (включаючи соки з м'якоттю) не є нормованим, ряд пектиновмісних продуктів також не є великим, а забезпечення добової потреби у формі желе або суфле навряд чи є доцільним з огляду на кількість желе або суфле, яке треба спожити, щоб одержати добову норму пектину.

Наявні сировинні матеріали, розвинені технології одержання пектинових продуктів та композицій на їхній основі, узгоджена науково-технічна документація, методичні документи за великий досвід використання пектинів, сформували основу для широкого використання пектинопрофілактики в Україні.



**BIOPROPHYLAXIS AS THE PRIORITY PROBLEM OF PREVENTIVE MEDICINE  
BY THE EXAMPLE OF PECTIN**

*Demchenko P.I.*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: kostatram@gmail.com

The environmental contamination in Ukraine exerts negative effect on the ecosystems and the population health. The exposure to new occupational and environmental factors, to which a human has no evolutionary developed adaptive mechanisms, increases. The development of universal preventive preparations can be solved by means of creation of compositions containing components that can be selectively effective in respect of a specific class of compounds (xenobiotics). At present many scientific groups are being engaged in elaboration of treatment and preventive preparations of natural origin directed at prevention and treatment of diseases, caused by exogenic toxic substances. In order to identify directions in this sphere the term - «biological prophylaxis» was used. It means that methods and means directed not for improvement of work conditions or the environment according to physical, chemical and other indices on which the level of harmful exposure depend but to the increase of resistance of a person and/or population groups to such exposures, because such resistance as well as its antipode – sensitivity are biological categories by their essence and are mechanisms that are controlled.

Preparations based on pectin are among these bioprophylaxis means. The major source of pectin is squeezing of apples or citrus fruits, providing interests of confectioners who are main buyers and who can use significant quantities of pectin for development of new or more effective use of existing technological lines. On the other hand, the worldwide use of pectin in medical practice is the main if not a single direction in the use of sugar-beet pectin. It should be noted that in this direction the use of the so-called “pectin-containing powders” along with pectin and, first of all sugar-beet pectin, is rather prospective.

We have developed and protected by patents the technologies that can be recommended for manufacture of the main product – pectin and different pectin-containing food products. The use of pectin-vitamin preparations for medical purposes is a separate and well developed direction of activity. The combination of several pectins – made of sugar-beet, apple, grapes and others with different chemical functional characteristics and a great number of vitamins allowed us to develop an original pectin-containing composition. The normative and technical documentation, developed in accordance with the acting legislation, is approved by the Ministry of Health of Ukraine.

Pectinoprophylaxis is directed both to specific contingents of workers and to risk groups. The method of using and dosing is described in the information list to be added to each package in accordance with the acting regulations. There are no counter-indications (specific sensitivity) to the use of this preparation; the combination with preparations of other destination is accepted. The main component of preparations, developed by our group, is always low-etherified sugar beet pectin/pectin-containing powder that is highly effective for various xenobiotics. It should be noted that it is advisable to implement pectinoprophylaxis at work using preparations in the form of tablets or dragée, in order to provide daily norm of pectin consumption at work places, following legal recommendations. The content of pectin in juices (including those with the pulp) is not standardized, the range of products with pectin is not to large and provision of the necessary dose with fruit jelly or soufflé is undoubtedly not reasonable (“daily norm” of jelly in recalculation to the content of pectin will be rather high).

The obtained results demonstrate the possibility to significantly decrease the technogenic loads, caused by occupational contacts of workers with compounds of heavy metals, radioactive substances and other chemical potentially toxic substances.

The raw materials base, developed technologies for receiving pectin substances and compositions made on their base, the adopted scientific and technical documentation, methodical documents and great experience in their use, form the base for wide implementation of pectinoprophylaxis in Ukraine.



## ВЛИЯНИЕ ПИКАМИЛОНА И ИЗОПИКАМИЛОНА НА ГЕНЕРАЛИЗОВАННУЮ ЭПИЛЕПТИФОРМНУЮ ЭЭГ АКТИВНОСТЬ У КРЫС

*Денисенко О.В., Бузыка Т.В., Карпов Л.М., Семик Л. И.*

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, Одесса, Украина  
e-mail: ksenia\_den@mail.ru, tetyana\_odes77@mail.ru

За последние 30 лет было синтезировано и изучено большое число производных никотиновой кислоты (НК), проявивших высокую фармакологическую активность. К их числу относится группа веществ, которые являются конъюгантами НК и ГАМК. Натриевая соль N-никотиноил-ГАМК, получившая название пикамилон (П), была синтезирована еще в 1970 г. Последующее экспериментальное и клиническое изучение П показало, что его способность проникать через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в головном мозге на порядок выше, чем у ГАМК. Причем П действует на ГАМК-рецепторы в неизменной форме. П нашел широкое применение в качестве ноотропного и транквилизирующего средства, так же при нарушениях мозгового кровообращения. Исследования по поиску новых психотропных средств показали, что изоникотиноил-ГАМК (изопикамилон) – производное П - возможно оказывает противосудорожную активность.

В острых опытах на белых беспородных крысах (n=18) под уретановым наркозом (100 мг/100 г) исследовали влияние в/бр введения пикамилон (П) и изопикамилон (ИП) в дозе 50 мг/кг на эпилептиформную электроэнцефалографическую активность лобной коры (ЛК) и вентрального гиппокампа (Гп), вызванную системным введением блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксина.

Последовательность событий на ЭЭГ при введении конвульсанта в дозе 2 мг/кг была типична для патологической генерализованной активности. На ЭЭГ выделялись группы синхронизированной спайк-волновой активности с частотой 7-8 Гц (амплитуда разрядов как в коре, так и в гиппокампе не превышала 500 мкВ). Как правило, такая активность сопровождалась развитием клонусов мышц головы. При в/бр введении ИП на 2-3 минуте наблюдали быстрые изменения в развитии патологической активности с резким увеличением амплитуды разрядов, частоты (12-15 Гц) и длительности спайк-волновой активности. На фоне таких энцефалографических изменений происходило развитие длительных генерализованных иктальных разрядов с клонусами мышц головы, туловища, передних конечностей. На 6-ой минуте амплитуда спайков в гиппокампе достигала 2000 мкВ, на коре – до 1000 мкВ. Высокая частота спайк-волновой активности поддерживалась в среднем до 40 - 50 минут.

При введении П на фоне генерализованной активности, вызванной пикротоксином в дозе 2 мг/кг наблюдаемая тенденция развития изменений на ЭЭГ была та же, что и с ИП. Но амплитуда, частота кортикальных и гиппокампальных разрядов была в 2 раза ниже и интенсивность клонических сокращений ниже.

Частота возникновения повторных иктальных разрядов в случае с ИП была достоверно выше, чем с П. ЭЭГ более 1,5 часов сохраняла особенности пароксизмальной высокоамплитудной медленноволновой активности. Необходимо отметить, что развитие патологической активности без введения П и ИП только в одном случае из шести сопровождалось формированием мощного иктального разряда. В течение периода регистрации (2 часа после введения ИП и П) ЭЭГ-активность исследуемых структур мозга полностью не восстанавливалась. Тенденция к восстановлению частотно-амплитудных характеристик спайк-волновой активности отмечалась в среднем не раньше, чем через 1,5 часа после введения ИП и П.



**EFFECT OF NICOTINOYL-GABA AND ISONICOTINOYL-GABA ON GENERALIZED EPILEPTIFORM ACTIVITY OF EEG IN RATS**

*Denysenko O.V., Buzyka T.V., Karpov L.M., Semik L.I.*

Department of Human and Animal Physiology, Odessa National Mechnikov University, Odessa, Ukraine  
e-mail: ksenia\_den@mail.ru, tetyana\_odes77@mail.ru

A number of nicotinic acid (NA) derivatives that manifest a high pharmacological activity were synthesized and studied during the last 30 years. In particular, a group of compounds which are NA and gamma-aminobutyric acid (GABA) conjugates was investigated in these studies. A sodium salt of N-nicotinoyl-GABA titled "picamilon" (P) was synthesized already in 1970. The subsequent experimental and clinical studies of P have shown that it's abilities to penetrate a brain-blood barrier and to accumulate in brain are an order of magnitude higher than similar values for pure GABA. More over, P acts at GABA-receptors in a non-metabolized form. P is widely used as a nootropic agent and tranquilizer and also for the treatment of brain's blood circulation impairment. As it was found in a number of studies of new psychotropic drugs, the P-derivative isonicotinoyl-GABA (isopicamilon, IP) may cause an anti-convulsant activity.

In our study we investigated in acute experiments influence of intraperitoneal injection of 50 mg/kg P and IP at an epileptiform EEG activity of a frontal cortex (FC) and ventral hippocampus (Hp). Research was performed at male white wild-type rats (n=18) under the urethane narcosis, epileptiform activity was induced by intravenous injection of GABA<sub>A</sub>-receptor blocker picrotoxin.

The events' sequence in EEG after the convulsant's injection in 2 mg/kg was typical for the generalized pathological activity. EEG displayed groups of synchronized spike-wave activity of the 7-8 Hz frequency (discharges' amplitude did not exceed 500  $\mu$ V both in FC and Hp). As a rule, this type of activity was accompanied by the ear and facial twitching and convulsive waves axially through the body. In 2-3 minutes after the intraperitoneal injection of IP we observed fast changes in pathological activity development with a rapid increase of discharge amplitudes as well as their frequency (up to 12-15 Hz) and duration of the spike-wave activity. At a background of these encephalographic changes we observed development of prolonged generalized ictal discharges accompanied by myoclonic jerks and bilateral forelimb clonus. At a sixth minute of experiment spikes' amplitude in Hp reached a value of 2000  $\mu$ V whereas in FC up to 1000  $\mu$ V. Such a high frequency of the spike-wave activity persisted in average during 40-50 minutes.

After injection of P against the background of generalized activity induced by 2 mg/kg of picrotoxin the tendency of development of EEG changes was similar to the such induced by IP. But amplitude and frequency of discharges in Hp and FC were two times lower; clonic seizures' frequency was lowered as well.

The frequency of repetitive ictal discharges propagation in case of IP injection was significantly higher than after injection of P. EEG displayed features of paroxysmal high-amplitude slow-wave activity for 1.5 hour. It is necessary to notice that the development of pathological activity without injection of P and IP was followed by formation of the mighty ictal discharge in only one of six experiments. During the data acquisition period (2 hours after the P and IP injection) activity of EEG of studied brain structures did not restore. A restoration tendency in the frequency-amplitude characteristics of spike-wave activity was observed in average not earlier than after 1.5 hour after the IP and P injection.





## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТУ „КВЕРЦЕТИН” З МЕТОЮ ПРОФІЛАКТИКИ СВИНЦЕВОЇ І КАДМІЄВОЇ ІНТОКСИКАЦІЙ

*Дмитруха Н.М., Андрусишина І.М.*

ДУ «Інститут медицини праці АМНУ», м.Київ, Україна  
e-mail: dmytrukha@ukr.net

Важкі метали - свинець і кадмій – відносяться до глобальних антропогенних забруднювачів довкілля. Збільшення їх вмісту в навколишньому середовищі, особливо в промислових регіонах України, призвели до зростання рівня захворюваності серед населення, підвищення у них частоти інфекційних, алергійних та онкологічних хвороб.

У зв'язку з цим, дослідження впливу важких металів на стан здоров'я людини та пошук засобів профілактики їхньої негативної дії є актуальною медико-біологічною проблемою.

Як відомо, засоби біологічної профілактики інтоксикацій повинні не тільки сприяти підсиленню механізмів детоксикації, але й підвищувати загально-біологічну реактивність організму. З огляду на це, нами був обраний препарат «Кверцетин», для якого встановлена антиоксидантна, мембранопротекторна та імуномоделююча дія.

Метою даної роботи було дослідження ефективності застосування препарату «Кверцетин» як засобу біопротекторної токсичної дії свинцю і кадмію в експерименті на щурах.

Дослідження проведені в двох серіях на щурах - самцях лінії Вістар вагою 150-220 г, які утримувались в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Тварини були розподілені на 6 груп (по 6 щурів у кожній). В першій серії моделювали свинцеву інтоксикацію внутрішньоочеревинним введенням розчину ацетату свинцю у дозі 2,5 мг/кг маси тіла. В другій серії відтворювали кадмієву інтоксикацію введенням 0,4 мг/кг маси тіла сульфату кадмію. Кверцетин вводили тваринам внутрішньо-шлунково (через зонд) у дозі 10 мг/кг. Кожна серія досліджень забезпечувалась своїм контролем. Периферичну кров у тварин забирали після 30 введень зазначених вище речовин.

У крові та органах контрольних і піддослідних щурів визначали вміст катіонів свинцю і кадмію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії. Клітинний склад крові, рівень гемоглобіну за стандартними методами, цинкпротопорфірину за допомогою Гемофлюориметра 206 Д. Стан імунологічної реактивності організму щурів оцінювали за клітинними та гуморальними показниками (фагоцитарна і метаболічна активність нейтрофілів крові, титр комплекменту та рівень циркулюючих імунних комплексів). Для всіх тварин визначали масу тіла і відносну масу внутрішніх органів. Статистичну обробку результатів дослідження проводили на комп'ютері за допомогою пакету програм Microsoft Office Excel 2003.

Результати досліджень показали, що вживання щурами препарату «Кверцетин» на фоні моделювання свинцевої інтоксикації сприяло незначному зменшенню вмісту металу в крові та інших органах; достовірному по відношенню до групи тварин, отруєних свинцем, збільшенню маси тіла; наближенню до контрольних значень кількості лейкоцитів та лімфоцитів; підвищенню фагоцитарної активності нейтрофілів, опсонізуючих властивостей сироватки крові, вмісту в ній імунних комплексів та зниженню окисно-відновних реакцій в фагоцитах.

Застосування препарату «Кверцетин» з метою профілактики розвитку кадмієвої інтоксикації мало більш позитивний ефект, ніж при свинцевому токсикозі. Даний препарат сприяв достовірному зниженню вмісту кадмію в крові та внутрішніх органах піддослідних щурів, збільшенню їх маси тіла та відносної маси тимусу, підвищенню рівня гемоглобіну та зниженню цинкпротопорфірину в крові, стимуляції фагоцитозу нейтрофілами, зниженню в них інтенсивності респіраторного вибуху. В групі щурів, які отримували кадмій і Кверцетин одночасно, виявлено зменшення рівня циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові.

Отримані дані дозволяють припустити, що застосування препарату «Кверцетин» як засобу біологічної профілактики інтоксикацій важкими металами мало позитивний ефект, особливо при експозиції кадмієм. Кверцетин сприяв виведенню металів з організму та зменшував їх накопичення в органах піддослідних щурів, підвищував гемоглобін, збільшував число нейтрофілів. Завдяки антиоксидантним і імуномоделюючим властивостям даний препарат знижував інтенсивність респіраторного вибуху в нейтрофілах, стимулював фагоцитоз, зменшував вміст імунних комплексів і таким чином підвищував неспецифічну резистентність організму.



## **EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF QUERCETIN APPLICATION WITH PURPOSE OF PROPHYLAXIS OF LEAD AND CADMIUM INTOXICATIONS**

*Dmytrukha N.M., Andrusishyna I.M.*

Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kiev, Ukraine  
e-mail: dmytrukha@ukr.net

It is known that heavy metals have negative effect on the human health. Occupational exposure to chemicals may alter immunological function which manifests in immunosuppressive activity, hypersensitivity or autoimmunity. The health implication of immune dysfunctions is increased risk of infectious diseases, development of neoplastic, autoimmune disorders and allergy.

The aim of the present study was to investigate the effects of quercetin on some cellular and humoral components immunological reactivity of rats exposed to lead and cadmium.

The effects of 30 days exposure to lead acetate (2,5 mg/kg body weight), cadmium sulfate (0,4 mg/kg) and quercetin (10 mg/kg) were studied in white male rats.

The lead and cadmium blood content in rat was determined by atomic absorption spectroscopy.

The body and organs weight of rats were also measured.

Complexes of standard hematological and immunological methods were used. The phagocytic function, metabolic activity (NBT-test) of neutrophils was investigated. The level of circulating immune complexes was also evaluated in the rat blood serum.

The results of biomonitoring showed that application of quercetin to rats exposed to lead and cadmium caused decrease of metal concentration in blood, and liver, increase of hemoglobin level, stimulate the phagocyte function of neutrophils and inhibited their metabolic activity and decline of immune complexes levels. Also we observed enhance of body and thymus weight in metal exposures rats in comparison with lead and cadmium poisoned animals.

Obtained data allow to establish, that application of quercetin as mean of biological prophylaxis of heavy metals intoxications had a positive effect. Quercetin strengthened elution of metals from rat organism and diminished their accumulation in organs. Due to antioxidant properties this preparation decreased redox processes in neutrophils, enhanced haemoglobin concentration, number of neutrophils, stimulated phagocytic function and thus stimulated nonspecific resistance.



## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ВИТАМИНОПРОФИЛАКТИКИ И ВИТАМИНОТЕРАПИИ

*Донченко Г.В.*

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

Проблемы обеспечения организма человека и животных природными биологически активными соединениями, в том числе витаминами и витаминоподобными веществами, всегда являлись одним из наиболее сложных и актуальных вопросов здравоохранения, медицины животноводства и ветеринарной медицины. В связи с ускоренным развитием научно-технического прогресса, урбанизации, использованием промышленных технологий производства и переработки продуктов сельского-хозяйства и т.д. в последние 30-40 лет во всем мире проблемы витаминпрофилактики приобрели особую актуальность. С учетом энергетических затрат, в среднем это 2500 ккал на человека в сутки, а самый совершенный, сбалансированный по основным пищевым компонентам рацион оказывается дефицитен от 25-30 % по ряду витаминов, что приводит к развитию полигиповитаминозов во всех странах мира.

К сожалению, полигиповитаминозы клинически не диагностируются и приводят к развитию широкого спектра патологий, которые невозможно эффективно лечить с помощью фармсредств без устранения первопричины их возникновения. В связи с этим обсуждаются теоретические и практические аспекты витаминпрофилактики и витаминотерапии.

Среди научно-технических разработок (более 40 авторских свидетельств и патентов) сотрудников отдела биохимии коферментов Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины обсуждаются:

1. Получение и применение короткоцепочечного производного  $C_6$  - аналога и естественного метаболита  $\alpha$ -токоферола, что позволяет на 30-35% снизить стоимость производства аналога по сравнению с витамином Е фармакопейным. Созданный нами на основе аналога препарат «Соевит Е» является эффективным антиоксидантом, активатором тканевого энергетического обмена, обладает Е-витаминной активностью, антигипоксантичным, иммуномодуляторным, гепатопротекторным действием (подтверждено патентами) на курах, бройлерных цыплятах, индюках, водоплавающей птице на 25-40% эффективнее витамина Е [Донченко Г.В. // Укр. біохім. журн. – 1995. – 67, №3. – С. 26-39].

2. Разработана новая кормовая добавка «Минердимс» для повышения продуктивности птицеводства, позволяющая увеличить привесы, повысить сохранность поголовья птицы, а также обеспечить минерализацию костной ткани, восстановление подвижности при дисхондроплазии у бройлеров [Донченко Г.В., Кузьменко І.В., Шемет Р.С. и др. // Под ред. В.Г. Ткаченка. – Луганск: Вид-во ЛАНУ. – 2006. - №58 (81), Серія: Сільськогосподарські науки. – С. 215-220].

3. Созданы технологии получения препаратов биологически активных веществ из животного и растительного сырья. Так, из плаценты овец получено два уникальных комплекса соединений липидов, аминокислот и пептидов. Разработана комплексная в едином процессе технология получения убихинона-10, холестерина, фосфолипидов и других биологически активных соединений из морепродуктов и отходов их переработки. Из амаранта (семья Amaranthaceae) получены белковые пищевые и кормовые препараты, пищевые красители, а из зерна амаранта получено масло (4,5-8,5% на сухую массу зерна), которое является концентратом биологически активных веществ – ценным медицинским препаратом.

4. Последние 15-20 лет усилия сотрудников нашего отдела были направлены на создание нового поколения комплексных препаратов метаболического действия на основе природных биологически активных соединений группы парафармацевтиков для проведения эффективной витаминотерапии различных патологий. Научно-теоретическим обоснованием их создания послужили результаты многолетних фундаментальных исследований отдела в области функциональной биохимии, витаминологии и молекулярной витаминологии.

В качестве примера таковых обсуждаются два из них:

- Препарат «Метовитан» для активирования процессов тканевого биоэнергетического обмена и реакций транссульфирования и трансметилирования, что лежит в основе регуляции внутриклеточного метаболизма и определяет устойчивость организма человека и животных в условиях негативного воздействия внешних факторов и патологий (внедряется на фармпредприятии «Технолог», г. Умань);

- Препарат «Энерговитан» для активирования процессов и восстановления ферментативных систем биосинтеза и функционирования убихинона в цепи транспорта электронов, внутриклеточного биоэнергетического обмена, он значительно эффективнее, чем дорогостоящие препараты убихинона ( $Q_{10}$ ), повышает устойчивость и жизнеспособность клеток всех тканей и органов человека и животных.

Указанные комплексные препараты с учетом целенаправленного механизма их биохимического действия обладают широким спектром терапевтического эффекта и практического применения (подтверждено патентами).

Обсуждаются современные актуальные аспекты рациональной витаминпрофилактики и витаминотерапии.



## THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS OF THE VITAMIN-BASED PREVENTIVE CARE AND THERAPY

*Donchenko G. V.*

Palladin Institute of biochemistry of National Academy of Science of Ukraine

e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

Problems of provision of the animal and human organism with natural biologically active compounds, including vitamins and coenzymes, are one of the most complicated and topical issues on the agenda of health care, veterinary and cattle breeding. In relation to the accelerated development of the sci-tech progress, urbanization, usage of the industrial technologies of the agricultural processing etcetera during last 30-40 years all over the world problems of the vitamin-based preventive care have become extremely actual. Taking into account metabolic cost 2500 kcal/d, even the most balanced everyday ration proves to be scarce in 25-30% with regard to certain number of vitamins, which leads to the proliferation of the polyhypoavitaminosis in many countries of the world.

Unfortunately, polyhypoavitaminosis can not be diagnosed clinically and lead to development of the wide range of the pathologies, which are not subjected to the efficient medication without elimination of the initial cause.

Among scientific and technical elaborations (more than 40 author's certificates and patents) of the employees of the Coenzymes' Biochemistry Department of the A.V. Palladin Institute of Biochemistry of NASU are currently discussed the following ones:

1. Development of  $\alpha$ -tocopherol derivative  $C_6$  –analog and natural metabolite with shortened side chain technology and application, which allows providing 30-35% reduction of price in comparison to vitamin E. We have created preparation "Soevit E" on the base of analog which proves to be effective antioxidant, activator of the energetic exchange possessing in tissue, E-vitamin influence, antihypoxic, immunomodulatory and hepatoprotective effect (which is approved by patent). Its effect has been proved on hens, broiler chickens, turkeys and web-foot to be 25-40% more efficient than vitamin E [Donchenko G.V. // Ukrainian Biochemical Journal. – 1995. – 67, N3. – P. 26-39].

2. Development of new generation of food additive "Minerdims" for the increasing of productivity of aviculture, allowing to raise weight and viability of the poultry livestock, as well as to ensure mineralization of the bony tissue and restoration of movability in case of broilers' dyschondroplasia [Donchenko G.V., Kuzmenko I.V., Shemet R.S. et al // under the editorship of V.G. Tkachenko – Lugansk: LANU Publishing House. – 2006. - N58 (81), Series: Agricultural Sciences. – P. 215-220].

3. Development of modern wasteless biotechnologies for BAC from the animal and vegetative materials - two unique complexes of the lipid, amino acid and peptide compounds have been received from the placenta of the sheep. Complex technology of the receiving within one process of the coenzyme Q-10, cholesterol, phospholipids and other biologically active preparations and compounds from the sea-food and waste from its processing. Protein-based nutritional and fodder preparations and food colorings have been received from Amaranthaceae. Oil which is used as concentrate of the biologically active compounds and valuable medical preparation has been received from the Amaranthaceae seeds (4,5-8,5% on dry weight basis).

4. During recent 20 years employees of our Department have been focused on the creation of the new generation of the complex preparations with the metabolic effect on the basis of the natural biologically active compounds of the parapharmaceuticals' group in order to provide carrying out of the efficient vitamin-based therapy of the different pathologies. Results of the long-termed fundamental researches of the Department served as scientific-theoretical background for the creation of such preparations. Among preparations:

- Preparation "Metovitan" for the activation of bioenergetic exchange processes in tissue and reactions of trans-sulfonation and trans-methylation which underlie regulation of the endocellular metabolism, as well as defines resistance of the human and animal organism under conditions of the negative influence of environmental factors and different pathologies. Preparation is being inculcated at the pharmaceutical factory "Technolog", Uman';

- Preparation "Energovitan" for the activation of processes and renovation of coenzyme-based systems of bio-synthesis and functioning of coenzyme Q-10 in the chains of transportation of electrons and endocellular energetic exchange, in securing of cells' functioning and viability under normal as well as pathological conditions, which is far too effective than other more expensive preparations of the coenzyme Q-10.

Mentioned complex preparations based on the targeted approach to the biological effect possess wide spectra of the therapeutic influence and practical application, which is approved by patents. Contemporary actual aspects of the vitamin-based preventive care and therapy are discussed.



## СКРИНИНГ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ОТНОШЕНИИ УФ –ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ

*Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Голубков А.М., Островский М.А., Смирнов Л.Д.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия  
e-mail: nsakina@mail.ru

Ранее нами были разработаны новые подходы к направленному поиску физиологически активных соединений в ряду азотистых гетероциклов, основанные на важной роли процессов пероксидного окисления липидов биологических мембран в патогенезе целого ряда заболеваний, связанных с нарушением нормального функционирования мембранных структур клетки [1]. Результатом этих исследований явилось открытие нового класса гетероароматических антиоксидантов, которые могут эффективно ингибировать процессы пероксидного окисления липидов биологических мембран.

В данной работе был проведен скрининг новых гетероароматических водорастворимых антиоксидантов – производных бензотиазола, бензимидазола и 3-гидроксипиридина в отношении их ингибирующего действия на УФ-индуцированную пероксидацию липидов. Для оценки антиоксидантной активности были определены константы тушения хемилюминесценции в модельной системе, содержащей люминол, пероксид водорода и гемоглобин; а также величины 50% ингибирования УФ - индуцированной пероксидации липидов. Одновременно была проконтролирована устойчивость этих гетероароматических антиоксидантов к действию УФ облучения.

Показано, что самыми высокими константами тушения хемилюминесценции (более  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) и наиболее активными в отношении ингибирования УФ - индуцированной пероксидации липидов оказались производные гидроксibenзимидазола и amino-гидроксibenзотиазола. В то же время производные 3-гидроксипиридина практически не ингибировали этот процесс.

Обсуждаются возможные механизмы различного действия этих антиоксидантов в отношении УФ-индуцированной пероксидации липидов.

### **Литература:**

1. Л.Д. Смирнов. «Структура, фармакологические свойства и медицинское применение гетероароматических антиоксидантов». В кн. «Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты», 2005, Москва, Изд. «Химия», с.102-129.



## **SCREENING OF SYNTHETIC WATER-SOLUBLE ANTIOXIDANTS CONCERNING UV- INDUCED LIPID PEROXIDATION**

*Dontsov A.E., Sakina N.L., Golubkov A.M., Ostrovsky M.A., Smirnov L.D.*

N.M. Emanuel Institute of biochemical physics, RAS, Moscow, Russia  
e-mail: nsakina@mail.ru

We earlier had been developed new approaches to the directed search of physiologically active compound in a number of nitrogenous heterocycles, based on the important role of lipid peroxidation processes in biological membranes in pathogenesis of a lot of the diseases connected with normal function disturbance of cell membrane structures [1]. Result of these researches was opening a new class heteroaromatic antioxidants which can effectively inhibit the lipid peroxidation processes in biological membranes.

In the present study screening of new heteroaromatic water-soluble antioxidants - derivatives of benzotiazol, benzimidazol and 3-hydroxypyridine concerning them inhibitory actions on UV-induced lipid peroxidation has been done.

Constants of chemiluminescence quenching in the model system containing luminol, hydrogen peroxide and haemoglobin for an evaluation of antioxidant activity; and also sizes of 50% inhibition of UV - induced lipid peroxidation. have been estimated. Stability of these heteroaromatic antioxidants to UV- light irradiation has simultaneously been determined.

It was shown, that the highest constants of chemiluminescence quenching (more than  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) and the most active concerning UV-induced lipid peroxidation inhibition have appeared hydroxybenzimidazol and amino - benzotiazol derivatives . At the same time derivatives of 3-hydroxypyridine practically don't inhibit this process.

Possible mechanisms of various action of these antioxidants concerning UV-induced lipid peroxidation are discussed.

### **References:**

1. Л.Д. Смирнов. «Структура, фармакологические свойства и медицинское применение гетероароматических антиоксидантов». В кн. «Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты», 2005, Москва, Изд. «Химия», с.102-129.



## ВПЛИВ СПІРОКАРБОНУ І ПОХІДНИХ ПІРОЛОПІРИМІДИНДІОНІВ НА КИСЛОТНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ФЕРМЕНТІВ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДЕЙ В СИСТЕМІ IN VITRO

*Дудок К.П.<sup>\*</sup>, Старикович Л.С.<sup>\*</sup>, Речицький О.Н.<sup>\*\*</sup>, Єресько В.А.<sup>\*\*</sup>, Косяк Т.Ю.<sup>\*\*</sup>, Шкаволяк А.В.<sup>\*\*\*</sup>, Сибірна Н.О.<sup>\*</sup>*

<sup>\*</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна  
e-mail: j007@if0.lviv.ua

<sup>\*\*</sup>Херсонський державний університет, Херсон, Україна

<sup>\*\*\*</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів, Україна

Проблема метаболічних порушень за різного типу патологій (діабет, алкоголізм, променеве ураження тощо) є актуальною як у практичному так і у теоретичному аспектах і потребує різносторонніх досліджень. Завдання є надзвичайно складним, оскільки вказані патології супроводжуються глибокими порушеннями різних ланок обміну речовин у живих системах. У цьому плані актуальною є розробка методів та пошук маркерів ранньої діагностики і коректорів захворювань певного типу. Такими маркерами чи коректорами можуть бути сполуки хімічного синтезу, що проявляють специфічну біологічну активність. Функція їх полягає у взаємодії з біологічними макромолекулами (білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами тощо) та їх комплексами. Наслідком таких реакцій може бути зміна конфірмаційного стану останніх, їх функції. Водночас, практичне застосування такого типу сполук також є надзвичайно широким – від харчових преміксів – до протипухлинних та радіопротекторних засобів.

Метою нашої роботи було дослідження впливу in vitro речовин (№1, №2, №3), синтезованих на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету на резистентність до дії кислотного гемолітика еритроцитів та каталазу, сумарну NO – синтазну активність і вміст гідроген пероксиду в гемолізатах еритроцитів. Використовували: Спірокарбон (СК - речовина №1) (6,6,6',6'-тетраметил-2,2'-діоксо-4,4'-спіро-бі(гексагідропіримідин); похідні піролопіримідиндіонів (1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H), (речовина №2) та (1,6-диметил-4-(2-трифлуорометилфеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H), (речовина №3), (Єресько В.А., Речицький А.Н. та ін., 1995; Речицький А.Н., Єресько В.А. та ін., 2007). Спірокарбон добре розчиняється у воді, ізотонічному розчині. Похідні піролопіримідиндіонів у воді розчиняються дещо гірше. В якості моделі тестування перерахованих препаратів були використані еритроцити та цільна периферична донорська кров людей.

Невідмиті від плазми еритроцити інкубували протягом однієї та 24-х годин з розчинами речовин №1, №2, №3. У результаті проведених досліджень показано, що досліджувані речовини сприяють підвищенню резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика. Максимальний гемоліз наступав через 5-6,5 хв. проти 4,5...5 хв. - у контролі. Після добового інкубування еритроцитів їхня стійкість до дії гемолітика практично не змінювалась порівняно з одноденною, однак час тотального гемолізу дещо зростає (до 9-11 хв.).

Дослідження сумарної каталазної та NO – синтазної (NOS) активності показали, що вона залежить від часу інкубування з досліджуваними сполуками. З'ясовано, що активність каталази у присутності Спірокарбону зменшується майже у 4 рази, якщо еритроцити перед гемолізом не відмивали від залишків даної речовини. Після відмивання еритроцитів також спостерігалось зменшення активності досліджуваного ферменту, але в меншій мірі (на 22%). Подібні ефекти виявлені щодо дії речовини №2. Сполука №3 сприяла підвищенню активності на 10%. Оскільки основним місцем локалізації цього ферменту є пероксисоми, то причиною зміни активності каталази може бути стабілізація мембранних структур і погіршення екстракції цього ферменту у розчин за дії гемолітика і одночасного впливу Спірокарбону або речовини №2. Отже, можна вважати, що при гемолізі еритроцитів частина каталази за дії спірокарбону лишається зв'язаною з мембранними структурами і не переходить у розчинну фракцію. Виявлено тенденцію до зростання вмісту гідроген пероксиду у гемолізатах - активного метаболіту оксигену, що корелює із змінами каталазної активності.

За даних умов досліду нами не виявлено достовірних відмінностей сумарної NOS- синтазної активності.



**EFFECT OF SPIROKARBON AND DERIVATIVES OF PIROLOPIRYMIDYNDION ON ACID RESISTANCE AND ACTIVITY OF SOME ENZYMES OF ERYTHROCYTES IN HUMAN BLOOD STUDIED IN VITRO**

*Dudok K.P.\**, *Starykovych L.S.\**, *Rechytskyi O.N.\*\**, *Yeresko V.A.\*\**, *Kossyak T.Yu.\*\**,  
*Shkavolyak A.V.\*\*\**, *Sybira N.O.\**

\*Lviv Ivan Franko National University, Lviv, Ukraine

e-mail: j007@ifo.lviv.ua

\*\*Kherson State University, Kherson, Ukraine

\*\*\*Lviv Danila Galicky National Medical University, Lviv, Ukraine

The problem of metabolic disorders at different types of pathologies (diabetes, alcoholism, radiation lesions, etc.) is of high importance regarding its practical as well as theoretical aspects and implies a comprehensive investigations. Such studies are extremely difficult because in most cases these diseases are accompanied by significant disturbances at different levels of metabolism in living systems. New methodologies and experiments aimed to propose markers for early diagnosis of certain diseases and development of the corresponding moderators are greatly needed. Such markers and/or moderators can be based on specific biological activity of some chemical compounds capable to modify the conformation states of biological macromolecules (proteins, nucleic acids, lipids, etc.) and their complexes. It is worth to mentioning that application of such compounds ranges from food additives to anticancer and radioprotective agents.

The aim of this work is to study in vitro the effects of the compounds (below denoted as N1, N2, N3), synthesized at the Department of Organic and Biological Chemistry (Kherson State University) on the *erythrocyte resistance to acid hemolysis*, as well as on catalase, total NO - synthase activity and the hydrogen peroxide content in hemolyzed erythrocytes. We have used the following materials: Spirokarbon (SK - compound N1) (6,6,6', 6'-tetramethyl-2, 2'-diokso-4, 4'-spiro-bi (heksahidropirimidin) derivatives of pirolopirimidindions (1,6-Dimethyl -4-phenyl-1, 2,3,4,5,7-heksahidropirololo-[3,4-d]-pirimidindion-2, 5 (1N), (compound N2) and (1,6-Dimethyl-4 - (2-tryfluorometilfenil) -1,2,3,4,5,7-heksahidropirololo-[3,4-d]-pirimidindion-2, 5 (1N), (compound N3), (Yeresko V.A. , Rechytskyi A.N. and others., 1995; Rechytskyi A.N., Yeresko V.A. and others., 2007).

Spirokarbon is well soluble in water and isotonic solution. Water solubility of the pirolopirimidindions derivatives is slightly lower. Erythrocytes and whole peripheral blood from human donors were chosen to test the compounds listed above.

Erythrocytes non-separated from plasma were incubated during one and 24 hours in the solutions of the compounds N1, N2, N3. Our studies show that the investigated compounds improve *erythrocyte resistance to acid hemolysis*. Maximum hemolysis was observed between 5 and 6,5 min (compare to 4.5 and 5 min for corresponding control samples). Further incubation did not change the *erythrocyte resistance comparing to that for one hour though the total* time of hemolysis slightly increased to 9 and 11 min, respectively.

We find that the total catalase and NO - synthase (NOS) activity depends on the time of incubation in the studied compounds. It turns out that activity of catalase in the presence of Spirokarbon decreases almost 4 times, if before hemolysis erythrocytes have not been washed from the residue of this substance, whereas for washed erythrocytes activity of studied enzyme reduces, but only to 22%. Similar effects were found for the compound #2. Compound #3 increases the corresponding activity on 10%. It is known that these enzymes are localized mostly in Peroxisomes and thus the observed changes in catalase activity might be due to the stabilization of membrane structures and worsening of the enzyme extraction into the solution under the simultaneous actions of the hemolytic and Spirokarbon or compound N2. Therefore one can conclude that during the erythrocyte hemolysis at presence of Spirokarbon the catalase remains to be attached to the membrane structures and does not move into the soluble fraction. A tendency to the increase of the hydrogen peroxide content in hemolyzates, which is an active Oxygen metabolite is observed. This latter well correlates with the observed changes of catalase activity.

At given experimental conditions we did not detect any reliable evidence for the difference in total NOS-synthase activity.





## ДОЗОЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА НА БЕЛКИ КРОВИ В ИЗОЛИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ

Дюбко<sup>1,2</sup> Т.С., Зинченко<sup>1</sup> В.Д., Козин<sup>3</sup> Ю.И., Рошаль<sup>4</sup> А.Д., Соколик<sup>2</sup> О.А.,  
Белых<sup>1</sup> И.А., Буряк<sup>1</sup> И.А., Бондаренко<sup>5</sup> О.Б., Горячая<sup>1</sup> И.П., Кшимински<sup>6</sup> К.

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

<sup>2</sup>ГНУ НТК "Институт монокристаллов НАН Украины", Харьков, Украина

<sup>3</sup>Харьковский медицинский университет, Харьков, Украина

<sup>4</sup>НИИ химии при Харьковском Национальном университете им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина

<sup>5</sup>Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, Харьков; Украина

<sup>6</sup>Университет Гданьска, Польша

e-mail: tdyubko@mail.ru

Поскольку озон обладает широким спектром воздействия на организм, актуальным является изучение механизмов его влияния на компоненты крови, в том числе на сывороточные белки, как в изолированном состоянии, так и после введения озона в организм.

Целью данной работы было выяснение возможностей использования малых доз озона для активации биологических функций на молекулярном и организменном уровнях. В работе исследовали влияние озонированного физиологического раствора (ОФР) на изолированные белки и плазму крови, а также влияние введения в организм ОФР или озонированной аутокрови.

Применяли методы спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии, хемилюминесценции и электрофореза в ПААГ.

Установлено, что действие озона на изолированные белки неферментной (сывороточные альбумины человека (САЧ) и быка) и ферментной (ацетилхолинэстеразу (АХЭ) из сыворотки крови лошади) природы приводит к изменению их спектральных характеристик, что свидетельствует о конформационных перестройках и сопровождается ингибированием или стимуляцией ферментативной активности. Показано, что степень изменения структурного состояния и ферментативной активности водорастворимых белков зависит от концентрации озона в растворе и от исходного состояния белка. Согласно спектральным данным, необратимые нарушения структурного состояния белков, сопровождающиеся разрушением ароматических колец, наблюдаются при содержании озона в среде более 0,6 г/м<sup>3</sup>. Высокие (более 0,4 г/м<sup>3</sup>) концентрации озона вызывают ингибирование, а малые (0,2 г/м<sup>3</sup>) - повышение ферментативной активности АХЭ. Эксперименты на предварительно замороженной АХЭ показали, что чувствительность белка к последующей обработке озоном зависит от примененного режима замораживания и температуры хранения. Наибольшей чувствительностью к действию возрастающих доз озона обладает фермент, который подвергался предварительному "быстрому" замораживанию до -196 °С и хранился при этой температуре по сравнению с "медленно" замороженным, хранившимся при умеренно низкой температуре (-18 °С). При обработке размороженной АХЭ малыми дозами озона ее ферментативная активность повышается на 7,5±2,3% по сравнению с контрольными образцами. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения озона в малых дозах в качестве активатора восстановления утраченных свойств замороженного биологического материала после деконсервации.

ОФР или озонированную *in vitro* аутокровь вводили клинически здоровым добровольцам и пациентам с различными патологиями. В исследовании принимали участие 27 пациентов в возрасте от 20 до 74 лет, находящихся на амбулаторном лечении в Институте озонотерапии и медоборудования, г. Харькова. Введение озона в организм приводит к изменению спектра белков сыворотки крови. При этом, внутривенное введение озонированной аутокрови оказывает более выраженный стимулирующий эффект на выработку сывороточных белков, чем ОФР. Изменение белкового спектра сыворотки (плазмы) крови под влиянием озонирования может рассматриваться в качестве одного из механизмов терапевтического воздействия озона. Причиной обнаруженной неодинаковой устойчивости САЧ к действию озона при исследованных патологиях может быть различная степень нагруженности молекул альбумина токсическими лигандами.

Изучение общей антиоксидантной активности плазмы крови (АОА) показало, что вне зависимости от вида процедуры (введение ОФР или озонированной аутокрови) влияние озона на удельную константу тушения хемилюминесценции (K<sub>CL</sub>) плазмы имеет сходство. После первой процедуры озонирования наблюдалось наибольшее снижение K<sub>CL</sub>, которая возрастала по мере увеличения количества проведенных процедур и к концу курса лечения достигала исходного уровня либо превышала его. Кроме того, параметр K<sub>CL</sub> зависел от пола и возраста пациентов, а также от тяжести течения заболевания. Полученные результаты дают основание полагать, что на первых процедурах введенные в организм больных озониды и продукты окисления биомолекул используются для восстановления антиоксидантной защиты пораженных органов и тканей. К концу курса озонотерапии (10-12 процедура), когда органная антиоксидантная защита восстановлена, отмечается рост показателей общей АОА.



**DOSE-DEPENDENT OZONE EFFECT ON BLOOD PROTEINS IN ISOLATED STATE  
AND UNDER OZONE INTRODUCTION INTO ORGANISM**

Dyubko<sup>1,2</sup> T.S., Zinchenko<sup>1</sup> V.D., Kozin<sup>3</sup> Yu. I., Roshal<sup>4</sup> A.D., Sokolik<sup>2</sup> O.A., Belykh<sup>1</sup> I.A., Buriak<sup>1</sup> I.A.,  
Bondarenko<sup>5</sup> O.B., Goryachaya<sup>1</sup> I.P., Kshiminski<sup>6</sup> K.

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup> SSI "Institute for Single Crystals" of the NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>3</sup> Kharkov State Medical University, Kharkov, Ukraine

<sup>4</sup> Research institute of chemistry attached to V.N. Karazin Kharkov National University;

<sup>5</sup> A. Usikov Institute of Radio Physics and Electronics of the NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>6</sup> Gdansk University, Faculty of Chemistry, Poland

e-mail: tdyubko@mail.ru

Since ozone possesses a wide spectrum of effects on an organism, it is important to study the mechanisms of its effect on blood components, including serum proteins in isolated state and after ozone introduction into organism.

The aim of our work was clarification of potentialities of low ozone doses use for activation of biological functions at molecular and organism level. We studied the effects of ozonated physiological saline (OPS) on isolated proteins and blood plasma and also an effect of introduction of OPS or ozonated aytoblood into organism. The methods of spectrophotometry, fluorescent spectroscopy, chemiluminescence and electrophoresis in PAAG were used.

It has been established, that ozone effect on isolated non-enzymatic proteins (human (HSA) and bovine serum albumins) end enzymes (acetylcholinesterase (AHE) from horse blood) resulted in changes of their spectral characteristics, indicating to conformational rearrangement. This effect was accompanied by inhibition or stimulation of enzymatic activity. It has been shown, that degree of changes of water-soluble proteins' structural state and enzymatic activity depended on ozone concentration in solution and initial state of protein.

According to the spectral data, irreversible abnormalities of proteins' structural state, accompanied by destruction of aromatic rings, were observed at ozone content in medium  $>0.6 \text{ g/m}^3$ . High ozone concentrations ( $>0.4 \text{ g/m}^3$ ) resulted in inhibition of AHE enzymatic activity, and low concentrations – in enhancement of it. Experiments on previously frozen AHE have shown, that sensitivity of protein to following ozone treatment depended on freezing conditions and storage temperature. The enzyme, "rapidly" frozen to  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  and stored at this temperature, was more sensitive to increasing ozone doses comparatively to "slowly" frozen one, stored at moderately-low temperature ( $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ). After the treatment of the frozen AHE with low ozone doses its enzymatic activity increased by  $7,5 \pm 2,3 \%$  comparatively to the control samples. Obtained results prove, that use of ozone in low doses, as an activator of lost properties of frozen biological material after deconservation is very promising.

OPS or ozonated *in vitro* autoblood were also introduced into clinically healthy volunteers and patients with different pathologies. In this research 27 patients at the age of 20-74, undergoing medical treatment at the Institute of ozonotherapy and medical equipment (Kharkov), took part. Introduction of ozone into organism resulted in change of serum proteins composition. At the same time, intravenous introduction of ozonated autoblood had more appreciable stimulating effect on proteins production, than OPS.

The change of protein composition of blood serum (plasma) under ozonation may be considered as one of the mechanisms of therapeutical ozone effect. A cause of different resistance of HSA under studied pathologies can consist in different degree of toxic ligands bounded to albumin molecules.

Study of total plasma antioxidant activity (AA) showed, that independently on a type of procedure (introduction of OPS or ozonated autoblood), ozone effect on specific constant of chemiluminescence quenching ( $K_{CL}$ ) of blood plasma was similar. The maximum decrease of  $K_{CL}$  was observed after the first ozonation procedure. Further, the  $K_{CL}$  increased with number of procedures and reached the initial level or exceeded it towards the end of treatment course. Moreover, the  $K_{CL}$  parameter was dependent on the sex and age of patients, and also on severity of the disease.

The obtained results suggest, that ozonides and products of biomolecules'oxidation, introduced into organisms of patients during the first procedures, were used for recovery of antioxidant defense of damaged organs and tissues. Towards the end of ozonotherapy course (10<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> procedure), when the antioxidant defense of organs was recovered, the increase of AA indexes was observed.

Thus, the made studies indicates to great potentialities of low ozone doses application for activation of biological functions at the level of isolated proteins and cells, as well as at organism level.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о широких возможностях применения малых доз озона в качестве активатора биологических функций как на уровне изолированных белков или клеток, так и на уровне организма.



**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ  
РИЗОБАКТЕРИЙ *PAENIBACILLUS POLYMUХА* 1465**

Егоренкова И.В.<sup>1</sup>, Фомина А.А.<sup>2</sup>, Трегубова К.В.<sup>1</sup>, Коннова С.А.<sup>2</sup>, Игнатов В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия,  
e-mail: room406@ibppm.sgu.ru

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия,  
e-mail: KonnovaSA@info.sgu.ru

Бактериальные экзополисахариды (ЭПС) представляют группу очень перспективных стимуляторов защитных сил организма, повышающих его устойчивость ко многим бактериальным и вирусным инфекциям, а также к лучевым воздействиям. Они разнообразны по структуре и физико-химическим свойствам и в большинстве своем малотоксичны или нетоксичны. Исследованиями ряда ученых показано, что ЭПС, синтезируемые бактериями *Paenibacillus polymyxa*, обладают антивирусными и противоопухолевыми свойствами, оказывают профилактическое действие при экспериментальной стафилококковой инфекции и пролонгируют действие лекарственных веществ, повышая неспецифическую реактивность организма. Ранее нами была исследована биологическая активность ЭПС *P. polymyxa* в отношении морфологии корневых волосков проростков пшеницы и было установлено, что ЭПС *P. polymyxa* 1465 (ЭПС<sub>1465</sub>) достоверно увеличивали количество деформаций по сравнению с контролем (в 7 раз) и были более активны среди других проанализированных нами штаммов.

Цель данной работы состояла в изучении некоторых физико-химических и иммуномодулирующих свойств изолированных ЭПС азотфиксирующих бактерий *P. polymyxa* 1465 (ATCC 8523). Культуральную жидкость, после выращивания бактерий в течение 3 суток в периодической культуре на жидкой питательной среде с 3% глюкозы или сахарозы, разбавляли водой, центрифугировали, супернатант концентрировали в вакууме до первоначального объема, ЭПС осаждали ацетоном и лиофильно высушивали. Вязкость 0,1% растворов ЭПС<sub>гл</sub> в среднем составила 4,5 мм<sup>2</sup>/с, ЭПС<sub>сах</sub> – 1,4 мм<sup>2</sup>/с. На основании исследований, проведенных методами гель- и ионообменной хроматографии, электрофореза в ПААГ, ТСХ и ГЖХ, ИК- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, можно заключить, что ЭПС<sub>1465</sub> являются нерегулярными по структуре, гетерогенными по молекулярной массе (7×10<sup>4</sup>–2×10<sup>6</sup> Да) и заряду полисахаридами (содержащими до 72% углеводов и 1,6% белка), в состав которых входят глюкоза, манноза, галактоза и уроновые кислоты. Углеводные цепи полимеров образованы как α-, так и β-гликозидными связями. По данным ГЖХ-масс-спектрометрии, ЭПС<sub>1465</sub> является разветвленным гетерогликаном, основная цепь которого образована (1→4)- и (1→6)- связанными остатками гексоз в пиранозной форме.

Активность ЭПС в отношении иммунной системы исследовали на модели фагоцитоза, одного из главных и ранних механизмов естественного иммунитета. Перитонеальные макрофаги (ПМФ) выделяли из организма мышей по общепринятой методике и использовали для моделирования процесса фагоцитоза в течение 1, 2, 4, 6 и 24 ч. Установлено, что внесение ЭПС<sub>1465</sub> в концентрации 1 мкг/мл в культуру ПМФ перед началом фагоцитоза приводило к увеличению количества активированных макрофагов по сравнению с контролем. Фагоцитарные индексы (ФИ) на всех этапах фагоцитоза *Escherichia coli* Ca 53 были выше по сравнению с контролем на 17–30 %. До 4 ч процесса фагоцитоза ЭПС<sub>сах</sub> показал максимальный активирующий эффект, который был выше, чем у ЭПС<sub>гл</sub> и продигозана, использованного в качестве положительного контроля. Отмечено сильное стимулирующее действие ЭПС<sub>гл</sub> на фагоцитоз эшерихий к 6 ч процесса, однако индексы завершенности фагоцитоза (ИЗФ) имели отрицательные значения при добавлении к макрофагам ЭПС в отличие от контроля и продигозана. Полученные данные характеризуют процесс фагоцитоза *E. coli* Ca 53 как незавершенный, что свидетельствует о том, что ЭПС<sub>1465</sub> не влияют на механизмы киллинга бактерий.

При изучении функционально-метаболического состояния лейкоцитов с использованием спектрофотометрического варианта теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), показано, что ЭПС<sub>1465</sub> в интервале доз 0,01-10 мкг/мл не оказывают влияния на продукцию активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами, кроме того, при всех дозах ЭПС<sub>сах</sub> и 0,01 мкг/мл ЭПС<sub>гл</sub> содержание АФК было ниже контроля. В то же время при всех исследуемых дозах ЭПС<sub>гл</sub> незначительно активировал миелопероксидазу, обеспечивающую альтернативный механизм кислородзависимого киллинга. Было установлено, что препараты ЭПС<sub>1465</sub> в дозе 0,01 мкг/мл стимулировали продукцию лимфоцитами оксида азота, наибольший эффект вызывал ЭПС<sub>сах</sub> (в 3,2 раза по сравнению со спонтанной продукцией), что свидетельствовало об активации ЭПС микробицидных процессов внутри клеток. Кислороднезависимый механизм киллинга бактерий оценивали по активности кислой фосфатазы в нейтрофилах периферической крови человека. Показано, что ЭПС активировали кислую фосфатазу, в большей степени – ЭПС<sub>гл</sub> в концентрациях 0,01 и 1 мкг/мл (в 2,0 и 1,8 раза по сравнению с контролем, соответственно).

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что ЭПС *P. polymyxa* 1465 способны к активации иммунных клеток, что открывает перспективу их использования в качестве биологически активных веществ, обладающих иммуностропным действием.



**PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXOPOLYSACCHARIDES  
OF THE RHIZOBACTERIUM *PAENIBACILLUS POLYMYXA* 1465**

Yegorenkova I.V.<sup>1</sup>, Fomina A.A.<sup>2</sup>, Tregubova K.V.<sup>1</sup>, Konnova S.A.<sup>2</sup>, Ignatov V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia  
e-mail: room406@ibppm.sgu.ru

<sup>2</sup>Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia,  
e-mail: KonnovaSA@info.sgu.ru

Bacterial exopolysaccharides (EPSs) are a group of very promising stimulants of host defenses that increase resistance to many bacterial and viral infections and also to radiation effects. EPSs have diverse structures and physical-chemical properties, and most of them are low-toxic or nontoxic. Several investigators have shown that the EPSs of *Paenibacillus polymyxa* have antiviral and antitumor properties, exert a prophylactic effect during experimental infection with *Staphylococcus*, and prolong drug action, increasing the host's nonspecific responsiveness. Previously, we have examined the biological activity of the *P. polymyxa* EPSs toward the morphology of wheat-seedling root hairs, and we have found that the EPSs of *P. polymyxa* 1465 (EPS<sub>S1465</sub>) brought about a significant (sevenfold) increase in the number of deformations, as compared with the control, and were the most active among the EPSs of other strains tested by us.

The aim of this work was to examine some physical-chemical and immunomodulating properties of isolated EPSs from the nitrogen-fixing bacterium *P. polymyxa* 1465 (ATCC 8523). After bacteria had been batch-cultivated for 3 days in a liquid nutrient medium containing 3% glucose or sucrose, the culture liquid was diluted with water and centrifuged. The supernatant liquid was concentrated in vacuum to its original volume, and the EPSs were acetone-precipitated and lyophilized. On the average, the viscosity of 0.1% EPS<sub>GL</sub> solutions was 4.5 mm<sup>2</sup>/s, and that of 0.1% EPS<sub>SUC</sub> solutions was 1.4 mm<sup>2</sup>/s. On the basis of studies by gel and ion-exchange chromatography, PAGE, TLC, GLC, and IR and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, one can conclude that EPS<sub>S1465</sub> are polysaccharides (containing up to 72% carbohydrates and 1.6% protein) that are composed of glucose, mannose, galactose, and uronic acids; they are irregular in structure and heterogeneous in molecular mass ( $7 \times 10^4$ – $2 \times 10^6$  Da) and charge. The polymers' carbohydrate chains are formed by  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycosidic linkages. GLC-mass spectrometry showed that EPS<sub>S1465</sub> was a branched heteroglycan whose main chain was composed of (1 $\rightarrow$ 4)- and (1 $\rightarrow$ 6)-linked hexose residues in the pyranose form.

EPS activity toward the immune system was investigated by using phagocytosis, a major and early mechanism of natural immunity, as a model. Peritoneal macrophages (PMPs) were isolated from mice by a conventional procedure and were used for modeling the phagocytosis process for 1, 2, 4, 6, and 24 h. We found that addition of 1  $\mu$ g/ml EPS<sub>S1465</sub> to a PMP culture before the start of phagocytosis increased the number of activated macrophages, as compared with the control. At all stages of phagocytosis of *Escherichia coli* Ca 53, the phagocytic indices (PIs) were higher than the control values by 17–30%. Within 4 h of phagocytosis, EPS<sub>SUC</sub> produced the maximal activating effect, which was greater than those exerted by EPS<sub>GL</sub> and prodigiosan, used as a positive control. By 6 h, we noted a strong promoting effect of EPS<sub>GL</sub> on the phagocytosis of *E. coli*; however, when the EPSs were added to the macrophages, the indices of phagocytosis completion (IPhC) had negative values, in contrast to the control and prodigiosan cases. The obtained data characterize the phagocytosis of *E. coli* Ca 53 as being incomplete, attesting that EPS<sub>S1465</sub> do not affect the mechanisms responsible for killing of bacteria.

A study of the functional-metabolic state of leukocytes by using a spectrophotometric version of the nitroblue tetrazolium reduction test (the NBT test) showed that EPS<sub>S1465</sub> at 0.01–10  $\mu$ g/ml did not affect the production of active oxygen species (AOS) by PMPs; moreover, at all doses of EPS<sub>SUC</sub> and at 0.01  $\mu$ g/ml EPS<sub>GL</sub>, AOS content was lower than the control value. Yet, at all doses tested, EPS<sub>GL</sub> moderately activated myeloperoxidase, which provides for an alternative mechanism of oxygen-dependent killing. EPS<sub>S1465</sub> at 0.01  $\mu$ g/ml promoted nitric oxide production by lymphocytes; the most effect was produced by EPS<sub>SUC</sub> (3.2-fold, as compared with spontaneous production), attesting to the activation by EPSs of microbicidal processes inside the cells. The oxygen-independent mechanism of killing of bacteria was assessed by the activity of acid phosphatase in human peripheral blood neutrophils. The EPSs were found to activate acid phosphatase, with the most effect being exerted by EPS<sub>GL</sub> at 0.01 and 1  $\mu$ g/ml (2.0- and 1.8-fold, respectively, as compared with the control).

Overall, the obtained results indicate that the EPSs of *P. polymyxa* 1465 can activate immune cells. This fact opens up the prospect of their use as immunotropic biologically active substances.



## ПРИМЕНЕНИЕ DOCKING И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛОК – ЛИГАНДНОГО КОМПЛЕКСА

Ермакова<sup>1</sup> Е., Несмелова<sup>2</sup> И., Зуев<sup>1</sup> Ю., Mayo<sup>2</sup> К.

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра РАН, Казань, Россия  
e-mail: ermakova@mail.knc.ru

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis MN,

Современная фармакология идет по пути разработки новых лекарственных средств на основе полипептидов, причем прототипами таких лекарственных средств являются природные субстраты и ингибиторы. Ключевой проблемой в разработке таких потенциальных компонентов является предсказание энергии связывания лигандов с целевой молекулой. Поэтому определение структуры комплекса и точный расчет энергии взаимодействия макромолекул является важной проблемой в биологии с множеством применений в медицине и фармакологии.

Docking представляет собой достаточно быстрый метод определения структуры и энергии образования комплексов, но он не обеспечивает необходимую точность расчетов и не учитывает внутримолекулярную подвижность белков. Молекулярная динамика (МД) обеспечивает необходимую точность, но этот метод слишком медленный для поиска новых комплексов. Комбинированное применение этих методов позволит избежать недостатков каждого из них. В данной работе совместное применение методов docking и МД было использовано для изучения природного комплекса полисахарид связывающего лектина галектина с двумя молекулами лактозы.

Мы использовали программу HADDOCK для одновременного докинга двух молекул лактозы к димеру галектина и таким образом получили набор структур комплекса, часть из них затем была использована для построения МД траектории. Молекулярно-динамическое моделирование было выполнено с помощью программы NAMD 2.6 с потенциалами ragam27 (CHARMM) для белка и carbohydrate для лактозы. МД выполнено для NPT ансамбля с периодическими граничными условиями. Энергия взаимодействия рассчитывалась с помощью molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area (MM/ PBSA) метода.

Энергия взаимодействия определялась по формуле:

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - G_{prot} - G_{ligand}$$

Полная энергия каждого состояния рассчитывалась по формуле:

$$G = E_{MM} + G_{PBSA} - TS$$

где  $E_{MM}$  молекулярно - механическая энергия,  $G_{PBSA}$  учитывает энергию сольватации,  $TS$ - энтропийный вклад.

Был рассчитан вклад каждого аминокислотного остатка в общую энергию взаимодействия и проанализирована роль отдельных аминокислотных остатков в образовании комплекса.

Полученные результаты могут быть полезны для детального понимания взаимодействия двух биомолекул и для разработки новых молекул с сильным сродством к галектину.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и гранта РФФИ 09-03-00778.*



**COMBINING DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS TO STUDY PROTEIN – LIGAND COMPLEX FORMATION**

*Ermakova<sup>1</sup> E., Nesmelova<sup>2</sup> I., Zuev<sup>1</sup> Yu., Mayo<sup>2</sup> K.*

<sup>1</sup>Kazan institute of Biochemistry and Biophysics RAS, Kazan, Russia  
e-mail: ermakova@mail.knc.ru

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis MN

Modern pharmacology often uses peptides as leading compounds during the drug discovery process, having native substrates and inhibitors as prototypes. A key step in the molecular engineering of such potent compounds is the prediction of the energetics of their binding to the macromolecular targets. Therefore, the accurate description of protein-ligand binding energies and configurations is an important problem in molecular biology with many applications in medicine and pharmacology.

Docking is enough fast method for modeling of ligand – protein complexes but it has a limited accuracy and does not account for a flexibility of proteins. Molecular dynamics (MD) simulation method provides the required accuracy but it is too slow for searching binding positions. An appropriate combination of the two methods could avoid the shortcomings associated with each, thus offering a better approach to the protein-ligand binding problem. Here we used a combined docking-MD approach to study a complex galectin with two lactose molecules. Galectin is a member of a protein family historically characterized by its ability to bind carbohydrates containing a terminal galactosyl residue.

We use the HADDOCK program to simultaneous docking of two lactose molecules to galectin dimer and to generate a set of protein-ligand binding configurations, part of them was then refined in MD simulations. For these systems, we examine the binding configuration in detail and calculate the binding free energy. MD simulations are carried out by using the NAMD code, version 2.6 with the PARAM27 version of the CHARMM force field for protein and carbohydrate force field for lactose. MD simulations were performed by using an NPT ensemble with periodic boundary conditions. Absolute binding free energies were calculated by molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area (MM/ PBSA) methodology.

Binding free energy ( $\Delta G_{bind}$ ) was calculated as follows:

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - G_{prot} - G_{ligand}$$

Free energy (G) of each state was calculated as follows:

$$G = E_{MM} + G_{PBSA} - TS$$

where  $E_{MM}$  is the molecular mechanical energy,  $G_{PBSA}$  is the contributions from solvation energy, and TS is the entropic contribution of the solute.

Free energy decomposition per residue was obtained to evaluate the contribution of each residue to the total free energy and the role of protein aminoacids in ligand binding was analyzed.

Our results might be helpful for understanding the detailed interactions between the two molecules, and for further design of new molecules with strong affinity to galectin.

*The support of Russian Academy of Sciences for Basic Research under the program "Molecular and Cellular Biology" and Russian Foundation for Basic Research Grant N 09-03-00778-is acknowledged.*



## ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА У КРЫС ПРИ ЭТАНОЛОВОЙ МОДЕЛИ ЯЗВООБРАЗОВАНИЯ

Фалалеева<sup>2</sup> Т.М., Дворщенко Е.В.<sup>2</sup>, Самонина<sup>1</sup> Г.Е., Береговая<sup>2</sup> Т.В.

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Киевский национальный университет имени Т.Г. Шевченко, Киев, Украина  
e-mail: tfalalयेeva@mail.ru

Изучению семейства глипролинов, представленного короткими пролин- и глицинсодержащими пептидами PGP, GP, PG и др., сегодня уделяется особое внимание в связи с перспективой разработки на их основе природных гастропротекторов.

На разных моделях язвообразования желудка, вызванных стрессом, этанолом, индометацином, перевязкой пилоруса было показано, что PGP, GP, PG уменьшали площадь поражения слизистой оболочки желудка. Данный эффект был ассоциирован с увеличением кровотока в слизистой оболочке желудка и уменьшением секреции соляной кислоты в нем. Однако, данные о влиянии PGP, GP, PG на процессы перекисного окисления липидов, которые являются одним из главных механизмов поражения слизистой желудка, отсутствуют.

Таким образом, целью данной работы было исследовать влияние PGP, GP, PG на образование продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в слизистой оболочке желудка у крыс при этаноловой модели язвообразования.

Исследования проведены в условиях острого эксперимента на 36 белых крысах самцах линии Вистар весом 180-220 г. За сутки до проведения эксперимента животных подвергали пищевой депривации со свободным доступом к воде. Повреждения слизистой оболочки желудка у крыс вызывали внутрижелудочным введением 1 мл/200 г веса 96° этилового спирта. PGP, PG, GP вводили внутривентриально в дозе 3,7 мкмоль/кг за 15 минут до введения этанола. Через 1 час после введения этанола животных подвергали эвтаназии. Желудок разрезали по малой кривизне, выворачивали слизистой наружу и тщательно промывали. После чего на гастроскопе при трансиллюминационном освещении при помощи лупы (x4) проводили тщательный осмотр. Подсчитывали площадь язв и длину эрозий. Про- и антиоксидантное состояние слизистой оболочки желудка оценивали по содержанию в гомогенате слизистой оболочки диеновых конъюгатов, ТБК-активных продуктов, шиффовых оснований и активности ферментов антиоксидантной системы супероксиддисмутазы и каталазы.

Установлено, что этанол вызывал развитие язв площадью  $9,09 \pm 1,35 \text{ мм}^2$ . В среднем длина эрозий в одном желудке составляла  $6,89 \pm 1,44 \text{ мм}$ . Этанол существенно приводил к интенсификации процессов перекисного окисления липидов, что проявлялось в возрастании содержания в слизистой оболочке желудка крыс диеновых конъюгатов, ТБК-активных продуктов, шиффовых оснований на 85%, 52% и 77% соответственно. При этом активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты уменьшалась: супероксиддисмутазы – на 35,3%, каталазы – на 34,0%. Профилактическое введение PGP, GP, PG приводило к уменьшению площади язвенных поражений в слизистой оболочке желудка, вызванных этанолом, на 55% ( $p < 0,01$ ), 81% ( $p < 0,001$ ) и 85% ( $p < 0,001$ ) соответственно. Глипролины так же уменьшали длину желудочных эрозий: PGP на 61% ( $p < 0,05$ ), GP – 83% ( $p < 0,01$ ), PG – 77% ( $p < 0,01$ ). Уменьшение язвенно-эрозивных поражений при профилактическом введении PGP коррелировало с уменьшением содержания продуктов липопероксидации до контрольных величин. При этом активность супероксиддисмутазы статистически достоверно не отличалась от аналогичного показателя в контроле, а активность каталазы имела тенденцию к нормализации. Аналогичное влияние на про- и антиоксидантное состояние слизистой оболочки желудка оказывал PG в условиях развития этаноловых повреждений. Только по отношению к активности каталазы PG оказался более эффективным, чем PGP. Наиболее слабое влияние на про- и антиоксидантное состояние слизистой оболочки желудка крыс оказывал GP, хотя по отношению к эрозивно-язвенным поражениям он выступал как наиболее сильный гастропротектор.

Сделан вывод, что выраженное профилактическое действие PGP и PG на развитие эрозивно-язвенных поражений, вызванных этанолом, обусловлено их антиоксидантными свойствами. Что касается GP, его гастропротекторное действие, очевидно, обусловлено другими не менее важными свойствами семейства глипролинов, а именно, угнетать базальную и стимулированную секрецию соляной кислоты, усиливать базальную и стимулированную секрецию бикарбонатов, усиливать кровоток в слизистой оболочке желудка и др.



**THE INFLUENCE OF GLYPROLINES ON FORMATION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS IN GASTRIC MUCOSA OF RATS AFTER ETHANOL INDUCED ULCERATION**

*Falalyeyeva T.<sup>1</sup>, Dvorshchenko C.<sup>1</sup>, Samonina G.<sup>2</sup>, Beregova T.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine  
e-mail: tfalalyeyeva@mail.ru

<sup>2</sup>M.V. Lomonosow Moscow State University, Moscow, Russia.

For today special attention is given to study of glyproline family, presented by short prolin - and glycine consisting peptides PGP, GP, PG, etc., in connection with prospect of development of natural gastro protectors on their basis.

On different models of gastric lesions induced by stress, ethanol, indomethacin and pylorus ligation it was demonstrated that PG, GP, PGP decreased the area of lesions and this effect was accompanied by increased gastric mucosa blood flow and decreased gastric acid secretion. However, the data about the influence of PG, GP, PGP on lipid peroxidation process which are one of the main mechanism in development of gastric injury are absent.

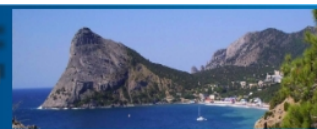
So the aim of the study was to investigate the action of PGP, GP, PG on formation of lipid peroxidation products and activity of enzymes of antioxidant defence in gastric mucosa of rats after ethanol induced ulceration.

The study was carried out in acute experiments on 36 Male Wistar rats, weighting 180-220 g. The animals were deprived of food for 24 hr prior to the experiments with an easy approach to water. Gastric mucosa damages in rats were induced by intra gastric injection of 1 ml 96<sup>0</sup>/200g ethanol. PGP, PG, GP were given intraperitoneally in dose 3,7 µM/kg (-1) body weight 15 min before injection of ethanol. One hour after ethanol administration animals were subjected to euthanasia. We cut up their stomachs along the small curvature and carefully washed out. Then on gastroscope at transillumination by means of a magnifier (x4) we spent careful examination. We counted up the area of ulcers and length of erosions. Pro- and antioxidative state of gastric mucosa was estimated by the contents of conjugated dienes, thiobarbituric acid reactive substances (TBA), Shiff bases and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in homogenate of mucosa.

It was established that ethanol caused development of ulcers the area of which was 9,09±1,35 mm<sup>2</sup>. Average length of erosions in one stomach was 6,89±1,44 mm. Ethanol essentially led to an intensification of lipid peroxidation processes in gastric mucosa that was shown in increase the content of conjugated dienes, TBA, Shiff bases by 85%, 52% and 77% accordingly. Thus activity of key enzymes of antioxidant protection was decreased: superoxide dismutase – by 35,3%, catalase – by 34,0%. Prophylactic injection of PGP, GP, PG decreased the area of ulcers in gastric mucosa evoked by ethanol by 55% (p<0,01), 81%(p<0,001) and 85% (p<0,001) accordingly. Glyprolines also reduced the length of gastric erosions: PGP by 61% (p<0.05), GP - 83% (p <0.01) and PG - 77% (p<0.01). Reducing erosions and ulcer lesions after preventive PGP administration correlated to the decrease in the content of the lipoperoxidation products to control values. The activity of superoxide dismutase did not significantly different from control, while catalase activity was a trend towards normalization. A similar effect on the pro-, and antioxidant state of gastric mucosa PG has after development of ethanol injury. Only in relation to catalase activity of PG was more effective than the PGP. The weakest influence on the pro-, and antioxidant state of rat gastric mucosa has GP, although in relation to the erosive-ulcerative lesions, it appeared as the strongest gastroprotector.

It is concluded that the strong preventive action of PGP and PG on the development of erosive-ulcerative lesions caused by ethanol, resulting from their antioxidant properties. With respect to GP, it gastroprotective action, apparently due to other of no lesser importance properties of gliproline family, namely, to suppress basal and stimulated secretion of hydrochloric acid, to enhance basal and stimulated secretion of bicarbonate and increase the blood flow in the gastric mucosa, etc.





## РАЗРАБОТКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ДОНОРОВ NO

*Федоров<sup>а</sup> Б.С., Фадеев<sup>а</sup> М.А., Коновалова<sup>а</sup> Н.П., Сашенкова<sup>а</sup> Т.Е., Блохина<sup>а</sup> С.В.,  
Гидаспов<sup>б</sup> А.А., Бахарев<sup>б</sup> В.В.*

<sup>а</sup> Институт проблем химической физики РАН, Московская обл.Черноголовка, Россия  
e-mail: boris-45@inbox.ru; deltaxxx@inbox.ru

<sup>б</sup> Самарский государственный технический университет, г.Самара

На протяжении ряда лет в лаборатории биологически активных веществ и лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей ИПХФ РАН ведутся работы по синтезу и исследованию антиметастатической и противоопухолевой активности биогенных соединений-доноровNO. Эти соединения в комбинированной цитостатической терапии в сочетании с известными цитостатиками проявляют высокий терапевтический эффект. Экспериментально показано, что соединения из класса нитратов спиртов и гидроксамовых кислот могут проявлять высокую эффективность в цитостатической комбинированной терапии при лейкемии P-388. В частности использование комбинации циклофосфана с аспарагилгидроксамовой кислотой позволяет выжить 50% животных, при этом увеличение средней продолжительности жизни у остальных животных составляет 350 % по сравнению с животными в контрольной группе. Использование комбинации цисплатина с аспарагилгидроксамовой кислотой позволяет выжить 75 % животных, а увеличение средней продолжительности жизни 25% животных составляет 500%. Наконец, использование в комбинированной цитостатической терапии цисплатина и мальгидроксамовой кислоты позволяет выжить 100% животных в опытной группе. Важным моментом при этом оказалось то, что и донор NO и цитостатик берутся в минимальных количествах, когда по отдельности ни один из них не проявляют терапевтического эффекта. Дальнейшие работы в этом направлении позволили нам синтезировать вещество-донор NO, которое в монотерапии рака позволяет тормозить процесс метастазирования при экспериментальной карциноме легких Льюис на 98%. Таким веществом оказался замещенный 1,3,5-триазин с хлординитрометильной группировкой. На сегодняшний день экспериментально установлено, что наилучшими носителями функциональных группировок – доноров NO являются пиридин и симм. триазин, а наилучшими донорами NO – динитрометильная группа.

### **Литература:**

1. Б.С.Федоров, М.А. Фадеев, Н.П.Коновалова, С.М.Алдошин, Т.Е.Сашенкова, М.В.Ларюкова Патент РФ № 2295517. Производные дикарбоновых кислот, Ингибиторы метастазов и средства повышающие химиотерапевтическую активность противоопухолевых препаратов, Способ усиления эффективности цитостатиков, Способ ингибирования процесса метастазирования. Заявка на выдачу Европейского, Евразийского, Американского, Японского и Корейского патентов РСТ 2006/00330.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### DEVELOPMENT OF ANTICANCER DRUGS BASED ON BIOGENIC COMPOUNDS - NO DONORS

*Fedorov B.S., Fadeev M.A., Konovalova N.P., Sashenkova T.E., Blokhina S.V.*

Institute of Problems of Chemical Physics RAS, Chernogolovka, Moscow region, Russia,  
e-mail: boris-45@inbox.ru; deltaxxx@inbox.ru

For several years, research groups from the laboratory of biologically active compounds and the laboratory of experimental chemotherapy of tumors of IPCP RAS have been synthesizing and studying antimetastatic and anticancer activity of biogenic compounds – NO donors. These compounds show high therapeutic effect in cytostatic therapy when combined with known cytostatics. It has been shown experimentally that the compounds of alcohol nitrate and hydroxamic acid families can demonstrate high efficiency against leukemia P-388 in combined cytostatic therapy. In particular, the use of a combination of cyclophosphan with aspargil-hydroxamic acid provides the survival of 50% of animals, the increase in average life of other animals being 350 % as compared with the control animals. The use of a combination of cisplatin with aspargil-hydroxamic acid provides the survival of 75 % of animals, and the increase of average life of 25% of animals is 500%. Moreover, the use of cisplatin and mal-hydroxamic acid in combined cytostatic therapy provides 100% survival of animals in the experimental group. It should be noted that both NO donor and cytostatic are taken at minimal doses when neither of them demonstrates individual therapeutic effect. Our further experiments allowed us to synthesize a NO donor which inhibits metastatic disease by 98% at experimental Lewis carcinoma of lung. This donor is 1,3,5-triazine bearing a chlorodinitromethyl group. It was found that the best functional group carriers –NO donors are pyridine and s-triazine, and the best NO donor is a dinitromethyl group.

#### **References:**

1. B.S.Fedorov, M.A.Fadeev, N.P.Konovalova, S.M.Aldoshin, T.E.Sashenkova, M.V.Laryukova. Russian patent N 2295517. Derivatives of dicarboxylic acids, Metastasis inhibitors and compounds enhancing chemotherapeutical activity of anticancer drugs, Method for enhancing cytostatics activity, Method for inhibiting metastatic disease. Application for the grant of European, Eurasian, American, Japanese, and Korean patents PCT 2006/00330.



**АТТЕНУИРОВАННЫЙ ШТАММ *YERSINIA PESTIS* С ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ КАК КАНДИДАТНАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ ВАКЦИНА С УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Федорова<sup>1,2</sup> В.А., Панькина<sup>2</sup> Л.Н., Савостина<sup>2</sup> Е.П., Саяпина<sup>3</sup> Л.В., Кузнецов<sup>2</sup> О.Е., Коннов<sup>2</sup> Н.П., Агеев<sup>4</sup> С.А., Дентовская<sup>4</sup> С.В., Шайхутдинова<sup>4</sup> Р.З., Анисимов<sup>4</sup> А.П., Кондакова<sup>5</sup> А.Н., Книрель<sup>5</sup> Ю.А., Мотин<sup>6</sup> В.Л.

<sup>1</sup> НИИ медико-ветеринарных биотехнологий, Саратов-Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

<sup>3</sup> ГосНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия

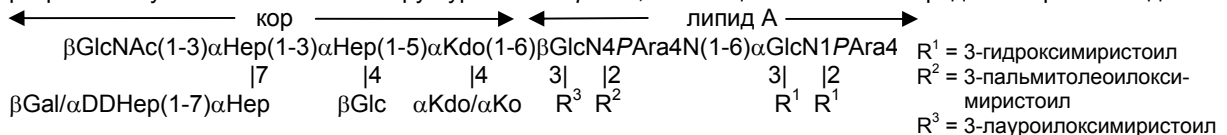
<sup>4</sup> ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская обл., Россия

<sup>5</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

<sup>6</sup> Медицинская школа Университета Техаса, Галвестон, США

Возбудитель чумы – *Yersinia pestis* – один из самых вирулентных для человека микробов, занимающий уникальное место среди патогенных бактерий. Пандемии чумы в прошлом унесли миллионы человеческих жизней. Природные очаги чумы обнаружены на всех континентах кроме Австралии, и в мире ежегодно регистрируются около 2000 спорадических случаев болезни. *Y. pestis* входит в списки наиболее вероятных агентов биотерроризма. В связи с этим вакцинопрофилактика чумы занимает одно из самых важных мест в системе мирового глобального мониторинга за распространением особо опасных инфекций. Липополисахарид (ЛПС) является основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, обеспечивающим ряд функций, ключевых для их жизнедеятельности. Среди них поддержание целостности и стабильности внешней мембраны, участие в транспорте через нее различных соединений, обеспечение устойчивости бактерий к антибиотикам, эндотоксическая и антигенная активности. Благодаря иммуномодулирующим или выраженным протективным свойствам, ЛПС нашел применение в качестве компонента препаратов для профилактики многих инфекционных заболеваний. Как и ЛПС других энтеробактерий, ЛПС чумного микроба обладает выраженной эндотоксической активностью, определяющей нежелательные поствакцинальные реакции у людей, привитых живой чумной вакциной *Y. pestis* EV НИИЭГ – единственным препаратом, лицензированным для профилактики чумы в странах СНГ.

Для выяснения молекулярных основ участия ЛПС в патогенезе чумы и создания улучшенной чумной вакцины нами с помощью химических анализов, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения установлена полная структура ЛПС *Y. pestis*, состоящего из олигосахаридного ко́ра и липида А:



Обнаружено, что строение и биологические свойства ЛПС зависят от температуры культивирования *Y. pestis*. Так, высокотоксичный гексаацильный ЛПС синтезируется при температуре окружающей среды, а низкотоксичный тетраацильный ( $\text{R}^2 = \text{R}^3 = 3\text{-гидроксиристоил}$ ) – при температуре теплокровных животных (37 °С).

С помощью сайт-направленного мутагенеза нами сконструирован нокаутный мутант вакцинного штамма EV НИИЭГ по гену лауроилтрансферазы *LpxM*. При 25 °С он синтезировал пентаацильный ЛПС ( $\text{R}^3 = 3\text{-гидрокси-ристоил}$ ), обладающий промежуточной токсичностью между гекса- и тетраацильной формами при сохранении своих иммуномодулирующих свойств. По уровню безвредности, безопасности и протективной активности мутант значительно превосходил родительский штамм в опытах по защите от экспериментальной чумы на двух биомоделях. Так, однократная подкожная инъекция клеток *LpxM*-мутанта приводила к развитию специфического иммунитета, и 57-86 % аутобредных мышей и 25-50 % морских свинок выжило при подкожном заражении  $2 \times 10^3$  и  $1,2 \times 10^3$  КОЕ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 соответственно. Иммунизация исходным штаммом EV НИИЭГ не обеспечивала выживания животных при инокуляции аналогичными дозами вирулентного штамма.

Обнаруженный феномен может быть обусловлен несколькими причинами: 1) пролонгированным выживанием клеток EV НИИЭГ с модифицированным ЛПС, благодаря ослабленной реакции системы врожденного иммунитета вследствие снижения токсичности вакцины, 2) более чем трехкратным снижением пролиферативной активности клеток мутантного штамма, выявленной *in vitro* при культивировании на средах, имитирующих основные стадии контакта чумного микроба с клеткой-мишенью макроорганизма *in vivo*, и 3) более эффективной презентацией клеткам иммунной системы белковых протективных антигенов мутантного штамма, включая F1, Pla, LcrV и «мышинный» токсин (*Ymt*), в частности, благодаря резкому уменьшению количества капсулоподобной субстанции на поверхности бактериальных клеток, негативно влияющей на эффективность гуморального иммунного ответа к другим иммунореактивным белкам.

Таким образом, ЛПС играет важную роль в аттенуации чумного микроба и презентации клеткам иммунной системы хозяина основных поверхностно-локализованных белковых антигенов *Y. pestis*, а сконструированный *LpxM*-мутант *Y. pestis* EV НИИЭГ является перспективным кандидатом для разработки на его основе высокоэффективной чумной вакцины с улучшенными характеристиками.

Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ №№ 3730 и 3853, РФФИ №№ 03-04-48067 и 06-04-49280.



**AN ATTENUATED *YERSINIA PESTIS* STRAIN WITH A GENETICALLY MODIFIED LIPOPOLYSACCHARIDE AS A PROTOTYPE OF AN IMPROVED PLAGUE VACCINE**

Feodorova V.A.,<sup>1</sup> Pan'kina L.N.,<sup>2</sup> Savostina E.P.,<sup>2</sup> Sayapina<sup>3</sup> L.V., Kuznetsov<sup>2</sup> O.E., Konnov<sup>2</sup> N.P., Ageev<sup>4</sup> S.A., Shaikhutdinova R.Z.,<sup>4</sup> Dentovskaya S.V.,<sup>4</sup> Anisimov A.P.,<sup>4</sup> Kondakova A.N.,<sup>5</sup> Knirel Y.A.,<sup>5</sup> Motin<sup>6</sup> V.L.

<sup>1</sup>Research Institute of Medical Veterinary Biotechnology, Saratov-Moscow, Russia

<sup>2</sup>Russian State Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov, Russia

<sup>3</sup>L.A. Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations, Moscow, Russia

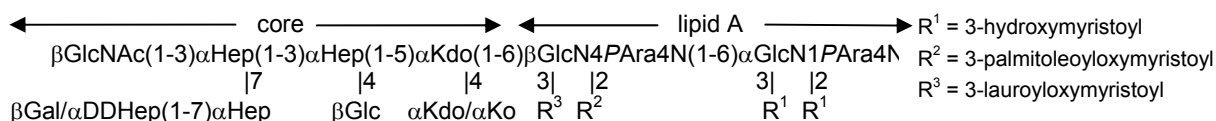
<sup>4</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia;

<sup>5</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

<sup>6</sup>Medical School, University of Texas, Galveston, TX, USA

*Yersinia pestis*, the cause of plague, is one of the most virulent microbes for humans, which occupies a unique rank position among pathogenic bacteria. The pandemics of plague in the past took away millions of human lives. Natural plague foci are discovered on all continents save Australia, and about 2000 sporadic cases of the disease are registered yearly worldwide. *Y. pestis* is one of the most probable agents of bioterrorism. In connection with this, the global monitoring system for dissemination of emerging infectious diseases attaches a special importance for vaccine prophylaxis of plague. Lipopolysaccharide (LPS) is the main component of the cell wall of Gram-negative bacteria, which ensures a number of vital functions. Among them, the maintenance of the integrity and stability of the outer membrane, involvement with the transport of different compounds through the membrane, ensuring the resistance of bacteria to antibiotics, the endotoxic and antigenic activities. Due to its immunomodulating or pronounced protective properties, LPS is employed as a component of preparations for prevention of a number of infectious diseases. As LPS of other enteric bacteria, LPS of the plague microbe possesses a high endotoxicity, which determines a number of adverse reactions in patients vaccinated with live plague vaccine *Y. pestis* EV NIIEG, the only preparation that is licensed for prophylaxis of plague in the CIS countries.

Aiming at better understanding of plague pathogenesis and elaborating an improved plague vaccine, the full LPS structure of *Y. pestis* was established using chemical analyses, NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. It consists of an oligosaccharide core and lipid A:



The structure and biological properties of *Y. pestis* LPS have been found to depend on the cultivation temperature. Thus, a highly toxic hexaacyl LPS is synthesized at ambient temperature, and a low-toxic tetraacyl form ( $R^2 = R^3 = 3\text{-hydroxymyristoyl}$ ) at a temperature of warm-blooded animals (37 °C).

Using site-directed mutagenesis, we constructed a knockout mutant of the vaccine strain EV NIIEG with inactivated gene for lauroyltransferase *lpxM*. At 25 °C, the mutant synthesized a pentaacyl LPS ( $R^3 = 3\text{-hydroxymyristoyl}$ ), which showed an intermediate toxicity between the hexa- and tetra-acyl forms in full possession of its immunomodulating properties. The levels of the harmlessness, safety and protective activity of the mutant surpassed significantly those of the parental strain in tests of protection from experimental plague on two biomodels. Thus, a single subcutaneous injection of *lpxM*-mutant cells resulted in the development of the specific immunity, and 57-86 % outbred mice and 25-50 % guinea pigs survived after subcutaneous inoculation with  $2 \times 10^3$  and  $1.2 \times 10^3$  CFU of a virulent strain *Y. pestis* 231, respectively. Immunization using the initial strain EV NIIEG did not ensure the survival of animals after challenge with similar doses of the virulent strain.

The observed phenomenon is presumably be due to several reasons: i) a prolonged survival of EV NIIEG cells with the modified LPS as a result of a weakened innate immune response owing to a decrease in the vaccine toxicity, ii) a 3-fold reduction of the proliferation activity of mutant strain cells tested *in vitro* by cultivation on the media that imitate the main stages of the contact of the plague microbe with the target cell of the macroorganism *in vivo*, and iii) a more effective presentation of protein protective antigens of the mutant strain, including F1, Pla, LcrV and 'murine' toxin (Ymt), to the immune system cells, particularly, due to a sharp decrease in the quantity of a capsule-like substance on the bacterial cell surface, which interferes with the humoral immune response to the other immunoreactive proteins.

To sum up, LPS plays an important role in the attenuation of the plague microbe and in the presentation of the main surface protein antigens of *Y. pestis* to the cells of the host immune system. The constructed *Y. pestis* EV NIIEG *lpxM*-mutant is a promising candidate for the development on its basis of a highly effective plague vaccine with improved properties.

*This work was supported by ISTC Grants 3730 and 3853 and RFBR Grants 03-04-48067 and 06-04-49280.*



## ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ Т-ЛИМФОБЛАСТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ Jurkat/A4, ОБЛАДАЮЩЕЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ, К ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА КВЕРЦЕТИНОМ И РЕСВЕРАТРОЛОМ

*Фильченков А.А., Завелевич М.П., Блохин Д. Ю.*

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина  
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Российской Академии медицинских наук, Москва, РФ  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Развитие лекарственной устойчивости опухолей является главным препятствием на пути химиотерапевтического лечения онкологических больных, особенно при появлении множественной лекарственной устойчивости к препаратам с различными механизмами действия. Модели клеток с приобретенной лекарственной резистентностью позволяют изучать механизмы этого явления с целью поиска новых соединений или методов воздействия, которые могли бы преодолеть такую устойчивость. В результате селективного культивирования Т-лимфобластных клеток линии Jurkat в присутствии эффекторных моноклональных антител IPO4 к рецептору смерти CD95/Fas/APO-1 была получена клональная клеточная линия Jurkat/A4 (патент РФ № 2267532), которая позволяет проводить исследования механизмов резистентности в злокачественных лимфоидных клетках человека [1, 2]. Поскольку помимо химиотерапевтических средств в качестве индукторов и модификаторов апоптоза в опухолевых клетках могут выступать природные полифенолы, представляет интерес изучение индукции апоптоза этими соединениями в клетках Jurkat/A4.

**Цель исследования:** Изучить апоптотическое действие природных полифенолов кверцетина и ресвератрола на клетки клональной линии Jurkat/A4, резистентные к противоопухолевым цитотоксическим препаратам и облучению.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на клетках Jurkat/A4 и исходной линии Т-лимфобластных клеток Jurkat. Уровень индукции апоптоза оценивали с помощью проточной цитометрии окрашенных пропидия йодидом клеток. В экспериментах использовали препараты кверцетина и ресвератрола фирмы "Sigma" (США). Для анализа содержания белков Bcl-2, каспазы-3 и -9 использовали иммуноблоттинг с применением моноклональных антител против указанных белков: анти-Bcl-2 (клон 83-8В; "Beckman Coulter", Франция), антитела против каспазы-3 (клон 84803.111; Sigma", США), антитела против каспазы-9 (клон 5В4; "Beckman Coulter").

**Результаты:** Клетки Jurkat/A4, обладающие множественной устойчивостью к химиопрепаратам, оказались также резистентными к индукции апоптоза кверцетином и ресвератролом. Так, инкубация клеток Jurkat с ресвератролом в дозе 50 мкмоль/л приводила к повышению количества гиподиплоидных клеток (до 8%) на 1-е сутки при отсутствии апоптотических клеток в культуре Jurkat/A4. Инкубация клеток Jurkat с кверцетином в дозе 40 мкмоль/л приводила к апоптотической гибели до одной трети клеток, в то время как в культуре Jurkat/A4 практически все клетки в этих же условиях оставались жизнеспособными.

При анализе содержания антиапоптотического белка Bcl-2 различий между обработанными и необработанными полифенолами клетками выявлено не было. В то же время в чувствительных клетках Jurkat, в отличие от резистентных клеток Jurkat/A4, индукция апоптоза как кверцетином, так и ресвератролом сопровождалась выраженной активацией инициаторной каспазы-9 и эффекторной каспазы-3. Ранее нами было показано, что клетки Jurkat/A4 намного менее чувствительны к облучению рентгеновскими лучами в сравнении с исходной линией Jurkat [3]. Таким образом, обнаружено, что в резистентных злокачественных лимфоидных клетках чувствительность к индукции апоптоза значительно снижается, независимо от факторов и механизмов, инициирующих апоптоз. Это позволяет предполагать, что помимо изменений в экспрессии генов гликопротеина Р и других белков, ответственных за выведение чужеродных веществ из клетки, в развитии резистентности к индукции апоптоза участвуют и другие внутриклеточные механизмы. Изучение как особенностей, так и общих механизмов развития резистентности к апоптозу при действии различных химических и физических факторов, важно для поиска путей повышения эффективности лечения онкологических больных.

### **Литература:**

1. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu., Inshakov A.N., Mikhailov A.D., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Yu. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // *Exp. Oncol.* – 2001. – V. 23 (No. 3). – P. 175-180.
2. Mikhailov A., Sokolovskaya A., Yegutkin G.G., Amdahl H., West A., Yagita H., Lahesmaa R., Thompson L.F., Jalkanen S., Blokhin D., Eriksson J.E. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181 (No. 1). – P. 464-475.
3. Philchenkov A.A., Zavelevich M.P., Blokhin D.Yu., Druzhyna M.A. Radioresistance of human leukemic Jurkat-A4 cells is associated neither with altered expression of Bcl-2 nor with caspase-9 activation / In: Abstracts of International Conference "Tumor Hypoxia and Malignant Progression", October 1-4, 2008, Kyiv, Ukraine: 39.

**STUDY OF SUSCEPTIBILITY OF JURKAT/A4 MULTIDRUG-RESISTANT T-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS TO APOPTOSIS INDUCTION BY RESVERATROL AND QUERCETIN**

*Philchenkov A.A., Zavelevych M.P., Blokhin D.Yu.*

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
Public Institution 'N.N. Blokhin Russian Oncological Research Center of Russian Academy of Medical Sciences',  
Moscow, Russian Federation  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

The drug resistance of tumors, especially the multidrug resistance towards the substances varying in their mechanisms is the major obstacle preventing the effective chemotherapy of cancer patients. The models of the cell lines with the acquired drug resistance may be advantageous for studying mechanisms of drug resistance and searching for the novel treatment modalities allowing for overcoming such a resistance. Jurkat/A4 is a clonal cell line originated upon the selective culture of the initial T-lymphoblastic leukemia cells Jurkat cells in the presence of the effector IPO4 monoclonals against CD95/Fas/APO-1 death receptor (Russian Federation patent No. 2267532). These cells are useful for studying the mechanisms of the resistance in the human malignant lymphoid cells [1, 2]. Since apart from the chemotherapeutic cytotoxic drugs, the natural polyphenols are also known as the inducers and modifiers of apoptosis in cancer cells, the study of apoptosis induction in Jurkat/A4 cells by these compounds is of interest.

**Aim:** To study the apoptotic activity of quercetin and resveratrol as the natural polyphenols in the clonal cell line Jurkat/A4, which is resistant to both anticancer chemotherapeutic drugs and irradiation.

**Materials and Methods:** Jurkat/A4 cells and the initial T-lymphoblastic leukemia cells Jurkat were used in the study. Quercetin and resveratrol were purchased from Sigma, USA. Apoptosis induction was assessed by flow cytometry of cells upon propidium iodide staining. Monoclonals against Bcl-2 (83-8B clone Beckman Coulter, France), caspase-3 (84803.111 clone, Sigma, USA), and caspase-9 (5B4 clone Beckman Coulter, France) were used for Western blotting.

**Results:** Jurkat/A4 cells known as resistant to chemotherapeutic drugs turned out to be resistant to apoptosis induction by quercetin and resveratrol. Upon 24 h incubation of initial Jurkat cells with 50  $\mu$ M resveratrol the fraction of hypodiploid cells increased by 8% in contrast to the absence of apoptotic cells in Jurkat/A4 culture incubated with the same dose of resveratrol. Quercetin treatment of Jurkat cells at a dose of 40  $\mu$ M resulted in the death of about one third of cell population while the resistant Jurkat/A4 cells remain intact.

Bcl-2 content was essentially the same in polyphenol-treated or untreated cells. Nevertheless, in Jurkat cells quercetin or resveratrol activated both initiator caspase-9 and effector caspase. Earlier, we have shown that Jurkat/A4 cells are less susceptible to X-ray irradiation than the initial Jurkat cells [3]. Therefore, in resistant human malignant lymphoid cells, the susceptibility to apoptosis induction decreases substantially irrespective of the exact factors initiating apoptosis. One may suggest the involvement of the mechanisms other than altered expression of genes coding for glycoprotein P and other proteins eliminating the foreign substances out of the cells in the resistance to apoptosis induction. The study of the specific features of apoptosis induction by various substances as well as the shared mechanisms of apoptosis resistance toward the various chemical and physical factors is important for searching the novel modalities for improving the efficacy of cancer treatment.

**References:**

1. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu., Inshakov A.N., Mikhailov A.D., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Yu. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis. *Exp. Oncol.* 2001; 23 (3): 175-180.
2. Mikhailov A., Sokolovskaya A., Yegutkin G.G., Amdahl H., West A., Yagita H., Lahesmaa R., Thompson L.F., Jalkanen S., Blokhin D., Eriksson J.E. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J. Immunol.* 2008; 181 (1): 464-75.
3. Philchenkov A.A., Zavelevich M.P., Blokhin D.Yu., Druzhyna M.A. Radioresistance of human leukemic Jurkat-A4 cells is associated neither with altered expression of Bcl-2 nor with caspase-9 activation. In: Abstracts of International Conference "Tumor Hypoxia and Malignant Progression", October 1-4, 2008, Kyiv, Ukraine: 39.



## ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И АПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ФУКОКСАНТИНА НА МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Фильченков А.А., Завелевич М.П., Нехорошев М.В.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина  
Институт биологии южных морей им. А.А. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Фукоксантин представляет собой природный каротиноид, содержащийся в бурых, золотистых и диатомовых водорослях. В последнее время была продемонстрирована цитотоксическая активность этого вещества в отношении ряда опухолевых клеток человека [1, 2]. При этом отмечен существенный разброс по выраженности апоптотического действия препарата на клетки разного происхождения. Ранее нами были начаты исследования активности фукоксантина, выделенного из бурых водорослей *Cystoseira crinita* и *S. barbata*, на модели злокачественных лимфоидных клеток [3].

**Цель исследования:** Изучить цитотоксическое и апоптотическое действие природного каротиноида фукоксантина, полученного из черноморской микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* на В- и Т-клеточных перевиваемых линиях злокачественных лимфоидных клеток человека.

**Материалы и методы:** Фукоксантин выделяли из культивируемой *Phaeodactylum tricornutum* путем экстракции спиртом и ацетоном с последующей очисткой на пластинках с силикагелем. Очищенный пигмент состоял из транс-изомерных форм фукоксантина, которые использовали без разделения. В качестве экспериментальных моделей использовали перевиваемые линии клеток МТ-4 острого Т-лимфобластного лейкоза человека и клеток Namalwa, происходящих из лимфомы Беркитта. Уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли в клетках, окрашенных пропидия иодидом с помощью проточного цитофлуориметра "FACSscan" (США). Для выявления активной формы каспазы-3 использовали набор с моноклональными антителами, мечеными FITC.

**Результаты:** Фукоксантин проявляет цитотоксическое действие в отношении как Т-, так и В-клеточных линий злокачественных лимфоидных клеток человека. Выраженная цитотоксичность в отношении клеток МТ-4 проявляется уже в дозах порядка 1 мкмоль/л, в то время как клетки Namalwa погибают при более высоких дозах препарата, а в дозе 1 мкмоль/л гибель клеток на протяжении двух суток незначительна и отмечается лишь замедление роста культуры. Вместе с тем, длительное культивирование клеток МТ-4 в присутствии фукоксантина в дозе 0,15 мкмоль/л на протяжении нескольких пассажей не приводило к сколько-нибудь заметной гибели клеток. Инкубация клеток МТ-4 с препаратом в дозе 1,5 мкмоль/л на протяжении 24 ч вызывала индукцию апоптоза в 24% клеток, что сопровождалось образованием активной формы каспазы-3, а также незначительную задержку клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Предварительная инкубация клеток МТ-4 с фукоксантином на протяжении 24 ч в диапазоне доз от 0,15 до 1,0 мкмоль/л не приводила к аддитивному эффекту при последующем воздействии на клетки стандартного индуктора апоптоза везицида в дозе 4 мкмоль/л на протяжении 18 ч.

Результаты, полученные с препаратом фукоксантина, выделенного из *Phaeodactylum tricornutum*, совпадают в основном с таковыми, полученными ранее с аналогичным препаратом из цистозеры. Вместе с тем применение культуры микроводорослей как источника фукоксантина представляется перспективным в плане технологии получения препарата. Выделение фукоксантина из микроводорослей более предпочтительно, по сравнению с бурыми водорослями, так как содержание пигмента в них гораздо выше, а сам процесс содержит меньше стадий.

Приведенные результаты согласуются с данными исследований S.K. Das с соавт. [1] и Z. Zhang с соавт. [2], полученных на перевиваемых линиях клеток солидных опухолей человека, причем чувствительность к фукоксантину используемых в наших экспериментах линий злокачественных лимфоидных клеток человека оказалась существенно выше. Механизмы цитотоксичности и индукции апоптоза в лейкозных клетках при действии фукоксантина заслуживают дальнейшего исследования.

### Литература:

1. Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1 // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1726 (No. 3). – P. 328-335.
2. Zhang Z, Zhang P, Hamada M, Takahashi S, Xing G, Liu J, Sugiura N. Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line // Oncol. Rep. – 2008. – V. 20 (No. 5). – P. 1099-1103.
3. Фильченков А.А., Завелевич М.П., Поспелова Н.В., Нехорошев М.В. Индукция апоптоза клеток МТ-4 лейкоза человека при действии фукоксантина из бурых черноморских водорослей // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 97-98.



## STUDY OF TOXICITY AND APOPTOTIC ACTIVITY OF FUCOXANTHIN IN HUMAN MALIGNANT LYMPHOID CELLS

*Philchenkov A.A., Zavelevych M.P., Nekhoroshev M.V.*

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

A.A. Kovalevskyi Institute of Biology of Southern Seas NAS of Ukraine, Sevastopol, Ukraine

e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Fucoxanthin is a natural carotenoid containing in brown algae, yellow-green algae, and diatomic algae. Recently, the cytotoxic activity of fucoxanthin towards several human cancer cell lines has been demonstrated with rather large range of the apoptosis-inducing activities reported by various authors [1, 2]. Earlier, we have started the research of apoptosis-inducing activity of fucoxanthin from the brown algae *Cystoseira crinita* and *C. barbata* in the model of the malignant lymphoid cells [3].

**Aim:** To study the cytotoxicity and apoptosis induction of the natural carotenoid fucoxanthin isolated from Black Sea microalga *Phaeodactylum tricornutum* in B- and T-cell lines of the human malignant lymphoid cells.

**Materials and methods:** Fucoxanthin was isolated from *Phaeodactylum tricornutum* culture by ethanol and acetone extraction followed by chromatography in silicagel plates. The purified pigment consisted of trans-isomers of fucoxanthin used without further separation. The transplantable lines of human malignant lymphoid cells MT-4 acute T-lymphoblastic leukemia and Namalwa originated from Burkitt lymphoma were used in the study. Apoptosis induction and cell cycle distribution were assessed by FACScan flow cytometry of cells upon propidium iodide staining. For detecting the active form of caspase-3, the kit with FITC-labeled monoclonal was used.

**Results:** Fucoxanthin was shown to be cytotoxic in both T and B cell lines of the human malignant lymphoid cells under study. The marked cytotoxicity in MT-4 cells was evident at a dose of 1  $\mu$ M, while in Namalwa cells cultured for two days in the presence of the same fucoxanthin dose, the cell death was negligible. Nevertheless, the long-term culture of MT-4 cells with low doses of fucoxanthin (0.15  $\mu$ M) did not interfere substantially with cell growth. Upon the culture of MT-4 cells with 1.5  $\mu$ M fucoxanthin for 24 h, apoptosis was induced in 24% of cells with the concomitant activation of caspase-3 and slight delay of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition. The preceding incubation of MT-4 cells with fucoxanthin within 0.15-1.0  $\mu$ M range did not result in the additive effect upon the following exposure to 4  $\mu$ M vesipide as the standard apoptosis inducer.

The results obtained with fucoxanthin isolated from *Phaeodactylum tricornutum* are similar to that obtained with *Cystoseira* sp. Earlier. Nevertheless, the use of microalga culture as the source of fucoxanthin has some technological advantages taking into account the higher content of the end-product in *Phaeodactylum tricornutum*. Moreover, fewer stages for isolation are required.

Our results are in line with the data presented by S.K. Das et al. [1] and Z. Zhang et al. [2] in the cell lines originated from solid human cancers. Moreover, in our experiments the sensitivity to fucoxanthin exceeded that reported by other authors. The mechanisms of the cytotoxicity and apoptosis induction in the leukemia cells exposed to fucoxanthin are worthwhile of further study.

### References:

1. Das S.K., Hashimoto T., Shimizu K., Yoshida T., Sakai T., Sowa Y., Komoto A., Kanazawa K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1726 (3): 328-335.
2. Zhang Z., Zhang P., Hamada M., Takahashi S., Xing G., Liu J., Sugiura N. Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line. *Oncol. Rep.* 2008; 20 (5): 1099-1103.
3. Philchenkov A.A., Zavelevych M.P., Pospelova N.V., Nekhoroshev M.V. Apoptosis induction in MT-4 cells of human leukemia by fucoxanthin from brown Black Sea algae. *Russian Biotherapeutic Journal* 2008; 7 (3): 97-98 (in Russian).





## БІОЛОГІЧНА ДІЯ ЕКСТРАКТІВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ОРГАНІВ

*Гальченко С. Є.*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Останнім часом в Україні та за її межами проводяться широкі дослідження ефективності та механізмів дії препаратів клітинної та тканинної терапії, в тому числі створених із ксеногенних органів. Головним чином це пов'язано з тим, що при використанні ксеногенного матеріалу не виникають морально-етичні проблеми, а також відсутня небезпека інфікування на характерні для людини віруси (ВІЛ, гепатит, тощо), яка має місце при використанні аlogenного матеріалу. Тканинні препарати використовують в клініці та наукових дослідженнях у вигляді клітин, фрагментів органа, екстрактів тканини відповідного органа та інш.

Метою роботи було вивчити вплив умов кріоконсервування фрагментів органів свиней та поросят на склад одержуваних з них екстрактів та їх біологічну активність.

При одержанні екстрактів максимальна концентрація пептидів в супернатанті відмічається в тому випадку, коли фрагменти органів кріоконсервуються під захистом ПЕО-1500. Вихід пептидів в розчин не залежить від використаних концентрацій кріопротектора (10 та 20%), а статистично достовірне збільшення концентрації пептидів в розчині спостерігається протягом перших 60 хв інкубації. Екстракти кріоконсервованих фрагментів містять речовини пептидної природи з характерним для кожного органа молекулярно-масовим розподілом. Також спостарігається залежність складу від віку тварин.

Методом спектрофлуориметрії показано, що складові екстрактів зв'язуються з альбуміном сироватки крові, і це зв'язування може розглядатися як один із специфічних механізмів транспортування біологічно активних речовин до відповідних органів і тканин.

Також було встановлено, що фрагменти підшлункової залози поросят та екстракт кріоконсервованих фрагментів підшлункової залози свиней сприяють зменшенню рівня глюкози в крові при алоксановому цукровому діабеті, а також зменшують рівень пероксидації ліпідів в організмі. При цьому нормалізація досліджених показників при застосуванні екстракту більш виражена, ніж при застосуванні фрагментів.

Екстракти, одержані з кріоконсервованих фрагментів печінки свиней та поросят стимулюють репараційні процеси при дифузних захворюваннях цього органу, що проявляється в зниженні активності амінотрансфераз в сироватці крові тварин, а також в зниженні інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів як в ураженій печінці, так і в сироватці крові щурів. При цьому спостерігається також нормалізація гістологічної структури органу, збільшення кількості функціонуючих судин, їх діаметра та швидкості кровотоку.

Одним з напрямків, за яким ведеться пошук методів ефективної корекції процесів репарації, є використання різних способів регуляції загоєння ран з використанням біологічно активних речовин, таких як цитокіни, гормони, нейропептиди, регуляторні природні та синтетичні пептиди, екстракти. Встановлено, що при місцевому застосуванні екстракту кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней прискорюється загоєння опікових ран, що проявляється в більш ранній ерадикації ран від мікроорганізмів і скороченні часу проходження фази запалення. Грануляційна тканина утворюється в більш ранні строки. При дослідженні процесу загоєння холодних ран було встановлено, що при уведенні екстракту шкіри новонароджених поросят або екстракту селезінки свиней в черевну порожнину дослідних тварин статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшується швидкість та якість загоєння ран в порівнянні з контролем.

Ми також дослідили в порівняльному плані біологічну дію екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів при експериментальних патологіях. Отримані результати дозволяють стверджувати, що екстракти печінки і підшлункової залози, які при експериментальних патологіях у щурів стимулюють процеси репарації в аналогічних органах, практично не стимулюють репарацію при ураженні інших органів. Так, уведення тваринам з цукровим діабетом екстракту, отриманого з печінки, не впливає на рівень глюкози в крові. А екстракт, отриманий з підшлункової залози, не призводить до нормалізації активності амінотрансфераз в сироватці крові щурів з токсичним гепатитом. Таким чином, їх вплив направлений на клітини такого ж органу, з якого вони були отримані. Екстракт селезінки сприяє нормалізації досліджених показників як при алоксановому діабеті, так і при токсичному гепатиті. Отже дія такого екстракту видається тканинонеспецифічною. Але якщо прийняти до уваги встановлений нами раніше факт, що він нормалізує імунний статус організму, в тому числі і систему лімфоцитів, то можна припустити, що його тканиноспецифічність проявляється саме в такій дії. А стимуляція репарації в ураженому органі відбувається опосередковано, завдяки нормалізації кількості і функціональної активності лімфоцитів, які приймають активну участь в регуляції як в фізіологічній, так і репаративній регенерації.

Хронічне уведення молодим щурам екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів не впливає на динаміку зміни маси тварин, обумовлену фізіологічними причинами, і не стимулює процеси перекисного окислення ліпідів в організмі. Уведення суміші екстрактів 24-місячним тваринами призводить до зменшення інтенсивності процесів пероксидації ліпідів в організмі до рівня, який спостерігається у 6-тимісячних. При цьому тривалість життя таких тварин збільшується статистично достовірно.

Таким чином нами показано, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів проявляють високу біологічну активність, стимулюючи та нормалізуючи процеси репарації та регенерації при експериментальних патологічних станах.



## **BIOLOGICAL EFFECT OF EXTRACTS OF CRYOPRESERVED ORGANS' FRAGMENTS**

*Galchenko S.E.*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Recently in Ukraine and beyond its limits there have been conducted the studies of the efficiency and mechanisms of the preparations of cell and tissue therapy, including those created from xenogenous organs. Mainly this is associated to the fact that when using xenogenous material no moral or ethic problems appear, and also the risk of infection for such viruses as (HIV, hepatitis etc.) is absent. Tissue preparations are used in clinic and for scientific research as the cells, organ fragments, tissue extracts of corresponding organ etc.

The research aim was to investigate the effect of cryopreservation conditions for porcine and piglets' organ fragments on the composition of the derived from them extracts and their biological activity.

During the obtaining of extracts the maximum concentration of peptides in supernatant is noted on that case when the fragments of organs are cryopreserved with PEO-1500 protection. The yield of peptides into a solution does not depend on used concentrations of cryoprotectant (10 and 20%), and statistical and significant increase of concentration of peptides in a solution is found during first 60 min of incubation. The extracts of cryopreserved fragments contain the substances of peptide origin with characteristic for each organ molecular-mass distribution. The dependence of the composition on the age of animals is also noted.

With spectrofluorometry it has been shown that the extract components are bound with blood serum albumin and this binding may be considered as one of specific mechanisms of transporting of biological active substances to appropriate organs and tissues.

There has been also found that the fragments of piglets' pancreas and the extract of cryopreserved fragments of porcine pancreas contribute to a decrease of the glucose level in blood at alloxane Diabetes mellitus as well as reduced the level of lipid peroxidation in an organism. Herewith there is observed the normalization of the research indices for histological structure of organ, rise in the amount of functioning vessels, their diameter and blood flow rate.

One of the directions according those there is performed the search for the methods of effective correction of reparation processes is the use of different ways to regulate the healing of wounds using biologically active substances, such as cytokines, hormones, neuropeptides, regulatory natural and synthetic peptides, extracts. It has been found, that at local use of extract of cryopreserved porcine spleen fragments the healing of burn wounds is accelerated, which was manifested in earlier eradication of wounds from microorganisms and reduced time of inflammation phase proceeding. The granulation tissue is formed within earlier terms. During the investigation of the process of healing for cold wounds it has been found that when introducing the extract of newborn piglets' skin or the porcine spleen extract into peritoneal cavity of experimental animal the rate and quality of healing for wounds if compared with the control increases statistically and significantly.

We also studied comparatively the biological effect of the extracts of cryopreserved fragments of organs at experimental pathologies. The obtained results enable to state that the liver and pancreas extracts, which at experimental pathologies in arts stimulated the reparation processes in the same organs, practically did not stimulate the reparation at the damage of other organs. So, the introduction to the animals with Diabetes mellitus of the extract derived from liver, did not affect glucose level in blood. And the pancreas-derived extract did not result in normalization of the activity of aminotransferases in blood serum of rats with toxic hepatitis. Thus, their effect was directed to the cells of the same organ, they were derived from. Spleen extract contributes to normalization of the studied parameters both at alloxane diabetes and toxic hepatitis. So, the effect of such an extract is tissue-specific. And if to take into consideration the fact found by us that it normalizes an immune status of an organism including the system of lymphocytes, then it may be supposed that its tissue-specificity manifests exactly in that way. And stimulation of reparation in the damaged organ takes place indirectly due to normalization of the number and functional activity of lymphocytes, taking an active part in regulation both of physiological and reparative regeneration.

Chronic introduction to young rats of the extracts of cryopreserved fragments of organs do not affect the dynamics of changes of animals' mass, stipulated with physiological causes and does not stimulate the processes of lipid peroxidation in an organism. Introduction of the mixtures of extracts to 24 months' animals results in the reduction of intensity of lipid peroxidation in an organism down to the level of the one found in the 6 months' ones.

Thus we have shown that the extracts of cryopreserved fragments of organs manifest a high biological activity, stimulating and normalizing the reparation and regeneration processes at experimental pathological states.



## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,5-БЕНЗОДИАЗЕПИНОНА-2 НА НЕЙРОННУЮ И ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КРЫС

Гамма Т.В., Коренюк И.И., Хусаинов Д.Р., Епишкин И.В., Баевский М.Ю., Баевский А.М.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
e-mail: tgamma@ukr.net

В работе с использованием стандартной методики внутриклеточного отведения потенциалов на идентифицированных и неидентифицированных нейронах подглоточного комплекса ганглиев улитки *Helix albescens* Rosm. изучены пространственно-временные параметры электрических потенциалов нейронов при аппликации на них 3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1*H*-1,5-бензодиазепин-2-она (3-метил-1,5-БДА) и 4-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1*H*-1,5-бензодиазепин-2-она (4-метил-1,5-БДА). Показано, что пороговые концентрации тестируемых веществ составляют  $10^{-5}$  Моль/л. Оптимальными концентрациями веществ являются  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  Моль/л, при которых обнаружено достоверное снижение времени развития потенциала действия, вследствие увеличения скорости входящих ионных токов. Можно думать, что в этих концентрациях соединения возможно применять как средства, ускоряющие де- и реполяризацию мембраны и, следовательно, проводимость в нервной системе. Увеличение концентрации веществ до  $10^{-2}$  Моль/л приводило к внезапному прекращению импульсной активности нейронов, то есть данная концентрация тестируемых соединений является токсической, а в некоторых случаях и летальной для нейронов моллюска. Таким образом, нами установлено, что 3-метил-1,5-БДА и 4-метил-1,5-БДА обладают нейротропным действием, в основе которого лежит их прямое влияние на электрогенез нейронов.

На крысах с использованием тестов открытое поле, Порсолта, подвешивание за хвост и черно-белая камера изучено наличие и направленность психотропного действия исследуемых соединений. Показано, что 3-метил-1,5-БДА и 4-метил-1,5-БДА в зависимости от дозы вызывали достоверное снижение двигательной активности крыс, увеличение исследовательской активности и времени активного плавания, то есть оказывали седативное, анксиолитическое и антидепрессантное действие.

В целом, результаты данной работы показали, что 3-метил-1,5-БДА и 4-метил-1,5-БДА обладают нейро- и психотропным действием, направленность и выраженность которых варьирует в зависимости от дозы.



### **INFLUENCE OF 1,5-BENZODIAZEPINE DERIVATIVES ON NEURON AND BEHAVIORAL RAT ACTIVITY**

*Gamma T.V., Korenyuk I.I., Husainov D.R., Epishkin I.V., Baevsky M. Yu., Baevsky A.M.*

Taurida National University named after V.I. Vernadsky, Simferopol, Ukraine  
e-mail: tgamma@ukr.net

Using standard method of intracellular lead of potentials on identified and non-identified neurons of subpharyngeal complex of snail ganglia (*Helix albescens Rosm*) spatio-temporal parameters of neuron electric potentials have been studied with application of 3- methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona (3-methyl-1,5-BDZ) and 4- methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona (4-methyl-1,5-BDZ). It is shown that threshold concentrations of substances under test constitute  $10^{-5}$  gram-molecule/litre. Optimal substance concentrations are  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  gram-molecule/litre at which a significant decrease of time development of action potential revealed due to increase of speed of incoming ion currents. One could say that in these concentrations the substances can be used as means accelerating de- and repolarization of membrane and consequently conductivity in the nervous system. Increase of substance concentration up till  $10^{-2}$  gram-molecule/litre leads to sudden suspension of neuron impulse activity that is the concentration of substances under the test is toxic and in some cases is lethal for mollusc's neurons. Thus we have discovered that 3-methyl-1,5-BDZ and 4-methyl-1,5-BDZ have neurotropic action at the heart of which lies their direct influence on neuron electrogenesis.

Presence and direction of psychotropic action of investigated substances were studied on rats applying open field, Porsolt test, hanging by tail and black and white test. It is shown that 3-methyl-1,5-BDZ and 4-methyl-1,5-BDZ depending on doze invoke a significant decrease of motor rat activity. increase of exploratory behavior and time of active swimming that is the substances had a sedative, anxiolytic and antidepressant action.

On the whole the results of current work showed that 3-methyl-1,5-BDZ and 4-methyl-1,5-BDZ have neuro- and psychotropic action, direction and intensity of which vary depending on doze.



## АУТОКРИННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЭФР-ПОДОБНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ КАК ФАКТОР ИХ ПРОГРЕССИИ

Гарманчук Л.В., \* Перепелицына Е.М., \*\* Непийвода К.Д., \* Остапченко Л.И., \* Сидоренко М.В. \*\*

\*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

\*\*Отделение биотехнических проблем диагностики Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: liudmilagarmanchuk@rambler.ru

На основании анализа данных литературы последних лет предполагается, что опухолевые клетки, продуцируя ЭФР подобные цитокины, направленные на ингибирование апоптоза, способствуют развитию устойчивости к запрограммированной гибели клеток и увеличению восприимчивости к влиянию ростовых факторов, формируя таким образом феномен аутокринной регуляторной петли. Митогенный сигнал ЭФР-подобных цитокинов осуществляется посредством связывания из специфическими рецепторами семейства c-erbB с выраженной тирозинкиназной активностью. Кроме того, ЭФР-подобные пептиды участвуют в регуляции адгезивных молекул и инвазивных свойств опухолевых клеток. Ранее нами было показано различную реактивность монослойной и сфероидной культуры клеток рака молочной железы линии MCF-7 в ответ на факторы микроокружения [1], продуцируемые Т-лимфоцитами. Целью настоящего исследования было сравнить уровень аутокринной продукции ЭФР-подобных полипептидов клетками MCF-7 в расчете на  $1 \cdot 10^6$  клеток в условиях монослойного и сфероидного роста этой культуры. Для этого клетки высаживали с одинаковой плотностью в среде RPMI (Sigma, США), содержащей 10% ЭТС (Sigma, США); в первом случае клетки растили до достижения 90% монослоя, во втором случае – после формирования по стандартной процедуре [2], определенного количества сфероидов на объем среды инкубации – во обоих вариантах эксперимента, среду заменяли на безсывороточную. После этого клетки инкубировали в течение 2-х суток, затем отбирали кондиционированную среду (К-среду), центрифугировали и с использованием гидрофобной хроматографии очищали ЭФР-подобные полипептиды из К-сред монослойной и сфероидной культуры клеток MCF-7. После лиофилизации ЭФР-подобных пептидов уровень их секреции определяли денситографией после гель-электрофореза. В качестве маркера м.м. использовали ЭФР, очищенный из подчелюстных слюнных желез мышей. Биологическую активность полученных пептидов определяли по способности активировать пролиферацию клеток.

В результате проведенного исследования было установлено, что количество аутокринно секретируемых ЭФР-подобных факторов в среде культивирования клеток монослойной культуры MCF-7 в условиях дефицита питательных субстратов выше в 2,5 раз ( $p < 0,01$ ) в сравнении со сфероидной в расчете на  $1 \cdot 10^6$  клеток. Это может указывать с одной стороны на больший ЭФР-подобный секреторный потенциал монослойной культуры клеток MCF-7, а с другой стороны, на другую реактивность сфероидной культуры [1], где пролиферация модифицирована когезивными контактами и, возможно, аутокринно продуцируемые факторы из среды микроокружения более интенсивно в сравнении с монослойной культурой включаются в поддержание функционирования клеток в сфероидах или же в митотический цикл. Так, в условиях сфероидного роста в одной опухолевой клетке может одновременно активироваться несколько аутокринных петель, гетерогенных по составу лигандов и их рецепторов. ЭФР-подобные цитокины могут стимулировать пролиферативную активность трансформированных клеток по юкстакринному и/или интракринному механизму или же с использованием щелевых контактов. С этой точки зрения клетки в сфероидной модели владеют высшей степенью сопредельности и, следовательно, могут интенсивней использовать факторы микроокружения.

### Литература:

1. Perpelitsina O.M., Garmanchuk L.V., Sydorenko M.V., Ostapchenko L.I. Reactivity and sensibility of breast carcinoma (MCF-7) in coculture depends on architecture of cells model.// Physics of the alive, T16 N 2, 2008, 105-111.
2. O.M. Perpelitsina, L.V. Garmanchouk, M.V. Sydorenko Indirect influence of co-cultures MT4 on multicellular spheroids of breast adenocarcinoma (MCF7)/UICC08, World cancer congress, 27-31 August, 2008, Geneva, Switzerland, [POS-B146]



**AUTOCRINE PRODUCTION OF THE EGF-LIKE POLYPEPTIDES BY TUMOR CELLS  
AS A FACTOR OF THEIR PROGRESSION**

*Garmanchuk L.V., \* Perepelitsyna E.M., \*\* Nepyvoda K.D., \* Ostapchenko L.I., Sydorenko M. V.\*\**

\* Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

\*\* Biotechnical problems of diagnostic Dep., Institute cryobiology and criomedicine NAS Ukraine, Kiev, Ukraine  
e-mail: liudmilagarmanchuk@rambler.ru

On the basis of the analysis of dates of the literature last years we supposed, that tumor cells promote development of insensibility to different ways of cell death. This effect are detected for cells which has high level of producing EGF-like cytokines and lead to inhibition of apoptosis and increased of influence of growth factors. This phenomenon is called an autocrine regulatory loop. Mitogenic signal from EGF-like cytokines is carried out by means of linkage with specific receptors c-erbB family with expressed tyrosine activity. Besides, EGF-like peptides participate in regulation adhesives molecules and invasive properties of tumor cells. Earlier we described of various reactivity of monolayer and spheroid of breast cancer cell culture (line MCF-7) in reply to different factors of a microenvironment [1] produced T-lymphocytes. The purpose of the present research was to compare level of autocrine production of EGF-like polypeptides by MCF-7 cells counting on  $1 \cdot 10^6$  cells in the conditions of monolayer and spheroid growth of this culture. For this purpose were seed with identical density in RPMI (Sigma, the USA) medium, containing 10 % ECS (Sigma, the USA). In the first case cells grow before achievement of 90 % of a monolayer, in the second case – after formation spheroids according standard procedure [2]. Certain quantity of spheroids on volume of incubation medium – in both types of experiment, medium was changed on serum-free. After that cells incubate during 2 days, then selected the conditioned medium (C-medium), centrifuged and used for a waterproof chromatography and clearance of EGF-like polypeptides from C-medium (monolayer and spheroid culture of cells MCF-7). After lyophilization level of EGF-like peptides secretion was detected by densitography after electrophoresis. As a marker of EGF was used EGF was cleared from sub maxillary salivary glands of mice. Biological activity of peptide was defined according to ability to activate of cell proliferation.

As a result of the carried out research it has been established, that quantity of autocrinely secreted EGF-like factors in cultured medium of monolayer culture MCF-7 in the conditions of deficiency of nutritious substrata is above than in 2,5 times ( $p < 0,01$ ) in comparison with spheroid culture. It can demonstrate on the one hand on higher level of EGF-like peptides which are secreted in monolayer culture of cells MCF-7, and on the other hand, in other reactivity of spheroid culture [1] where it is carried out other actively proliferation and, accordingly, autocrinely produced factors from the microenvironment environment other intensively in comparison with monolayer culture join in mitotic cell cycle. So, in the conditions of spheroid growth in one tumor cell can be activated simultaneously a little autocrine loop, heterogeneous on structure ligands and their receptors. EGF-like cytokines can stimulate proliferation activity of the transformed cells on paracrine and/or intracrine mechanisms and with gap-contact used. From this point of view cells in spheroid model have the higher degree of adjacency and, hence, can use microenvironment factors more intensively.

**References:**

1. Perepelitsyna O.M., Garmanchuk L.V., Sydorenko M.V., Ostapchenko L.I. Reactivity and sensibility of breast carcinoma (MCF-7) in coculture depends on architecture of cells model. // Physics of the alive, T16 N 2, 2008, 105-111.
2. O.M. Perepelitsyna, L.V. Garmanchouk, M.V. Sydorenko. Indirect influence of co-cultures MT4 on multicellular spheroids of breast adenocarcinoma (MCF7) // UIICC08, World cancer congress, 27-31 August, 2008, Geneva, Switzerland, [POS-B146]



**НОВЕ ПОХІДНЕ ЕСТРАДІОЛУ ПЕ0607 ЗНИЖУЄ ВІСЦЕРАЛЬНЕ ОЖИРІННЯ ТА ПОЛІПШУЄ  
ЧУТЛИВІСТЬ ДО ІНСУЛІНУ У ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ, ЯКІ УТРИМУВАЛИСЯ  
НА ВИСОКОЖИРОВОЇ ДІЄТІ**

*Горбенко Н.І., Таран К.В., Боріков О.Ю., Оксененко С.В., Іванова О.В., Степанова А.В.,  
Звягіна Т.С., Яременко Ф.Г.*

Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України, Харків, Україна.  
e-mail: olga3006@rambler.ru

Як відомо, естрогендефіцитні стани, що викликають зміни гормонального профілю у жінок в постменопаузальний період, сприяють розвитку метаболічного синдрому. Застосування гормональної терапії, в тому числі естрогенів, у таких жінок знижує ризик серцево-судинних захворювань та поліпшує глікемічний та ліпідний профіль. Але, на жаль, застосування естрогенів не завжди ефективно для лікування проявів постменопаузальних порушень та може спричинити негативні побічні ефекти. Метою даної роботи було дослідження впливу нового похідного естрадіолу ПЕ0607 (ПЕ) на розвиток інсулінорезистентності та інших складових метаболічного синдрому у оваріектомованих щурів (ОВ), які утримувалися на високожировій дієті (ВЖД).

**Матеріали та методи.** Оваріектомовані тварини були розподілені на 3 групи: щури, які утримувалися на стандартній дієті (ОВ, n=6); щури, які знаходилися протягом 16 тижнів на ВЖД й отримували плацебо (ОВ+ВЖД+П, n=6) та сполуку ПЕ0607 в дозі 0,2 мг/кг маси тіла один раз на добу протягом 8 тижнів (ОВ+ВЖД+ПЕ, n=6). Двосторонню оваріектомію проводили під легким ефірним наркозом. Стан глюкозного гомеостазу оцінювали під час внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (3 г/кг). Коефіцієнт інсулінорезистентності визначали за допомогою короткого інсулінового тесту (0,5 Од/кг). В якості інтегральних показників визначали масу тіла та вісцерального жиру, яка складалася із суми епігонадаального, ретропарентерального й мезентерального жирів.

**Результати.** У результаті проведеного дослідження було встановлено, що 16-тижневе утримання тварин на ВЖД призводить до розвитку інсулінорезистентності, про що свідчило достовірне зниження коефіцієнту чутливості до гормону (ОВ+ВЖД+П:  $17,3 \pm 4,8$  vs ОВ:  $34,5 \pm 4,0$  %,  $p \leq 0,05$ ) та погіршення толерантності до вуглеводів (площі під глікемічними кривими ОВ+ВЖД+П:  $1837,9 \pm 145,6$  vs ОВ:  $1071,5 \pm 176,3$  ммоль/лхв,  $p \leq 0,05$ ). Оцінка приросту маси тіла показала суттєве збільшення даного показника (ОВ+ВЖД+П:  $41,8 \pm 2,4$  vs ОВ:  $29,1 \pm 2,6$  %,  $p \leq 0,05$ ), крім того спостерігалось майже триразове збільшення відносної маси загального вісцерального жиру ( $p \leq 0,05$ ). Терапевтичне застосування сполуки ПЕ0607 в значній мірі ослаблює розвиток інсулінорезистентності та інтолерантності до вуглеводів, підтвердженням чому було суттєве підвищення коефіцієнта чутливості до інсуліну (ОВ+ВЖД+ПЕ:  $32,7 \pm 3,3$  %,  $p \leq 0,05$ ) та зменшення площі під глікемічними кривими (ОВ+ВЖД+ПЕ:  $1375,2 \pm 101,5$  ммоль/лхв,  $p \leq 0,05$ ) в порівнянні з показниками для групи ОВ+ВЖД+П. В той же час введення сполуки ПЕ0607 гальмувало зростання маси тіла оваріектомованих тварин (ОВ+ВЖД+ПЕ:  $27,0 \pm 3,7$  %,  $p \leq 0,05$ ) та призводило до вірогідного зниження відносної маси загального вісцерального жиру ( $p \leq 0,05$ ).

**Висновки.** Встановлено, що застосування нового похідного естрадіолу ПЕ0607 призводить до ослаблення інсулінорезистентності, поліпшення толерантності до вуглеводів, зниження приросту маси тіла та відносної маси вісцерального жиру у оваріектомованих щурів, які утримувалися на високожировій дієті. Отримані результати обґрунтовують доцільність застосування вказаної речовини для фармакологічної корекції метаболічних порушень, притаманних постменопаузальному метаболічному синдрому.



**ESTRADIOL DERIVATIVE PE0607 DECREASES VISCERAL OBESITY AND IMPROVES INSULIN SENSITIVITY IN OVARECTOMIZED RATS FED ON A HIGH FAT DIET**

*Gorbenko N., Taran K., Borikov A., Oksenenko S., Ivanova O., Stepanova A., Zvyagina T., Yaremenko F.*

Institute of Endocrine Pathology Problems, Kharkiv, Ukraine.  
e-mail: olga3006@rambler.ru

It is believed that estrogen deficiency contributes importantly to the pathogenesis of menopausal metabolic syndrome and symptoms can be ameliorated with estradiol therapy. Estrogens have been found to reduce coronary heart disease and to have favorable effects on glycaemic and lipid profiles. However, the risks of adverse health effects must be balanced against the benefits associated with hormone replacement therapy. The aim of the study was to assess the effects of novel estradiol derivative PE0607 (PE) on the visceral fat accumulation and insulin resistance development in ovariectomized (OVX) rats fed on a high-fat diet (HFD).

**Materials and methods:** Wistar rats were divided into three groups: OVX group fed on a regular diet (OVX, n=6), OVX rats fed on a HFD for 4 months (OVX+HFD, n=6), and OVX rats treated with PE (0,2 mg/kg/day per os) during the last 2 months of HFD feeding (OVX+HFD+P, n=6). Bilateral ovariectomy was applied to the animals under anesthesia. At the end of the study fasted rats were subjected to the glucose tolerance test (GTT, 3 g/kg i.p.). Indexes of insulin resistance (IR) were determined using the quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI). Visceral fat weight was calculated as the sum of the retroperitoneal, mesenteric and epigonadal fat weights.

**Results:** HFD induced obesity (body weight was increased by 41,8 %,  $p \leq 0,05$ ) and severe insulin resistance in OVX rats, as indicated lower IR (OVX+HFD:  $17,3 \pm 4,8$  vs OVX:  $34,5 \pm 4,0$  %,  $p \leq 0,05$ ) indexes. The combined weight of the abdominal fat depots was threefold greater in the HFD animals compared with OVX rats on a regular diet ( $p \leq 0,05$ ). OVX+HFD group also developed glucose intolerance (area under curve over the GTT was (OVX+HFD:  $1837,9 \pm 145,6$  vs OVX:  $1071,5 \pm 176,3$  mmol/l x min,  $p \leq 0,05$ ). Administration of PE ameliorated HFD-induced glucose intolerance (area under curve over the GTT was OVX+HFD+PE:  $1375,2 \pm 101,5$  mmol/l x min) and decreased insulin resistance (IR index OVX+HFD+P:  $32,7 \pm 3,3$  %,  $p \leq 0,05$ ). The reduction in body weight gain in OVX rats treated with P was accompanied by a significant reduction in visceral fat ( $p \leq 0,05$ ).

**Conclusion:** These data demonstrate that the novel estradiol derivative PEO607 ameliorate adiposity and insulin resistance in OVX rats fed on a HFD. We suggest that the use of PEO607 may be beneficial for the treatment of obesity and associated metabolic disturbances in postmenopausal women.





## ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ПОЛІМЕРНОЇ ДЕПО-ФОРМИ З ПІРОКСИКАМОМ НА Т-МЕТИЛІМІДАЗОЛОЦТОВУ КИСЛОТУ

*.Григор'єва М.В, Закашун Т.Ю., Галатенко Н.А.*

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, Київ, Україна  
e-mail: mayagrigorieva@gmail.com

Нові досягнення в хімії біологічно активних полімерів в останні роки інтенсивно застосовуються в медичній практиці. Результати отримані при модифікації синтетичних полімерів біологічно активними сполуками з різними механізмами дії, дозволяють знаходити шляхи направленої модифікації та корекції біологічно активних сполук, що є важливим при розробці оригінальних ефективних лікарських препаратів з різними спектрами дії. Відомо, що в результаті іммобілізації лікарських речовин (ЛР) на поліуретанових (ПУ) матрицях можна утворювати нові полімерні лікарські форми пролонгованої дії. В організмі вивільнення ЛР з таких наповнених ПУ систем (або ПУ депо-форм) залежить від багатьох факторів.

В представленій роботі вивчали нову полімерну депо-форму нестероїдного протизапального препарату НПЗП – піроксикаму (Рх), а саме її вплив на рівень кінцевого метаболіту гістаміну (медіатору запалення) - t-метилімідазоцтрової кислоти (t-МІОК).

ПУ композиції (у вигляді губок) отримували додаючи до МДІ, синтезованого на основі простого полієфіру (Лапрол, ММ 2002) і ТДІ, 3 % Рх від маси полімеру.

В експерименті було задіяно п'ять груп тварин : перша – контрольна (інтактні тварини), а друга - п'ята групи з запаленням. Щурам цих груп вводили 0,1 мл 6 %-ного розчину декстрану, через 1 годину тільки третій групі вводили зондом терапевтичну дозу (0,28 мг/кг) піроксикаму. Тваринам четвертої та п'ятої груп було імплантовано в область черевної порожнини, під етаноловим наркозом (1,5-2,0 г/кг ваги тварин), зразки ПУ-композицій без ПІР ( група 4) та зразки ПУ-композицій з ПІР ( група 5). Протягом п'яти діб групам 4 та 5 вводили щоденно по 0,1 мл 6 %-ного розчину декстрану (кожній тварині). Визначення рівня t-МІОК в біологічних зразках здійснювали в три етапи: обробка біологічних зразків, екстракція t-МІОК, аналіз за допомогою обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Встановлено, що в організмі Рх , вивільняючись з ПУ депо-форми , впливає на перебіг запального процесу, а саме значно знижує рівень t-МІОК. Протизапальну дію ПУ-композицій з Рх вивчали порівнюючи з дією комерційного Рх. Індикатором вивільнення Рх, з депо-форми, вважали зміну рівня t-МІОК в сечі тварин, який вимірювали через 5 днів після імплантації. Рівень t-МІОК у тварин з ПУ-композицією з Рх знизився до  $0,004 \pm 0,001$  мг/мл, n=3, а у тварин , яким Рх вводили зондом до  $0,01 \pm 0,002$  мг/мл, n=3. Порівняно з тваринами з запаленням, яким не вводили Рх взагалі, це на 90% та 75%, відповідно. Можна припустити, що прояви процесу запалення пригнічуються за рахунок купірування больового синдрому при введенні піроксикаму, що, в свою чергу, викликає зниження рівня гістаміну і, відповідно, його кінцевого метаболіту – t-МІОК



**EFFECT OF A BIOACTIVE POLYMERIC DEPOT FORM WITH PIROXICAM  
ON T-METHYLIMIDAZOLEACETIC ACID**

*Grigorieva M., Zakashun T., Galatenko N.*

Institute of Macromolecular Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: mayagrigrorieva@gmail.com

For decades, the biocompatibility and physicochemical properties of polyurethanes have been drawing attention of developers of composite materials widely used in medicine. Among the variety of their applications, polyurethanes have also performed well as drug carriers, especially when continuous drug delivery into a body was required. Such depot forms are essentially a polymeric base (matrix) into which low-molecular bioactive substances are introduced. Besides the extended drug delivery, advantages of the depot forms also include reduced side effects.

The anti-inflammatory effect of piroxicam (Px) immobilized on a polyurethane (PU) matrix was studied in vivo with the purpose of developing an extended release form of the drug.

The PU matrix was a macrodiisocyanate synthesized from oligoglycol (Mw 2,002) and toluylene diisocyanate (a mixture of 2,4 and 2,6 isomers). Sponge-like PU/Px composites were produced by adding Px to the prepolymer at 3 percent by weight.

Acute inflammation in experimental rats was induced by injecting into an animal's leg an irritant that provokes edema. In certain time spans, the edema volume was measured, and thus the progress of the inflammatory process followed. Twenty-five white non-purebred male rats, weighting 180-250 g each, were used in the experiment. The animals were divided into five equal groups: a control group of intact animals and four groups with inflammation induced through injection of 0.1 ml 6,0 % dextran solution. One of these four groups received no other treatment; another one received a therapeutic dose of Px through stomach tube, and the other two were treated as follows: subcutaneous implantation of PU matrix with or without Px plus injection of dextran solution once a day for five days. Urine from the animals was collected in tubes and kept on ice before HPLC analysis.

The anti-inflammatory effect was measured by determining t-methylimidazoleacetic acid (t-MetImAA), the end metabolite of histamine, in murine urea using reversed-phase HPLC. Histamine is one of inflammation mediators, which are released from connective tissue mastocytes immediately after injury.

It was found that implantation of PU/Px composites in rats with inflammation resulted in 90 percent reduction in the t-MetImAA level as compared to intact animals.

The studies showed that the Px introduction into a PU matrix physically modifies the latter, resulting in an extended therapeutic effect of Px. As the depot form gradually releases Px in a body, the drug continuously affects the inflammatory process.

The findings may be used for the development of anti-inflammatory extended release forms.



## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ ДО 5 КДА ИЗ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Гулевский А.К., Моисеева Н.Н., Никольченко А.Ю., Щеняевский И.И., Абакумова Е.С., Трифонова А.В., Горина О.Л., Иванов Е.Г.*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина  
e-mail: ivanovjenia@mail.ru; cryo@online.kharkov.ua

В настоящее время в качестве источника биологически активных веществ внимание исследователей привлекает кордовая кровь - уникальное сырьё, имеющее ряд преимуществ по сравнению с донорской кровью, как по своему составу, так и спектру действия. Но лечебный потенциал низкомолекулярных фракций кордовой крови, в частности, их способность стимулировать процессы тканевой репарации, не изучен.

Целью настоящей работы было изучение влияния низкомолекулярных фракций до 5 кДа, выделенных из кордовой крови крупного рогатого скота и из крови молочных телят, на процессы заживления ожоговых ран и субхронических язв желудка. Также была исследована их сахароснижающая активность. Кроме этого, в экспериментах in-vitro были исследованы иммуномодулирующие свойства данных фракций и их влияние на рост клеточных культур, как компонентов ростовой среды. Путём хроматографических исследований были получены и сравнены спектры молекулярных масс низкомолекулярных фракций из кордовой крови крупного рогатого скота, из крови молочных телят и из крови взрослых коров. С помощью биохимических методов было определено содержание в исследуемых фракциях некоторых веществ.

При исследовании ранозаживляющего действия на модели термического ожога III В степени было отмечено, что введение фракций до 5 кДа из кордовой крови и из крови молочных телят значительно ускоряло уменьшение площади ожоговых ран, формирование зрелой грануляционной ткани в области ожога, эпителизацию раневого дефекта, способствовало восстановлению капиллярной сети в зоне повреждения за счёт новообразующихся сосудов, что является немаловажным фактором для процессов регенерации в условиях тканевой гипоксии, вызванной нарушением микроциркуляции. Наряду с этим, введение данных фракций приводило к нормализации общего гемоглобина и количества эритроцитов в периферической крови животных в более ранние сроки эксперимента по сравнению с контролем. Следовательно, введение фракций до 5 кДа из кордовой крови и из крови молочных телят существенно улучшает доставку кислорода к регенерирующим тканям и активизирует процессы заживления.

При макроскопическом исследовании слизистой оболочки желудка на 12 сутки после моделирования субхронической язвы в группах животных, которым ежедневно вводили фракции до 5 кДа из кордовой крови и из крови молочных телят, наблюдалось полное отсутствие язвенных дефектов, отмечалась незначительная гиперемия и редкие геморрагии, а вид слизистой оболочки практически не отличался от слизистой интактных крыс. Средняя площадь язв у животных, которым вводили фракцию из кордовой крови, составила 0,3 балла, а фракцию из крови молочных телят - 1,0 баллов. Число животных с язвенными поражениями в контрольной группе, которую не подвергали лечебному воздействию, составляло 75%. На участке малой кривизны желудка отмечались отек и гиперемия, кровоизлияния, эрозии, язвы, средняя площадь которых составила 1,8 баллов. Подобная степень деструкции отмечалась и в группе животных, которым вводили фракцию до 5 кДа из крови взрослых коров. Наличие сходной картины течения заболевания во всех группах животных после формирования субхронической язвы желудка показали и гистологические исследования образцов ткани, взятой из области язвы. Также в группах животных, которым вводили фракции из кордовой крови и из крови молочных телят, отмечено более ранний возврат к норме таких показателей крови подопытных животных, как содержание эритроцитов, лейкоцитов и концентрации общего гемоглобина.

Изучение действия указанной фракции на рост культур клеток показало ее высокую эффективность как компонента ростовых сред перевиваемых и диплоидных культур. Внесение фракции в ростовые среды приводит к существенной активации клеточного метаболизма, что выражается в увеличении скорости распластывания клеток на подложке, более раннему приступанию культуры к делению, а также повышенной митотической активности клеток.

Также было установлено, что фракция до 5 кДа, полученная из кордовой крови крупного рогатого скота обладает иммуномодулирующим действием, которое выражается в стимуляции in-vivo и in-vitro фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови.

Содержание глюкозы в крови крыс, которым за 20 минут до глюкозной нагрузки вводили фракции до 5 кДа из кордовой крови коров и из крови молочных телят, возвращалось к норме в более ранние сроки, чем в контрольной группе животных и у животных, которым вводили фракцию до 5 кДа из крови взрослых коров.

Очевидно, обнаруженные эффекты биологически активных веществ, содержащихся в исследованных фракциях, основаны на их способности улучшать энергообеспечение клеток и тканей в условиях дефицита кислорода и субстратов окисления. Следует отметить, что в использованных нами моделях фракция из кордовой крови превосходила, а фракция из крови молочных телят не уступала препарату сравнения актовегину, который по происхождению также является фракцией до 5 кДа из крови молочных телят. Аналогичная фракция, полученная из крови взрослых коров, не проявляла активности. Такие онтогенетические отличия в биологической активности фракций до 5 кДа из кордовой крови, из крови молочных телят и из крови взрослых коров согласуются с выявленными отличиями в спектрах молекулярных масс, содержащихся в них веществ, и разными концентрациями их отдельных компонентов. Так, во фракции до 5 кДа из кордовой крови выявлено повышенное содержание гормонов - тестостерона и кортизола, а также кальция, гликопротеинов и сиаловых кислот относительно фракции до 5 кДа из крови молочных телят.



**STUDYING OF PROPERTIES FROM BIOLOGICALLY AWAKE MATERIALS OF LOW-MOLECULAR FRACTIONS TO 5 KDA FROM BLOOD OF LARGE HORNED LIVESTOCK**

*Gulevskij A.K., Moiseeva N.N., Nikolchenko A.J., Shenjavskij I.I., Abakumova E.S., Trifonova A. V., Gorina O. L., Ivanov E.G.*

Institute of problem of criomedicine and criobiology of National Academy of Science of Ukraine, Kharkov, Ukraine  
e-mail: ivanovjenia@mail.ru; cryo@online.kharkov.ua.

Now as a source of biologically awake materials the attention of explorers involves of cord blood - the unique raw materials having a number of advantages in comparison with donor blood, as on the structure, and an action spectrum. But the medical potential of low-molecular fractions кордовой blood, in particular, their ability to stimulate processes of a histic reparation, is not studied.

Studying of influence of low-molecular fractions to 5 kDa, secured of cord blood of large horned livestock and from blood of dairy calfs, on processes of healing of burn wounds and subchronic stomach ulcers was the purpose of the present work. Also it has been investigated them sugar-low activity. Besides, in experiments in-vitro have been investigated of immune-response modulating properties of the given fractions and their influence on growth of cellular cultures, as components growth mediums. By chromatography researches spectra molecular height low-molecular fractions from cord blood of large horned livestock, from blood of dairy calfs and from blood of adult cows have been received and compared. By means of biochemical methods the maintenance in investigated fractions of some materials has been defined.

At research from the cicatrize actions on model of a thermal burn III B degrees it has been noticed, that introduction of fractions to 5 kDa from cord blood and from blood of dairy calfs considerably accelerated reduction of the area of burn wounds, formation mature from granulation fabrics in the field of a burn, epithelium of wound defect, promoted capillary network restoration in region damages for the account neoformation pots that is the important factor for processes of neogenesis in the conditions of the histic hypoxia invoked by infringement of microcirculation. Along with it, introduction of the given fractions led to normalisation of the general haemoglobin and quantity of erythrocytes in peripheric blood of animals in earlier terms of experiment in comparison with the control. Hence, introduction of fractions to 5 kDa from cord blood and from blood of dairy calfs is essential enriches oxygen delivery to recycling fabrics and activates healing processes.

At macroscopical research of a mucosa of a stomach for 12 days after modelling of a subchronic ulcer in bunches of animals which daily introduced fractions to 5 kDa from cord blood and from blood of dairy calfs, full absence of ulcer defects was observed, the insignificant hyperemia and rare haemorrhagic was marked, and the mucosa kind practically did not differ from mucous intact rats. The average area of ulcers at animals whom introduced fraction from cord blood, has compounded 0,3 points, and fraction of blood of dairy calfs - 1,0 points. The number of animals with ulcer lesions in control bunch which did not subject to medical influence, compounded 75 %. On a field of small curvature of a stomach the hypostasis and a hyperemia, hemorrhages, erosion, the ulcers which average area has compounded 1,8 points were marked. Similar from degree decomposition was marked and in bunch of animals which introduced fraction to 5 kDa from blood of adult cows. In all bunches of animals after formation of a subchronic stomach ulcer histological researches of samples of the fabric taken from range of an ulcer have shown presence of a similar picture of flow of disease also. Also in bunches of animals which introduced fractions from кордовой blood and from blood of dairy calfs, it is noted earlier return to norm of such indicators of blood of experimental animals, as the maintenance of erythrocytes, leucocytes and concentration of the general haemoglobin.

Studying of action of the specified fraction on growth of cultures of cages has shown its high efficacy as component of growth mediums intertwined and diploid cultures. Fraction entering in growth leads mediums to essential activation of a cellular metabolism that is expressed in augmentation of speed spreading cages on the substrate, to earlier attempt cultures to division, and also raised of mitosis to activity of cages.

Also it has been established, that fraction to 5 kDa, received from cord blood of large horned livestock possesses from the immune-response modulating action which is expressed in stimulation in-vivo and in-vitro to phagocytal activity of leucocytes of peripheric blood.

The glucose maintenance in blood of rats which 20 minutes prior to a glucosic load introduced fractions to 5 кДа from cord blood of cows and from blood of dairy calfs, came back to norm in earlier terms, than in control bunch of animals and at animals whom introduced fraction to 5 kDa from blood of adult cows.

Obviously, found effects of biologically awake materials containing in investigated fractions, are based on their ability to enrich power supply of cages and fabrics in the conditions of deficiency of oxygen and oxidation substrata. It is necessary to notice, that in the models used by us the fraction from cord blood surpassed, and the fraction from blood of dairy calfs did not concede to a comparison preparation Actovein which by origin also is fraction to 5 kDa from blood of dairy calfs. The similar fraction received from blood of adult cows, did not show activity. Such ontogenetic differences in a biological potency of fractions to 5 кДа from cord blood, from blood of dairy calfs and from blood of adult cows will be co-ordinated with the revealed differences in spectra of the molecular masses containing in them of materials, and their different concentrations of individual components. So, in fraction to 5 kDa from cord blood the raised maintenance of hormones - Testosteron-Depotum and a hydrocortisone, and also calcium, glicoprotein and sial acids concerning fraction to 5 kDa from blood of dairy calfs is revealed.



## МОДЕЛЬ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА IN VITRO КАК СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

*Хама-Мурад А.Х., Мокрушин А.А., Павлинова Л.И.*

Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, С-Петербург, Россия  
e-mail: elp44@mail.ru

Разработанная нами модель геморрагического инсульта на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс позволяет исследовать действие биологически активных соединений на биоэлектрическую активность мозга при разных сроках воздействия аутокрови на ткань мозга от начала воздействия аутокровью до момента необратимой гибели нейронов.

Было установлено, что активность глутаматэргической и ГАМКэргических механизмов электрогенеза в ткани головного мозга крыс в значительной степени зависит от времени действия аутокрови, а длительное воздействие до 6 часов приводит к почти полному ингибированию возбуждающих глутаматных постсинаптических компонентов фокального потенциала (АМПА и НМДА) и позднего тормозного постсинаптического потенциала, который генерируется при активации ГАМК<sub>B</sub> рецепторов. Для исследования возможности восстановления биоэлектрической синаптической активности в ткани срезов головного мозга были исследованы биологически активные соединения эндогенного происхождения - белок теплового шока (БТШ70) и дипептид L-карнозин, которые отличаются высокими протекторными свойствами. БТШ70, который необходим клеткам во всех процессах жизнедеятельности, чрезвычайно активно синтезируется при адаптации ко множеству цитотоксических факторов, а L-карнозин демонстрирует высокие антиапоптотические и антиоксидативные свойства в большом числе патологических моделей.

Было выявлено, что применение БТШ70 и L-карнозина в модели геморрагического инсульта на переживающих срезах мозга до начала воздействия аутокровью приводило к почти полному восстановлению исследованных параметров электрогенеза нервной ткани, таким образом обнаруживая высокие протективные способности этих эндогенных веществ. Более того, при применении БТШ70 и L-карнозина не происходило наблюдаемое при длительном воздействии аутокрови значительное набухание ткани срезов мозга, что, по-видимому, было обусловлено их антиотечными свойствами. На этой же модели были также исследованы антиотечные свойства аскорбиновой кислоты (витамин С), колекальциферола (витамин Д) и альфа-Токоферола-ацетата (витамин Е), а также церебролизина и глиатилина, которые применяются в клинике для лечения инсультов. Из изученных препаратов только витамин Е препятствовал набуханию нервной ткани в модели геморрагического инсульта на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс. Предварительная инкубация срезов с альфа-Токоферолом до применения аутокрови, также как при действии БТШ70 и L-карнозина, вызывала значительный антиотечный эффект, в отличие от подвергнутых действию крови срезов, у которых количество воды в ткани увеличивалось в 1,5 раза при действии аутокрови до 6-8 часов. Такого эффекта не наблюдалось при применении других исследованных препаратов - витаминов С и Д, а также церебролизина и глиатилина.

Таким образом, протективные свойства БТШ70 и L-карнозина, применение которых до воздействия аутокровью способствовало восстановлению биоэлектрической активности нервной ткани мозга, почти полностью блокированной действием аутокрови, а также антиотечные свойства этих биологически активных соединений, а также альфа-Токоферола были выявлены при использовании модели геморрагического инсульта на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс.



**MODEL OF HEMORRHAGIC STROKE *IN VITRO* AS A METHOD TO TEST A PROTECTIVE ABILITY OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

*Khama-Murad A. X., Mokrushin A. A., Pavlinova L. I.*

I.P.Pavlov Institute of Physiology RAS, St-Petersburg, Russia  
e-mail: elp44@mail.ru

The model of hemorrhagic stroke developed by us on survival slices of the rat olfactory cortex for studies of changes in the neuronal bioelectrical activity after application of autoblood allows to investigate action of biologically active compounds in delayed periods after the start of exposure to autoblood until the moment of irreversible death of neurons.

It has been established, that activity of glutamatergic and GABAergic mechanisms of electrogenesis in a rat brain tissue substantially depends on time of an autoblood action and long influence until 6 hours leads to almost full inhibition of exciting glutamate postsynaptic components of focal potentials (AMPA and NMDA) and late inhibitory postsynaptic potential which is generated at activation of slow GABA<sub>s</sub> receptors. The level and reversibility of disorders in nerve cell activity in slices were detected by preliminary application of biologically active compounds before the action of autoblood - heat shock proteins (HSP70) and dipeptide L-carnosine which are notable for the high protective properties. HSP70 is essential for a cell life activity and is extremely actively synthesized in cells at adaptation against many cytotoxic factors. L-carnosine demonstrates high antiapoptotic and antioxidative features in many pathological models.

It has been revealed, that application of HSP70 and L-carnosine in a model of hemorrhagic stroke in brain slices before the beginning of autoblood influence led to almost full restoration of the inhibited parameters of electrogenesis of a nervous tissue, thus finding out the high protective abilities of these endogenous substances. Moreover, observable at long autoblood influence significant swelling of slices did not occur at application of HSP70 and L-carnosine, that, apparently, it has been caused by antiedema properties of these substances. On the same model the properties of an ascorbic acids (vitamin C), a calciferol (vitamin D) and an alpha-tocopherol-acetate (vitamin E), and also cerebrolysine and glyatiline which are applied in clinic to treatment of insults also have been investigated. Among these preparations only vitamin E interfered with swelling of a nervous tissue in model of hemorrhagic stroke on survival brain slices of an rat olfactory cortex. Preliminary incubation of slices with the alpha-tocopherol before an autoblood application, also as HSP70 and L-carnosine, caused significant antismelling effect, comparing with delayed periods of an autoblood action (6-8 hours) which is accompanies with increasing in water content up to 1,5 times. Such effect was not observed at application of the other investigated preparations - vitamins C and D, and also cerebrolysine and glyatiline. Thus, protective properties of HSP70 and L-carnosine promoted a restoration of neuronal bioelectric activity of brain slices almost completely blocked by autoblood action, as well as antismelling properties of these biologically active compounds and also of an alpha-tocopherol have been revealed at use of a model of hemorrhagic stroke on survival slices of an rat olfactory cortex.



## МЕХАНІЗМ АТР-ІНДУКОВАНОЇ LPT У ГІПОКАМПІ: РОЛЬ КОННАБІОЇДНОЇ СИСТЕМИ

*Євглевський О., Кондратська О., Палигін О., Лунько О., Кришталь О.*

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ  
e-mail: ievglevskiy@gmail.com

Синаптична пластичність, що являє собою здатність нейронів змінювати ефективність синаптичної передачі, як вважається, безпосередньо пов'язана процесами обробки та зберігання інформації у мозку, що і обумовлює актуальність ролі синаптичної пластичності у процесах пам'яті. Довготривала потенціація (LTP) являє собою тривале у часі збільшення синаптичної збудливості після підвищеної синаптичної активності (Nicoll, Malenka, 1999), що залежить від типу (механізму) дії синаптичних вхідних сигналів на постсинаптичні CA1 нейрони та подальших процесів, пов'язаних із  $Ca^{2+}$  потоком через NMDA рецептори (NMDAs), що веде до підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  та активації кальцій/кальмодулін залежної кінази II (CaMKII).

Зовнішнє додавання АТР призводить до зростання збуджуючого постсинаптичного потенціалу (EPSP) та популяційного спайку (PS). Цей ефект спостерігається після видалення АТР, є достатньо стійким та досліджується вже тривалий час (Fujii et al., 1995; Fujii et al., 1999; Fujii et al., 2002; O'Kane and Stone, 2000; Wieraszko and Seyfried, 1989) і на відміну від LTP, обумовленого електричною стимуляцією (яка була вперше досліджена у гіпокампі, Abrams and Kandel, 1988) називається АТР-залежною, та все ж механізми цього явища досі залишаються маловивченими. Ми мали за мету дослідити механізми для АТР-індукованого LTP і визначити, чи канабіодні рецептори 1 типу (CB1) можуть впливати на підвищення активності нейронів у зрізах гіпокампу щурів.

АТР-індукована синаптична пластичність в гіпокампі раніше пов'язувалась із фосфорилуванням зовнішньоклітинного домену білків на синаптичній мембрані, один з яких може бути NMDA receptor/ $Ca^{2+}$  каналом, що залежить від рецепторів екто-протеїн кінази. Таким чином ми виявили додатковий канабіод-залежний механізм АТР-індукованої синаптичної передачі. Одже, CB1 рецептори беруть участь у контролі нейрональної збудливості, блокуючи передачу збудження на пресинаптичній мембрані і таким чином запобігають виникненню LTP.

Для довготривалої потенціації PS, що викликається електричною стимуляцією колатералей Шафера у зрізах гіпокампу щурів ( $125,5 \pm 5,04\%$ ) було встановлено, що АТР-індукована LTP не залежить від можливого розпаду АТР до аденозину. Коли аденозин (10 мкМоль) застосовується разом із АТР, рівень PS потенціації становить  $112,55 \pm 4,6\%$ .

АТР-індукована LTP повністю усувається застосовуванися агоністу CB1 рецепторів - WIN-2 (2 мкМоль) ( $PS/PS_0 = 97,4 \pm 4,9\%$ ) і призводить до депресії PS, коли WIN-2 застосовується у високій концентрації (4 мкМоль). Дія WIN-2 носить пресинаптичний характер, оскільки результат застосування не змінюється істотно коли WIN-2 додається без електричної стимуляції колатералей Шафера. Тим не менш, для CB1 селективного антагоністу AM251 (500 нМоль) було виявлено, що він запобігає дії WIN-2 на PS та призводить до LTP ( $109,8 \pm 4,9\%$ ), тоді як сигнал при WIN-індукованому LTD повертається до рівня контролю.



## **CANNABINOID-MEDIATED CONTROL OF ATP-INDUCED SYNAPTIC PLASTICITY IN HIPPOCAMPUS**

*Ievglevskiy O., Kondratskaya E., Palygin O., Lunko O., Krishtal O.*

Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine  
ievglevskiy@gmail.com

A major physiological role of the endocannabinoid system is regulation of synaptical activity at various types of synapses throughout the brain. The production of endocannabinoids is evoked by specific physiological stimuli, but they are proposed to act presynaptically on cannabinoid receptors. This reverse mode of action makes them ideal candidates as retrograde signals in several paradigms of short- and long-term synaptic plasticity in hippocampus. The current study was devoted to understand how the endocannabinoid system contributes to the phenomenon of ATP-induced long-lasting synaptic plasticity in CA1 hippocampus region since the hippocampal formation that is enriched with CB1 receptors (Herkenham, 1992; Gatley et al., 1998).

Exogenous application of ATP causes the potentiation of field and population spike EPSP. This effect, which was observed after drug removal, was described to persist in *in vitro* preparations for a relatively prolonged period (Fujii et al., 1995; Fujii et al., 1999; Fujii et al., 2002; O'Kane and Stone, 2000; Wieraszko and Seyfried, 1989), is compared to electrically evoked LTP, firstly described in the hippocampus by Abrams and Kandel (Abrams and Kandel, 1988) and called 'ATP-induced LTP' although mechanism(s) of such phenomena remain unclear to date. We further studied mechanisms for ATP-induced LTP and examined whether CB1 receptors can influence excessive neuronal activity by investigating stimulation-induced population in rat hippocampal slices.

The long-lasting potentiation of population spike evoked by electrical stimulation of the Schaffer collaterals in hippocampal slices of rats ( $125.5 \pm 5.04\%$ ) was found to be not dependent on possible decaying of ATP to adenosine. When adenosine ( $10 \mu\text{M}$ ) was co-applied with ATP, the level of PS potentiation was measured as  $112.55 \pm 4.6\%$ .

ATP-induced LTP was completely eliminated by exogenously applied CB1 receptor agonist WIN-2 ( $2 \mu\text{M}$ ) ( $\text{PS}/\text{PS}_0 = 97.4 \pm 4.9\%$ ) and turned to the depression of PS when WIN-2 was used in higher concentration ( $4 \mu\text{M}$ ). The effect of WIN-2 is presynaptic by nature, since it was not altered significantly when WIN-2 application was examined without electrical stimulation of Schaffer collaterals. However, the selective CB1 antagonist AM251 ( $500 \text{ nM}$ ) was found to prevent the inhibitory effect of WIN-2 on PS with the LTP generation ( $109.8 \pm 4.9\%$ ) when WIN-induced LTD was averted to the control level.

ATP-induced synaptic plasticity in hippocampus has been previously accounted for the phosphorylation of extracellular domains of synaptic membrane proteins, one of which could be the NMDA receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  channels that depends on ecto-protein kinase receptors. Hereby we contributed to the additional cannabinoid-dependent mechanism for ATP-induced synaptic plasticity as powerful mode for regulation glutamatergic synaptic circuits. In conclusion, CB1 receptors are involved in the control of neuronal excitability, thus reducing excitatory neurotransmission at a presynaptic site, a mechanism which might be involved in the prevention of excessive excitability.





## ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ГРИБОВ *CERRENA UNICOLOR* И *FUNALIA TROGII*

*Касьян О.В., Шамцян М.М.*

Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт (Технический университет)  
Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: grnaster@gmail.com

Неблагоприятная экологическая обстановка оказывает крайне отрицательное воздействие на здоровье людей: растет число опасных заболеваний, прежде всего сердечно-сосудистых и онкологических, наблюдается снижение иммунитета и сокращение продолжительности жизни.

Для преодоления сложившейся ситуации необходимо создание эффективных функциональных продуктов с выраженным профилактическим противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным действием, способных улучшать качество и увеличивать продолжительность жизни.

Одним из перспективных источников функциональных продуктов являются грибы класса Basidiomycetes. Профилактические и лечебные средства из базидиомицетов способствуют адаптации человека к неблагоприятным факторам, повышая, с одной стороны, сопротивляемость организма, оказывая на него общеукрепляющее и тонизирующее действие и, с другой стороны, ускоряя выведение из него радионуклидов, тяжелых металлов, различных токсинов. В культивируемых базидиомицетах обнаружены вещества, стимулирующие иммунную систему, обладающие противоопухолевой, антибактериальной, противовирусной (в том числе против вируса иммунодефицита человека – ВИЧ) и противогрибковой активностью, способные регулировать кровяное давление, понижать содержание холестерина и сахара в крови и др. У лечебно-оздоровительных препаратов на основе съедобных грибов не были выявлены нежелательные побочные эффекты и токсическое действие.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные об образовании высшими съедобными базидиомицетами в культуре ферментов, антибиотиков и других биологически активных веществ свидетельствуют о важности и перспективности проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Объектом исследования являются экстракты из мицелия грибов *Cerrena unicolor* и *Funalia trogii*. Грибы выращивались в глубинных условиях и полученная мицелиальная биомасса использовалась для выделения веществ, стимулирующих различные звенья иммунного отклика. У высших грибов основными веществами – иммуномодуляторами, как правило, являются β-глюканы.

В результате наших исследований был выявлен существенный иммуномодулирующий эффект водных экстрактов грибов.



**THE RESEARCH OF IMMUNITY-MODULATED AND ANTI-TUMOUR ACTIVITY OF THE EXTRACT OF CERRENA UNICOLOR AND FUNALIA TROGII MUSHROOMS**

*Kasyan O.V., Shamtsyan M.M.*

St. Petersburg's University of Technology (Technical University), S.Pb, Russia  
e-mail: grnaster@gmail.com

An unfavourable ecological situation makes a highly negative influence on people's health: the number of dangerous diseases is growing, more frequently the trouble with heart's vessels and oncological illnesses, and on the whole the level of immunity and human lifetime is decreasing.

To overcome this situation the invention of effective and functional products with anti-tumour, anti-bacterial and anti-virus effects is required in order to make the quality of life better and increase its length.

One of the perspective sources of functional products are mushrooms of Basidiomycetes class. Preventive and medical sources from Basidiomycetes promote the human adaptation to unwanted factors increasing from one point the defense of organism, making a strengthening and toning influence on it and on the other side speeding up the removal of radio nuclides, metals and various toxins. There are substances detected in Basidiomycetes which stimulate the immunity, having anti-tumour, anti-bacterial, anti-virus (including HIV) and anti-fungus activity, which can regulate the blood's pressure, decrease the level of cholesterol and sugar in blood and etc. There have not been detected any side-effects from medicines produced on the basis of mushrooms.

Therefore, the modern data about highly edible Basidiomycetes's creation of ferments, antibiotics and other different biologically active substances shows the importance and perspective of future research in this area.

The subject of research are the extracts from *Cerrena unicolor* and *Funalia trogii* mushrooms' mycelia. The mushrooms have been grown up in deep conditions and received mycelia biomass was used for producing substances which stimulate different chains of immunity response. As common the main substances (immunity-modulators) in high-mushrooms are  $\beta$ -glucans.

As a result of our research, there have been discovered the essential immunity-modulating effect of mushrooms' waterextracts.



## ВПЛИВ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ НА ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Харченко О.І., Чайка В.О., Богун Л.І., Ковальова В.А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: rigik1979@yahoo.com

Сьогодні одним із поширених факторів несприятливого впливу на організм є алкоголь. В основі розвитку цього захворювання лежать глибокі зміни метаболізму, що призводять до порушень біогенезу, структури та функції клітин різних органів та систем людини. Поряд з великою кількістю робіт, що стосуються визначення механізмів біологічної дії етанолу, окремі сторони його впливу на організм людини та тварин є недостатньо вивченими, а встановлені факти є суперечливими. Відомо, що за умов впливу етанолу виражених структурно-функціональних змін зазнають клітини мозку. Результати експериментальних та клінічних досліджень дозволяють говорити про те, що в механізмі розвитку толерантності живих організмів до дії етанолу важливу роль відіграють фізико-хімічні зміни в їх біологічних мембранах, що визначають як нормальне функціонування зазначених клітин, так і їх провідність. Оскільки відомо, що за умов хронічної алкогольної інтоксикації спостерігається дефіцит цинку у ряді органів, з метою корекції зазначеного розладу використовують солі цинку, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк. Тому метою нашої роботи було визначити фосфоліпідний склад плазматичних мембран нейронів щурів в умовах хронічної алкогольної інтоксикації та за умов впливу оцтовокислого цинку.

Дослідження проводили на щурах (самцях) лінії Вістар масою 180-200 г, що утримувались на стандартному раціоні виварію з вільним доступом до води. Тварини були розділені на 3 групи. 1-ша група – контрольні тварини; 2-га група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, що викликала за стандартною методикою М. Х. Халілова і Ш. А. Закирходжаєва; 3-тя група - щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили цинк в дозі 0,2 г на 100 г маси тварини. Клітини мозку виділяли за стандартною методикою на 4, 6, 11, 16 та 21 добу після початку експерименту. Для вивчення кількісного і якісного складу фосфоліпідів (фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилетаноламіну (ФЕА), фосфатидилінозитолу (ФІ) та лізофосфатидилхоліну (ЛФХ)) застосовували метод тонкошарової хроматографії.

У результаті досліджень нами встановлено, що за умов хронічної алкогольної інтоксикації спостерігається зменшення вмісту основних мембранних фосфоліпідів плазматичних мембран клітин мозку (ФХ, ФЕА, ФС та ФІ) з одночасним зростанням вмісту ЛФХ на протязі усіх термінів дослідження.

ФОСФОЛІПІДИ					
	ФХ [мкг/мг білка]	ФЕА [мкг/мг білка]	ФІ [мкг/мг білка]	ФС [мкг/мг білка]	ЛФХ [мкг/мг білка]
Контроль	49,4±6,45	24,15±3,68	14,99±2,05	22,69±3,42	1,2±0,18
4 доба + Eth	24,69±3,43*	16,29±2,88	9,14±1,63*	19,7±3,21*	2,4±0,35*
4 доба +Eth+Zn	25,46±3,75*	17,23±2,73	12,99±2,17*	17,51±2,64	2,6±0,47*
7 доба+ Eth	29,5±4,32*	17,88±2,62	6,4±1,04*	10,71±1,67*	2,29±0,36*
7 доба +Eth+Zn	27,3±4,05*	20,5±3,41*	12,17±1,82*	19,7±3,38*	1,86±0,33*
11 доба+ Eth	22,61±3,08*	18,5±3,26*	9,76±1,63*	13,53±2,24*	2,4±0,37*
11 доба +Eth+Zn	29,2±4,74*	23,46±3,91*	12,47±1,83*	16,69±2,55	1,31±0,21
16 доба+ Eth	27,75±4,43*	15,15±2,85*	11,4±1,76	16,34±2,94	2,62±0,49*
16 доба +Eth+Zn	33,22±5,54*	20,22±3,33*	13,7±2,21*	16,41±2,28	1,54±0,25
21 доба+ Eth	29,6±4,16*	14,64±2,08*	11,49±1,84	16,28±2,12*	2,3±0,37*
21 доба +Eth+Zn	44,32±6,16	22,1±3,72*	14,01±1,96*	19,33±3,08*	1,3±0,25

\* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю

Встановлені зміни можуть бути пов'язані як із впливом етанолу, так і з дією його цитотоксичного метаболіту ацетальдегіду. Етанол може впливати на фосфоліпідний склад плазматичних клітин через безпосереднє включення до складу мембран та опосередковано, через вплив на їх синтез, взаємоперетворення та процеси вільнорадикального окислення.

Введення оцтовокислого цинку на фоні хронічної алкогольної інтоксикації призводило до поступового зростання вмісту досліджуваних ФЛ із наближенням до контрольних значень на пізніх етапах дослідження. Виявлені зміни можна пояснити тим що оцтовокислий цинк потенційно може впливати на фосфоліпідний склад мембрани опосередковано, через зниження інтенсивності процесів ПОЛ, регулювання активності відповідних ферментів метаболізму ліпідів та, можливо, зменшення вмісту ацетальдегіду.

Отже, нами встановлено, що вміст ліпідних компонентів в плазматичних мембранах клітин мозку зазнає суттєвих змін за умов хронічної алкогольної інтоксикації. Такі процеси можуть обумовлювати структурну дезорганізацію мембран, зменшення їх мікров'язкості, порушення їх основних функціональних характеристик та змін у процесах трансмембранної передачі сигналу, що у подальшому може призвести до порушення нормального функціонування клітин та їх загибелі. Оцтовокислий цинк послаблював виявлені негативні зміни, що дає підстави для його подальших досліджень як потенційного лікувального засобу за умов хронічного алкоголізму.


**INFLUENCE ACETIC ZINC ON PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF RAT BRAIN CELLS PLASMATIC MEMBRANES UNDER CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION CONDITION**

*Kharchenko O.I., Chayka V.O., Bogun L.I., Kovaleva V.A.*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: rigik1979@yahoo.com

Today alcohol is one of widespread factors of adverse influence on an organism. Inherently of this disease development are radical metabolism changes which lead to infringements biogenesis, structures and functions of different bodies and systems cells. Although there is considerable quantity of works which definitions of ethanol biological action mechanisms, the separate parties of its influence on a human and animals body are insufficiently studied, and established facts are inconsistent. Under ethanol influence conditions the expressed structurally functional changes was shown in brain cell. Results of experimental and clinical researches allow saying that in the mechanism of live organism's tolerance development to ethanol action physical and chemical changes in their biological membranes plays the important role. These changes define both normal functioning of the specified cells, and their conductivity. As it is known, that under conditions of a chronic alcoholic intoxication deficiency of zinc in a number of organ is observed, for the purpose of correction of the specified dissonance use zinc salts among which low toxicity characterizes acetic zinc.

White laboratory rats-males (weight 180-200 g) kept to standard vivarium diet were used in experiments. Animals were parted on 3 groups. 1-st group - control animals; 2-nd group - rats with a chronic alcoholic intoxication which caused behind standard procedure; 3-rd group - rats with a chronic alcoholic intoxication which follow-up administration zinc acetate in a dose of 0,2 g on 100 g of animal mass one times into day. Brain cells were obtained by a standard technique for 4, 6, 11, 16 and 21 days after the experiment beginning. For studying of quantitative and qualitative composition of phospholipids (phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI) and lysophosphatidylcholine (LPC)) applied a thin-layer chromatography method.

It is established, that under chronic alcoholic intoxication conditions reduction of the maintenance of the basic plasmatic membranes phospholipids (PC, PE, PS and PI) with simultaneous increasing of LPC maintenance throughout all terms of research is observed.

PHOSPHOLIPIDS					
	PC [mkg/mg protein]	PE [mkg/mg protein]	PI [mkg/mg protein]	PS [mkg/mg protein]	LPC [mkg/mg protein]
Control	49,4±6,45	24,15±3,68	14,99±2,05	22,69±3,42	1,2±0,18
4 day+ Eth	24,69±3,43*	16,29±2,88	9,14±1,63*	19,7±3,21*	2,4±0,35*
4 day+Eth+Zn	25,46±3,75*	17,23±2,73	12,99±2,17*	17,51±2,64	2,6±0,47*
7 day+ Eth	29,5±4,32*	17,88±2,62	6,4±1,04*	10,71±1,67*	2,29±0,36*
7 day+Eth+Zn	27,3±4,05*	20,5±3,41*	12,17±1,82*	19,7±3,38*	1,86±0,33*
11 day+ Eth	22,61±3,08*	18,5±3,26*	9,76±1,63*	13,53±2,24*	2,4±0,37*
11 day+Eth+Zn	29,2±4,74*	23,46±3,91*	12,47±1,83*	16,69±2,55	1,31±0,21
16 day+ Eth	27,75±4,43*	15,15±2,85*	11,4±1,76	16,34±2,94	2,62±0,49*
16 day+Eth+Zn	33,22±5,54*	20,22±3,33*	13,7±2,21*	16,41±2,28	1,54±0,25
21 day+ Eth	29,6±4,16*	14,64±2,08*	11,49±1,84	16,28±2,12*	2,3±0,37*
21 day+Eth+Zn	44,32±6,16	22,1±3,72*	14,01±1,96*	19,33±3,08*	1,3±0,25

\* –  $p \leq 0,05$  relative to control

The established changes can be connected both with ethanol influence, and with its cytotoxic metabolite acetaldehyde action. Ethanol can influence on cells plasmatic phospholipids composition through direct inclusion in membranes structure and indirectly, through influence on their synthesis, modulation and processes free radical oxidation. Acetic zinc introduction under the chronic alcoholic intoxication led to gradual raising of investigated phospholipids contents with approach to control values at late investigation phases. The possible explain of the revealed changes is indirect acetic zinc influence on membrane structure through lipid peroxidation decrease, regulation of corresponding lipid metabolism enzymes activity and, probably, acetaldehyde maintenance reduction.

So, it is established, that brain plasmatic membranes phospholipids maintenance essentially changes under conditions of a chronic alcoholic intoxication. Such processes can cause membranes structural disorganization, reduction of their microviscosity, infringement of their basic functional characteristics and changes in processes transmembrane signal transmissions. Further it can lead to infringement of normal functioning of cells and their destruction. Acetic zinc weakened the revealed negative changes which gives the bases to its further researches as potential drug under chronic alcoholism conditions.



## ДОСЛІДЖЕННЯ НЕФРОТОКСИЧНОСТІ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ 1-(4-CL-БЕНЗИЛ)-3-CL-4-(CF<sub>3</sub>-ФЕНІЛАМІНО)-1Н-ПІРОЛ-2,5-ДІОНУ ЗА УМОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

*Харчук І.В., Островська Г.В., Яблонська С.В., Філінська О.М., Рибальченко В.К.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: kharchukirina@ukr.net

Оксидативний стрес є неспецифічною реакцією організму на ушкодження і сприяє мобілізації антиоксидантних систем. Оксидативні процеси супроводжують канцерогенез на всіх стадіях виникнення і розвитку пухлин, а стан оксидативного стресу підвищує виживання і метастазування пухлин. Це обґрунтовує дослідження ефектів протипухлинних препаратів за умов оксидативного стресу. Синтезоване науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка похідне малеїмиду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (MI-1) є потенційним протипухлинним засобом таргетної дії. MI-1 інгібує низку протеїназ, яким належить провідна роль у процесах проліферації і росту клітин за умов канцерогенезу, справляє цитостатичний ефект на лініях злоякісних та трансформованих клітин людини, і водночас мало пошкоджує швидкопроліферуючі тканини організму, такі як сперматогенний епітелій сім'яників щурів. Важливою умовою перспективності потенційного лікарського засобу є низька нефротоксичність. У наших попередніх дослідженнях було показано незначний нефротоксичний ефект MI-1 на інтактних щурах. Оскільки морфо-функціональний стан нирок під впливом MI-1 за умов оксидативного стресу дотепер недосліджений, це і стало метою даної роботи.

Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях масою 180-200г. Оксидативний стрес моделювали шляхом внутрішньочеревинних ін'єкцій тваринам 0,1 мл розчину хлориду кобальту у дозі 15 мг/кг протягом 10 днів. MI-1 вводили щурам інтрагастрально в 0,1 мл олії щодня у дозі 5 мг/кг. Для морфологічних досліджень проводили стандартну гістологічну обробку матеріалу. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41. На зрізах нирок в кіркових нефронах вимірювали площу поперечного перетину капсул Шумлянського-Боумена, площу судинних клубочків, висоту епітелію проксимальних та дистальних канальців нефронів, а також площу ядер епітеліоцитів цих канальців.

Під впливом хлориду кобальту спостерігаються значні дистрофічні зміни здебільшого в тубулярному апараті кіркового шару нирок. Уражається епітелій як дистальних, так і проксимальних канальців. Епітеліальна стінка дистальних канальців витончується на 16%, а площі ядер епітеліоцитів зменшуються на 12%. Висота епітелію більшості проксимальних канальців суттєво не змінюється, а площа ядер їх епітеліоцитів зменшується на 13,5%. Зменшення площі ядер епітеліоцитів вказує на зниження функціональної активності клітин. У гломерулярному апараті площі поперечного перетину капсул Шумлянського-Боумена зменшуються на 17%. Поява значних за розмірами ділянок поліморфно-нуклеарних інфільтратів у інтерстиційній тканині як у навколокапсулярних зонах, так і навколо канальців кіркової зони нирок є ознакою інтерстиційного нефриту.

MI-1 викликає структурні зміни у гломерулярно і тубулярно апараті кіркових нефронів. У гломерулярному апараті відмічається зменшення площі капсул Шумлянського-Боумена на 14%. Судинні клубочки більшості ниркових тілець ущільнюються, їх площа і кровонаповнення капілярних петель зменшується. У тубулярному апараті більшість змін зазнають дистальні канальці нефронів. Їх просвіт значно розширений, а висота епітелію та площі ядер епітеліоцитів менші контрольних значень відповідно на 23,6% та 5,5%. Відмічено порушення ниркового кровообігу (зменшення кровонаповнення судин кіркового шару), що є суттєвим чинником патогенезу дистальних канальців у зв'язку з більшою чутливістю його епітеліальних клітин до гіпоксії. Більшість проксимальних ниркових канальців зберігають нормальну будову, проте просвіт деяких канальців розширений і висота епітелію зменшується на 10%. У поодиноких канальцях спостерігаються ознаки білкової дистрофії, що може свідчити про порушення в системі ультрафільтрації-реабсорбції.

При сумісній дії MI-1 і хлориду кобальту зміни у гломерулярно апараті схожі до таких, що викликає MI-1. Зменшення розмірів капсул Шумлянського-Боумена становить 12%. Судинні клубочки щільні, їх капілярні петлі не містять формених елементів крові. Зміни тубулярного апарату кіркових нефронів при одночасній дії MI-1 і хлориду кобальту менші порівняно з окремою дією кожного агенту. Просвіт дистальних канальців дещо розширений, висота їх епітелію зменшується на 16,3%, що відповідає рівню змін при дії одного хлориду кобальту. Переважна більшість проксимальних ниркових канальців зберігають нормальну будову, висота їх епітеліальної стінки не змінюється. Розміри ядер більшості епітеліоцитів дистальних і проксимальних канальців залишаються на рівні контрольних значень. В дифузно локалізованих ділянках канальців з ознаками дистрофії епітелію зустрічаються гіпертрофовані ядра, що може свідчити про компенсаторні процеси в тубулярно апараті нирок. Судини не містять формених елементів крові, часто знаходяться у спалому стані.

Таким чином, MI-1 викликає пригнічення функціональної активності гломерулярного і тубулярного апарату нефронів. За умов оксидативного стресу нефротоксичність MI-1 по відношенню до тубулярного апарату зменшується, по відношенню до гломерулярного апарату – залишається без змін. Крім того, MI-1 знижує нефротоксичний вплив оксидативного стресу, викликаного хлоридом кобальту.



**RESEARCH OF NEPHROTOXICITY THE MALEIMIDE DERIVATIVE (1-(4-CL-BENZIL)-3-CL -4-(CF<sub>3</sub>-FENILAMINO)-1H-PIROL -2,5-DION) UNDER THE OXIDATIVE STRESS CONDITIONS**

*Kharchuk I.V., Ostrovska G.V., Yablonska S.V., Filinska O.M., Rybalchenko V.K.*

Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine  
e-mail: kharchukirina@ukr.net

Oxidative stress is a nonspecific organism reaction to an injury that promotes mobilization of antioxidant systems. Oxidative processes goes accompany carcinogenesis on all stages of tumor genesis and development, and oxidative stress state increases survival rate and metastasis of tumor. It is a base for investigation of effects of antineoplastic drugs under the oxidative stress conditions.

Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzil)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-fenilamino)-1H-pyrrole-2,5-dion (MI-1) which has been synthesized by ChemBiocenter of Taras Shevchenko Kiyv National University, is a potential antineoplastic target drug. MI-1 inhibits some proteinkinases, which play an important role in proliferation and growth cell processes on cancerogenesis condition. It causes cytostatic effect on the lines of human tumor and transformed cells while its injurious action on fast proliferated tissues such as rats spermatogenic epithelium are insignificant.

Low nephrotoxicity is an important precondition of potential drug. Our earlier researches indicated low nephrotoxic effect of MI-1 on the intact rats. The purpose of our investigation was morpho-functional state of kidneys under the MI-1 administration on the oxidative stress conditions.

The morpho-functionnal state of kidney has been investigated experimentally on 24 male rats with weight 180-200g. The oxidative stress was caused by daily intraperitoneal injection 0.1 ml CoCl<sub>2</sub> solution in dose 15 mg/kg during 10 days. Dose of the maleimide derivative was 5 mg/kg per os. There have been done standard histological manipulations for morphological investigation of kidney. The morphometric investigations have been effected by optical microscope Olympus BX-41. The cross-section areas of Bowman's capsules, vascular glomerulus, height of proximal and distal tubules epithelium of nephrons, epitheliocytes nuclei areas of these tubules have been measured on histological sections.

The substantial dystrophic changes caused by cobalt chloride mostly in the tubular apparatus of kidney cortical zone have been revealed. There were injured epithelia of proximal and distal tubules. The distal tubules epithelium became thinner on 16%, and area of epitheliocytes reduced on 12%. The epithelium height of the majority proximal tubules didn't change, and area of its epitheliocytes reduced on 13.5%. Decrease of epitheliocytes nuclei areas pointed at the functional reduction of cells. In the glomerular apparatus cross-section areas of Bowman's capsules reduced on 17%. Occurrence of significant zones with polymorphic-nuclei infiltration in the interstitial tissue around the capsules and between the tubules of kidney cortical zone is a sign of interstitial nephritis.

MI-1 caused some structural changes in glomerular and tubular apparatus of cortical nephrons. In the glomerular apparatus cross-section areas of Bowman's capsules reduced on 14%. Vascular glomeruli of the majority nephrons compacted, its areas and filling by blood cells decreased. In the tubular apparatus the distal tubules of nephrons changed more than proximal. Its lumens were dilated, epithelia height and epitheliocytes nuclei areas less than control values respectively on 23.6% and 5.5%. There was noticed blood circulation disturbance of kidney (decrease of cortical zone blood vessels filling) that is substantial factor of distal tubules pathogenesis in connection with more sensitivity of its epithelial cells to hypoxia. The majority of proximal kidney tubules kept normal structure but lumens some of its were dilated and epithelium height reduced on 10%. The features of protein degeneration were observed in solitary tubules that indicate an abnormality in the ultrafiltration-reabsorption system.

Changes in glomerular apparatus after simultaneous administration MI-1 and cobalt chloride are similar to changes which were induced by MI-1. Reduce of Bowman's capsules size was 12%. Vascular glomeruli were compacted; its capillary loops didn't contain blood cells. Changes in tubular apparatus of cortical nephrons after simultaneous administration MI-1 and cobalt chloride were less expressed as compared with individual action of each agent. The lumens of distal tubules were dilated, epithelium height reduced on 16%, that fit with changes under only cobalt chloride administration. The majority of proximal tubules reserved its normal structure; height of its epithelium didn't change. Nuclei sizes of the most epitheliocytes of distal and proximal tubules remained on the level of control values. The hypertrophic nuclei occurred in diffusely localized areas with the signs of epithelial dystrophy that indicated of compensatory process in kidney tubular apparatus.

Thus MI-1 provoked functional depression of nephrons glomerular and tubular apparatus. Under the oxidative stress conditions nephrotoxicity of MI-1 in respect to the tubular apparatus reduced, to the glomerular apparatus – remained without change. In addition MI-1 reduced nephrotoxic effect of the oxidative stress, caused by cobalt chloride.

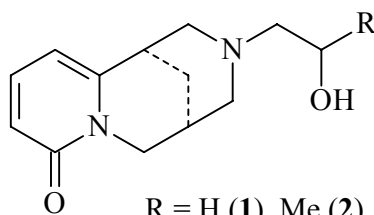


## АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ЦИТИЗИНА

*Хисамутдинова Р.Ю., Шишкин Д.В., Байбулатова Н.З., Басченко Н.Ж.*

УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: dokichev@anrb.ru

Ранее было показано, что гидрохлорид N-(2-гидроксиэтил)цитизина **1** обладает выраженными антиаритмическими свойствами на моделях первичного скрининга и при этом относится к малотоксичным соединениям [1]. В связи с этим исследования антиаритмической активности среди новых производных N-(2-гидроксиэтил)цитизина, и выявление зависимости строения – антиаритмическая активность в их ряду, актуальны и представляют практический интерес.



R = H (**1**), Me (**2**), Ad (**3**), Ph (**4**), CH<sub>2</sub>Cl (**5**)

Объектами исследования явились гидрохлориды N-(2-гидроксипропил)- **2**, N-[2-(1-адамантил)-2-гидроксиэтил]- **3**, N-(2-гидрокси-2-фенил)- **4** и N-(2-гидрокси-3-хлорпропил)цитизина **5**. Острую токсичность соединений изучали при их однократном внутривенном введении мышам. Скрининг антиаритмической активности проводили на крысах на аконитиновой и хлоридкальциевой моделях аритмий [2]. Эффективную (ED<sub>50</sub>) и летальную (LD<sub>50</sub>) дозы вычисляли по методу Литчфильда [3]. О терапевтической широте соединений судили по величине антиаритмического индекса (LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>).

Установлено, что на модели аконитиновой аритмии смешанного предсердно-желудочкового типа наибольшей антиаритмической активностью обладают гидрохлориды **3** и **4**, облегчая течение и сокращая продолжительность аритмии по сравнению с контролем. Антиаритмическая активность соединений **3** и **4**, ED<sub>50</sub> которых при профилактическом внутривенном введении составила 0.46 и 0.52 мг/кг соответственно, была ниже, чем у N-(2-гидроксиэтил)цитизина (ED<sub>50</sub> = 0.15 мг/кг).

На модели аритмии, вызванной хлоридом кальция, наибольшую противofiбрилляторную активность проявили гидрохлориды **2**, **3** и **4**. При профилактическом введении за 3 мин до аритмогена в дозах 0.4-0.6 мг/кг они предотвращали летальную фибрилляцию желудочков у 50-66% животных, тогда как в контрольных опытах нарушения ритма заканчивались гибелью всех животных. По абсолютной величине ED<sub>50</sub> гидрохлориды **2** (0.47 мг/кг), **3** (0.45 мг/кг), **4** (0.40 мг/кг,) в 2 раза уступают N-(2-гидроксиэтил)цитизину.

На фоне введения гидрохлорида **5** показатели ЭКГ у животных не возвращались к норме, а в ряде случаев наблюдалось ухудшение течения аритмии и гибель животных.

Изучение острой токсичности показало, что все соединения, согласно классификации ГОСТ 12.1.007.76, можно отнести к классу малотоксичных соединений. Антиаритмический индекс LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> соединений **3** и **4** на аконитиновой модели составил 154 и 188 соответственно. Гидрохлорид N-(2-гидроксиэтил)цитизина является наименее токсичным превосходит свои производные по антиаритмическому индексу.

Таким образом, в ряду производных N-(2-гидроксиэтил)цитизина антиаритмическую активность на обеих моделях аритмий проявили гидрохлориды с фенильным (**4**) и адамантильным (**3**) заместителями. На хлоридкальциевой модели аритмии противofiбрилляторная активность возрастает в ряду N-[2-(1-адамантил)-2-гидроксиэтил]-, N-(2-гидроксипропил)-, N-(2-гидрокси-2-фенилэтил)-цитизинов. Гидрохлорид **2**, содержащий метильную группу, теряет свою активность на аконитиновой модели аритмии.

### Литература:

1. Патент РФ 2228179; Бюл. Изобрет., 2004, 13.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., «Ремедиум», 2000. – С. 209–216.
3. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., «Медгиз», 1963.

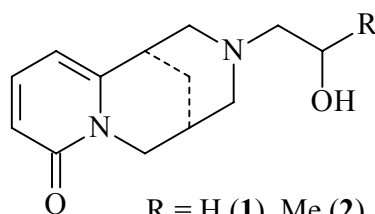


## ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY OF DERIVATIVES OF N-(2-HYDROXYETHYL)CYTISINE

*Khislamutdinova R. Yu., Shishkin D. V., Baibulatova N. Z., Baschenko N. J.*

Institute of Organic Chemistry Ufa Research Centre of the Russian Academy of Science,  
Ufa, Russian Federation  
e-mail: dokichev@anrb.ru

Earlier it was shown that N-(2-hydroxyethyl)cytisine hydrochloride **1** is effective in the treatment of arrhythmia on the primary screening experimental models and is a low toxic compound. In connection with that, the study of the antiarrhythmic activity of novel N-(2-hydroxyethyl)cytisine derivatives and the determination of the antiarrhythmic activity - structure dependence among them is actual and is of the practical interest.



N-(2-Hydroxypropyl)- **2**, N-[2-(1-adamantyl)-2-hydroxyethyl]- **3**, N-(2-hydroxy-2-phenyl)- **4** и N-(2-hydroxy-3-chlorinepropyl)cytisine **5** are compounds studied. An acute toxicity was studied at their single-fold intravenous injection to mice. Screening the antiarrhythmic activity was carried out on rats on simulated arrhythmia induced by aconitine and calcium chloride [2]. An effective (DE<sub>50</sub>) and lethal (DL<sub>50</sub>) doses were determined according to the Litchfield method [3]. An antiarrhythmic index value (DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>) characterized an antiarrhythmic compounds' effect.

Hydrochlorides **3** and **4** proved to be the most effective on the model of various atrial and ventricular rhythm disorders induced by aconitine, facilitating the course and contracting the duration of arrhythmia in comparison with control. An antiarrhythmic activity of **3** and **4**, which ED<sub>50</sub> at the prophylactic intravenous injection was 0.46 and 0.52 mg/kg, respectively, was lower than that of N-(2-hydroxyethyl)cytisine (DE<sub>50</sub> = 0.15 mg/kg).

On the model of calcium chloride intoxication, **2**, **3** and **4** hydrochlorides showed the highest antifibrillatory effect. When administered intravenously (0.4-0.6mg/kg) before 3 minutes of calcium chloride, these compounds were found to prevent the development of lethal ventricular fibrillation of 50-66% rats, whereas during the control experiments ended with death of all animals. In their DE<sub>50</sub> value **2**, **3** and **4** hydrochlorides (0.47 mg/kg; 0.45 mg/kg and 0.40 mg/kg respectively) are lower by 2 order than N-(2-hydroxyethyl)cytisine hydrochloride.

After the **5** hydrochloride injection electrocardiogram data of animals were not restored to normal ones and in some cases the aggravation of arrhythmia course and death of animals was observed.

The study of the toxicity was shown, that all the compounds can be related to a class of low toxic compounds. An antiarrhythmic index (DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>) of **3** and **4** derivatives on the model of aconitine intoxication was 154 and 188, respectively. N-(2-Hydroxyethyl)cytisine is the lowest toxic compound and excels its derivatives in the antiarrhythmic index.

Thus, among N-(2-hydroxyethyl)cytisine derivatives' hydrochlorides with phenyl (**4**) and adamantyl (**3**) substituents possess the antiarrhythmic properties on both models of cardiac rhythm disorders. On the model of arrhythmia induced by calcium chloride, an antifibrillatory activity increases in the series: N-[2-(1-adamantyl)-2-hydroxyethyl]-, N-(2-hydroxypropyl)-, N-(2-hydroxy-2-phenyl)cytisine. Hydrochloride of **2**, containing a methyl group loses its activity on the model of arrhythmia induced by aconitine.

### References:

1. Patent 2228179, Russia.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., «Ремедиум», 2000. – С. 209–216.
3. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., «Медгиз», 1963.





## ГОРМОН МЕЛАТОНИН ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ПРОТЕКТОР ГЕНОТОКСИЧНИХ ЕФЕКТІВ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ

Кіреєва С.С.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Київ, Україна  
e-mail: Kirieievas@yandex.ru

Прогрес сучасної променевої та хіміотерапії, серед якої все більше препаратів ДНК-пошкоджуючої дії, створює передумови для тривалого контакту організму онкологічного хворого з генотоксичними препаратами, які можуть призвести до розвитку вторинних пухлин. Це спонукає розробляти заходи превентивної терапії. Мутагенний та канцерогенний потенціал хіміопрепаратів та нова практика застосування агресивних доз опромінення та хіміотерапії вимагає проведення експериментальних досліджень змін в геномі соматичних клітин та клітин кісткового мозку, а також оцінки їх наслідків та розробки стратегії нової превентивної терапії. Превентивні препарати повинні мати антиоксидантну, антимуагенну та антиканцерогенну активність. Привертає увагу пінеальний гормон мелатонін як ймовірний превентивний препарат. Метою експериментального дослідження було вивчення антимуагенних властивостей мелатоніну як протектору генотоксичних ефектів протипухлинного препарату цис-платини у клітинах кісткового мозку.

Матеріали. Миші самки лінії С57В1/6 (вік 2-3 міс., вага тіла 20-25 г), утримувались за умов 12 год. циклу чергування світла та темряви з вільним доступом до їжі та води. Легенева карцинома Льюїса (LLC) перещеплювалась внутрішньом'язево по 0,2 мл суспензії з  $2 \times 10^5$  пухлинних клітин. Першій групі тварин цисплатина (Ebewe, Austria) вводилась інтраперитоніально у двох терапевтичних дозах 3мг/кг і 1 мг/кг ваги тіла; щодня о 13 годині, починаючи після 4 доби перещеплення LLC, протягом 10-13 днів. Другій групі тварин цисплатину вводили підшкірно у цих же дозах і мелатонін (Sigma, USA) у двох терапевтичних дозах: 1 мг/кг і 5 мг/кг ваги тіла, щодня о 17 годині, починаючи з 4 дня після перещеплення LLC, протягом 13-43 днів. Контрольні групи склали інтактні миші і миші з перещепленою LLC. Дослідження генотоксичних ефектів цисплатини і протекторної дії мелатоніну на кістковий мозок та периферичну кров були виконані протягом хіміотерапії цисплатиною та цисплатиною в поєднанні з мелатоніном (24 год. після кожної ін'єкції, 2-9 днів спостережень).

Методи: 1) ідентифікація клітин в апоптозі (апоптичний індекс, флуоресцентний барвник Hoechst 33342, Sigma); 2) цитогенетичний тест *in vivo*. Зразки фарбувались розчином Гімза (Sigma, USA), аналізувалось 100-50 метафаз з підрахунком хромосомних аберацій і кількості клітин з хромосомними та хроматидними розривами. 3) аналіз цитотоксичності препарату (цитотоксичний індекс, трипановий синій); 4) аналіз цитограм кісткового мозку та периферичної крові.

Результати та висновки. Генотоксичний ефект цисплатини у кістковому мозку був виявлений на 2-3 день обстеження і характеризувався появою клітин в апоптозі. В цей період (2-3 доба обстеження) апоптичний індекс склав  $40,3 \pm 0,88\%$  та  $26,3 \pm 0,41\%$ , а цитотоксичний індекс-  $48,8 \pm 0,79\%$  та  $23,6 \pm 0,33\%$ , відповідно. Впродовж збільшення дози цисплатини апоптичний індекс суттєво знижувався ( $7,0 \pm 0\%$ ), а цитотоксичний індекс зростає ( $61,0 \pm 0,33\%$ ). Після терапії апоптичний індекс склав  $0,6 \pm 0,33\%$ , а цитотоксичний індекс-  $13,3 \pm 2,88\%$ . Проліферація та диференціація усіх паростків кровотворення були пригнічені у кістковому мозку протягом всього цього періоду. Цисплатина індукувала хроматидні та хромосомні розриви. Хроматидні розриви були переважаючим типом хромосомних аберацій. Рівень клітин з хромосомними абераціями зростає (2-3 день обстеження, хромосомні аберації  $-6,2 \pm 0,3\%$ , хромосомні розриви-  $31$ ; 7 день-  $11,0 \pm 0,6\%$  та  $54$ , відповідно) і перевищував спонтанний рівень у  $3,5$ - $5$  разів.

Після терапії рівень клітин з хромосомними абераціями був вищим спонтанного рівня у  $2,5$  рази. В цей період на фоні відновлення клітин кісткового мозку були виявлені в окремих клітинах стабільні хромосомні аберації (делеції). Ці дані демонструють наявність клітин з нестабільним геномом та можливість ризику мутацій. Нестабільність геному у клітинах, які проліферують, може бути джерелом клональної селекції і еволюції генетично пошкоджених клітин, що призведе до трансформованого фенотипу. В крові були відмічалась поява бластних (незрілих) клітин. Прогеніторні мієлоцитарні клітини були виявлені за допомогою цитоморфологічного аналізу у периферичній крові. Встановлено, що молекулярні генетичні зміни, індуковані цисплатиною у клітинах кісткового мозку мишей С57В1/6 з трансплантованою LLC, передують цитоморфологічним змінам і є важливими генотоксичними пошкодженнями ДНК, що створюють передумови появи клітин з нестабільним геномом.

Введення цисплатини з мелатоніном виявило антимуагенну дію цього гормону. Відмічено суттєве зменшення клітин в апоптозі та рівня аберацій в клітинах кісткового мозку. Цитотоксичний ефект також знижувався. На фоні протекції генотоксичних ефектів цисплатини, мелатонін призвів до нормалізації клітинного складу кісткового мозку та крові. Ця робота демонструє, що пінеальний гормон може бути перспективним в якості протектора генотоксичності протипухлинної хіміотерапії. Відповідно отриманим даним, ця біологічно активна речовина має імуномодельючу та антипроліферативну дію на пухлини людини і може бути застосована для попередження розвитку вторинних пухлин. Мелатонін як біологічно активна речовина має також ряд переваг: ефективно знешкоджує вільні оксидні радикали (мелатонін є більш ефективним, ніж відомі антиоксиданти, наприклад, манітол, глутатіон і вітамін Е, у захисті макромолекул, в тому числі і ДНК); діє як імуномодулятор (шляхом інтерлейкінів 2, 4); ендокринні ефекти (інгібує мітогенну активність гормонів-естрогену, пролактину). Таким чином, пінеальний гормон мелатонін може бути перспективним для превентивної терапії генотоксичності протипухлинних препаратів.



## HORMONE MELATONIN AS PERSPECTIVE PROTECTOR OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF ANTICANCER THERAPY

Kirieleva S.S.

Institute of Cryobiology and Cryomedicine of Natl Ac Sci of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: Kirieivas@yandex.ru

The progress in present-day radio- and chemotherapy, in which prevails DNA-damaged drugs, make for long-term contact of cancer patients with genotoxic reagents, that can result in secondary tumors. It's required to work out a preventive therapy. The mutagenic and carcinogenic potential of chemotherapy drugs and novel practice of using the aggressive doses of irradiation and chemotherapy drugs require an experimental investigation on damage of somatic cells genome and bone marrow cells genome and valuing of their consequences; and to work out a strategy of new preventive therapy. Preventive drugs must have antioxidant, anti-mutagenic and anti-carcinogenic activity. We have paid attention to pineal hormone melatonin as a perspective preventive reagent. The aim of the study was the research of anti-mutagenic properties of pineal hormone melatonin as protector of the genotoxic effects of anticancer therapy cis-platinum in bone marrow cells.

**Materials.** Female C57Bl/6 mice (2-3 months old, 20-25g b.w.) were kept under a 12-h light/dark cycle with free access of food and water. Transplantation of Lewis lung carcinoma (LLC) was performed by injection i.m. of 0,2 ml of the tumor cell suspension consisting  $2 \times 10^5$  cells. Cis-platinum (Ebewe, Austria) was injected i.p., two therapeutic doses (1<sup>st</sup> group): 3 mg/kg and 1 mg/kg body weight; once a day at 1 p.m. from day 4 after transplantation of LLC through day 10 or day 13. Melatonin (Sigma, USA) was injected s.c., two therapeutic doses (2<sup>nd</sup> group): 1 mg/kg body weight and 5 mg/kg body weight; once a day at 5 p.m. from day 4 after transplantation of LLC through day 13 or day 43. Control groups: the group of intact mice and the group of mice with LLC. The investigation of genotoxic effects of cis-platinum and protective action of melatonin in bone marrow and peripheral blood were carried out during chemotherapy, cis-platinum and cis-platinum with melatonin (24-h. after each injection, 2-9 day of observation) and after therapy (13-43 day of observation).

**Methods:** 1) identification of cells on apoptosis (apoptosis index, fluorescent dye Hoechst 33342, Sigma); 2) cytogenetic test *in vivo*. Specimens were stained with Giemsa solution (Sigma, USA), 100-50 metaphases were analyzed with evaluated of chromosomal aberrations and number of cells with chromosomal and chromatide breaks.

3) cytotoxic analysis (cytotoxic index, tripan-dark-blue); 4) analysis of cytochromes of bone marrow and peripheral blood.

**Results and conclusions.** The genotoxic effect of cis-platinum (two therapeutic doses) in bone marrow was shown on 2-3 days of observation and was characterised with appearance of apoptosis cells. In this period apoptosis index was  $40,3 \pm 0,88\%$  and  $26,3 \pm 0,41\%$  and cytotoxic index was  $48,8 \pm 0,79\%$  and  $23,6 \pm 0,33\%$ , respectively. During enhanced doses of cis-platinum the apoptosis index suddenly reduced ( $7,0 \pm 0\%$ ) and cytotoxicity increased ( $61,0 \pm 0,33\%$ ). After therapy apoptosis index was  $0,6 \pm 0,33\%$  and cytotoxic index  $13,3 \pm 2,88\%$ . The proliferation and differentiation of all hematopoietic lines were inhibited in bone marrow during this period. Cis-platin induced chromatide breaks and chromosome breaks. Chromatide breaks were predominated type of chromosomal aberrations. The level of cells with chromosomal aberrations increased (2-3 days of observation chromosomal aberrations-  $6,2 \pm 0,3\%$ , chromosomal breaks-31; 7 day - $11,0 \pm 0,6\%$  and 54, respectively), what exceeded spontaneous level in 3,5-5 times.

After therapy level of cells with chromosomal aberrations were exceeded spontaneous level in 2,5 times. On this period on background of restoration of bone marrow cells were observed individual cells with stable chromosomal aberrations (deletion). This data demonstrated availability of cells with genome instability and possible risk of mutations. Instability of genome in proliferative cells have been a resource of clonal selection and evolution of genetically damaged cells leading to the abnormal precancer phenotype. In blood were noticed the appearance of blastic cells. Myelocyte cells progenitors were indicated by cytomorphological analysis of peripheral blood. It was determined that molecular-genetic changes induced by cis-platin in bone marrow cells of C57Bl/6 mice with LLC preceded cytomorphological changes; and, are essential genotoxic damages of DNA, that make prerequisite for appearance of cells with instable genome after chemotherapy.

During administration cis-platinum with melatonin was demonstrated the antimutagenetic effect of this hormone. The essential falling of apoptosis and aberration's level in bone marrow cells were noticed. The cytotoxic effect also reduced. On background of protection genotoxic effect of cis-platinum, melatonin shown to normalized the cells composition of bone marrow and blood. This work demonstrate that pineal hormone melatonin may be perspective as a protector genotoxicity of cancer chemotherapy. In accordance with data this biological active substance have immunomodulative and antiproliferative actions in human tumors, can be effectively used in prevention secondary tumors. Melatonin as a biological active reagent has a lot of advantages: effectively scavenges free oxygen radicals (melatonin seemed to be more effective than other known antioxidant (e.g., mannitol, glutathione, and vitamin E) in protecting macromolecules, particularly DNA); acts as immunomodulator (via interleukin 2,4); endocrine effects (inhibition of mitogenic active hormones- estrogen, prolactin). In conclusion the pineal the pineal hormone melatonin can be perspective in preventive therapy of genotoxic effects of anticancer drugs.



## ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ НАКОЖНЫХ АППЛИКАЦИЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОМ ДЕЙСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Кирсенко В.В., Яструб Т.А., Демченко В.Ф., Коваленко В.Ф., Леоненко Н.С.

ГУ «Институт медицины труда АМН Украины», Киев, Украина  
e-mail: T\_Yastrub@meta.ua

Токсикологическая опасность от попадания химических веществ на кожу в производственных условиях состоит в возможности возникновения профессиональных заболеваний кожи, а также разных по тяжести острых и хронических интоксикаций. Это - одна из актуальных медико-социальных задач в нашей стране и за рубежом. В условиях перманентного действия ядов или аварийных нештатных ситуаций на производстве профилактические мероприятия, направленные на разобщение контакта яда с кожей, как правило, недостаточно эффективны.

Вместе с тем, за счет процесса проницаемости кожи существует возможность накопления в этой ткани химических веществ, способных вступать во взаимодействие с проникающим агентом путем химических превращений, физико-химических взаимодействий, комплексообразования и т.д., что приводит к обезвреживанию потенциально опасного действия или существенному замедлению процесса его проникания через кожу. Обязательными условиями при этом являются свойства протектор не повреждать кожу при длительном соприкосновении с ней или депонировании в толще эпидермиса, а также сохранять активность по отношению к пенетранту. Примером подобных веществ может быть аскорбиновая кислота (АК), а ргіогі, удовлетворяющая этим требованиям: способность проникать через (в) кожу, совместимость с живой тканью, биологическая активность и реакционная способность АК хорошо известны.

Цель работы состояла в изучении защитных свойств АК, депонированной (импрегнированной) в эпидермисе после одно- или многократных ее аппликаций на кожу, в отношении кожно-резорбтивного действия токсических химических веществ, имеющих практическое применение (промышленных ядов, пестицидов, органических растворителей) на примере пестицидных препаратов «Фосфамида, 38% к.э.» (действующее вещество - диметоат) и «Харнесс, 81%, к.э.» (д.в. - ацетохлор).

Импрегирование кожи АК осуществляли путем однократных аппликаций на кожу 0,4 мл 0,5% водных растворов АК в опытах *in vitro* на изолированных лоскутах кожи крыс, помещенных в диффузионные камеры (S кожи - 5 см<sup>2</sup>; время экспозиции - 1 час). Оценку протекторных свойств АК проводили при последующем нанесении на кожу препарата «Харнесс, 81%, к.э.» на 4 часа в объеме 0,4 мл *per se* и измерении количества проникшего через кожу действующего вещества с использованием метода газожидкостной хроматографии. В условно-контрольной серии опытов исследуемый препарат наносили на необработанный лоскут кожи в таком же объеме и на ту же продолжительность времени.

В условно-контрольной группе опытов с однократной аппликацией АК содержание ацетохлора в рецепторной части диффузионной камеры составило 0,139±0,083 мкг/пробу, в опытной группе - 0,070±0,054 мкг/пробу (p < 0,05). Как следует из представленных данных, предварительное однократное нанесение 0,5% раствора АК почти в 2 раза уменьшало проникновение пестицида через кожу.

В опытах на крысах *in vivo* исследовали защитный эффект АК после повторных, в течение 10-15 дней, накожных аппликаций с последующим однократным нанесением препарата «Фосфамид, 38% к.э.» в токсической дозе. Для этого на выстриженный участок кожи крыс площадью 2x2 см<sup>2</sup> в области спинки в течение 14 дней (5 дней в неделю) наносили 0,5 мл 0,1% или 0,5% водного раствора АК до высыхания раствора (≈ 1 час). По истечении этого срока на 15-ый день на этот же участок кожи крыс наносили «Фосфамид, 38% к.э.» *per se* в дозе, эквивалентной 160 мг/кг (токсическая доза, вызывающая угнетение активности холинэстеразы на ≈ 70%). В условно-контрольных группах «Фосфамид, 38% к.э.» наносили крысам на интактную кожу. Оценку защитного действия проводили по степени снижения активности фермента холинэстеразы (АХЭ) цельной крови. АХЭ крови крыс при нанесении «Фосфамид, 38% к.э.» на обработанную кожу с использованием 0,1% и 0,5% водных растворов АК составила, соответственно 34,7±5,4% и 32,2±4,6%; на интактную кожу - 77,9±6,8%. Полученные результаты показывают, что нанесение на кожу крыс водных растворов АК низкой концентрации (0,5 и 0,1%) в течение 14 дней существенно снижает антихолинэстеразное действие фосфамида при однократной аппликации на кожу в токсической дозе 160 мг/кг. Наблюдается некоторая зависимость степени защитного эффекта от концентрации раствора аскорбиновой кислоты и длительности ее применения.

Таким образом, формирование в коже депо аскорбиновой кислоты в результате повторных накожных аппликаций слабых (0,5-0,1%) растворов составляет основное условие реализации ее протекторных свойств в отношении действующих через кожу потенциально опасных токсических соединений.

На основании проведенных исследований можно заключить, что водные растворы аскорбиновой кислоты (0,5-0,1% концентрации) при повторном накожном нанесении представляются перспективным средством фармакологической коррекции вредных воздействий химических веществ кожно-резорбтивного действия, попадающих на кожу в процессе трудовой деятельности человека.



## PROTECTIVE EFFECT OF SKIN APPLICATIONS OF ASCORBIC ACID AT DERMAL EXPOSURE TO CHEMICAL SUBSTANCES

*Kirsenko V. V., Yastrub T.A., Demchenko V.F., Kovalenko V.F., Leonenko N.S.*

Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kiev, Ukraine  
e-mail: T\_Yastrub@meta.ua

Toxicological risk from the effect of chemical substances on the skin during occupational activity consists in possibility of rising professional skin disease or acute and chronic intoxications, that makes an actual medico-social problem in our country and abroad. Existent prophylactic measures directed on to disconnect of contact of substances with skin, as a rule, are insufficient.

At the same time, due to the process of permeability of skin there is possibility of accumulation in this tissue of chemical matters, able to enter into co-operation with a penetrable agent by chemical transformations, physical and chemical co-operations, forming complexes and etc, that results in rendering harmless potentially dangerous effect or substantial deceleration of process of his penetrating through a skin.

At that the obligatory conditions of protector are its properties to not damage a skin at the protracted contiguity with it or depositing in the layer of epidermis, and also to save activity in relation to penetrant. Similar matters ascorbic acid (AA) can exemplify, *a priori*, satisfying to these requirements: ability to penetrate through (ib) skin, compatibility with living tissue, biological activity and reactionary ability of AA, is well known.

The purpose of work consisted of study of protective properties of AA, deposited into epidermis after single or multiple applications on a skin, in regard to the dermal exposure of toxic chemical substances having practical application (industrial poisons, pesticides, organic solvents) on the example of formulation «Phosphamide, 38% EC» (active substances - dimethoate) and «Harness, 81%, EC» (a.s. - acetochlor).

The impregnation of skin of AA was carried out by single application on a skin by 0,4 ml 0,5% waters solutions of AA in the experiments of in vitro on the isolated sheets of skin of the rats placed in diffusive chambers (S skins - 5 sm<sup>2</sup>; exposition - 1 hour). Conducted the estimation of protectors properties of AA at the subsequent causing on the skin of formulation «Harness, 81%, EC.» on 4 hours in a volume 0,4 ml of *per se* and measuring of amount of operating matter penetrating through a skin with the use of method of gas-liquid chromatography. In the -control series of experiments inflicted the explored preparation on the untilled sheet of skin in the same volume and on that duration of time.

In the control group of experiments with a single application AA maintenance of acetochlor in receptor part of diffusive chamber made a 0,139±0,083 mcg/test, in an experimental group - a 0,070±0,054 mcg/test (p <0,05). As follows from the presented information, preliminary single causing a 0,5% solution of AA almost in 2 times diminished penetration of pesticide through a skin.

In experiments on rats in vivo explored the protective effect of AA after repeated, during 10-15 days, skin applications with the subsequent single causing of formulation «Phosphamide, 38% EC» in a toxic dose. For this purpose on the cut off area of skin of rats by an area 2x2 sm<sup>2</sup> in area of the back during 14 days (5 days in a week) inflicted 0,5 ml a 0,1% or 0,5% water solution of AA to drying out of solution (≈ 1 hour). After expiration of this term on a 15th day on the same area of skin of rats inflicted «Phosphamide, 38%EC» *per se* in a dose equivalent 160 mg/kg (toxic dose causing oppressing of activity of cholinesterase on U 70%). In controls to the group «Phosphamide, 38% EC» inflicted to the rats on an intact skin. The estimation of protective action was conducted on the degree of decline of activity of enzyme of cholinesterase (AChE) of whole blood. AChE bloods of rats at causing «Phosphamide, 38% EC» on the treated skin with the use of 0,1% and 0,5 % waters solutions of AA made, according to 34,7±5,4% and 32,2±4,6%; on an intact skin are 77,9±6,8%. Got results show that causing on the skin of rats of waters solutions of AA low concentration (0,5 and 0,1%) during 14 days substantially reduces the AChE activity of phosphamide at a single application on a skin in a toxic dose 160 mg/kg. There is some dependence of degree of protective effect on the concentration of solution of ascorbic acid and duration of its application.

Thus, forming in the skin of depot of ascorbic acid as a result repeated skin applications of weak (0,5-0,1%) solutions makes the basic condition of realization of its protectors properties in regard to operating through a skin potentially dangerous toxic connections.

It is possible to conclude on the basis of the conducted researches, that waters solutions of ascorbic acid (0,5-0,1% concentration) at the repeated skin applications causing appear by the perspective mean of pharmacological correction of adverse effects of chemical substances of dermal exposure, getting on a skin in the process of working activity of man.



## ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНОГО ЕФЕКТУ ЕКСТРАКТУ ГАЛЕГИ ЛІКАРСЬКОЇ (*GALEGA OFFICINALIS L.*)

*Клевєта Г., Котик А., Скибіцька М., Чайка Я., Сибірна Н.*

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна  
e-mail: klevetag@mail.ru

Цукровий діабет – захворювання, яке характеризується хронічною гіперглікемією, що є основною причиною порушень інших видів обміну речовин. Гіперглікемія прямо чи опосередковано впливає на зміну експресії генів різних білків, що беруть участь у патогенезі і механізмах розвитку як основного захворювання, так і судинних ускладнень діабету.

На сьогоднішній день ведуться інтенсивні пошуки нових лікарських препаратів цукрознижувальної дії. Особлива увага звертається на вивчення лікарських рослин, що використовуються у народній медицині для лікування цукрового діабету, і з'ясування природи речовин, що зумовлюють цю дію.

Аналіз механізмів дії існуючих на ринку України синтетичних препаратів, що володіють цукрознижувальною дією, дає підстави вважати отримані з галеги лікарської цукрознижувальні препарати перспективними при лікуванні хворих на цукровий діабет.

Мета роботи – дослідження динаміки змін концентрації глюкози у щурів на моделі експериментального цукрового діабету за впливу галеги лікарської.

Експериментальний діабет індукували введенням стрептозотоцину внутрішньочеревно у дозі 7 мг на 100 г маси тіла тварин. Для досліджень використовували тварин, у яких 2 тижні після введення токсиканту глікемія становила 8 ммоль/л (після 18-годинного голодування).

Встановлено, що спиртовий екстракт галеги лікарської (у концентрації 0,6 г/кг маси тіла тварини) підвищує толерантність до глюкози у здорових щурів на 39 % та 52% відповідно на 3-й та 6-й день введення.

Гіпоглікемічну дію галеги лікарської за умов стрептозотоцинового діабету, досліджували впродовж 12 днів. Встановлено зниження концентрації глюкози на 51% (3-й день), на 60% (6-й день), на 56% (9-й день) та на 69% (12-й день). Найбільш виражена цукрознижувальна дія показана на термінальному етапі експерименту, причому на 12-й день експерименту відмічено наближення концентрації глюкози до значень, характерних для контрольних тварин.

Проведені дослідження підтверджують цукрознижувальну активність спиртового екстракту галеги лікарської як у контрольних тварин, так і тварин зі стрептозотоциновим діабетом. Порівняльний аналіз гіпоглікемічної дії у контрольних та діабетичних тварин вказує на більш ефективний вплив на толерантність до глюкози у щурів при застосуванні екстракту при діабеті.



## **THE INVESTIGATION HYPOGLYCEMIC EFFECT OF THE EXTRACTS OF GALEGA OFFICINALIS**

*Kleveta G., Kotyk A., Skybitska M., Chajka Ya., Sybirna N.*

Ivan Franko Lviv National University, Lviv, Ukraine  
e-mail: klevetag@mail.ru

Diabetes mellitus is a disease characterized by chronic hyperglycemia, which is the underlying reason for other types of alterations in metabolism. Hyperglycemia directly or indirectly leads to gene expression changes of various proteins participating in pathogenesis, as well as in the development of the main disease and its vessel complications caused by diabetes.

At present an extensive search for modern medicine with sugar reducing effects is being conducted. Special attention is paid to the research of herbs that are used in folk medicine for the treatment of diabetes mellitus, as well as to the discovery of substances causing the effect.

The analysis of the available Ukrainian synthetic medicine mechanisms which lead to sugar reduction indicates that there are long term prospects for the sugar reducing medicine made of Galega Officinalis for the treatment of diabetes mellitus.

The overall aim of the research is to investigate the dynamics of glucose concentration changes in rats under experimental diabetes mellitus caused by Galega Officinalis.

The experimental diabetes mellitus was induced by streptozotocin, which administered intra-abdominally in the dose of 7 mg per 100 g of the animal body mass. The research was carried out on the animals the glycemia of which was 8 mmol/l (after an 18-hour fast) in a fortnight after the toxicant administration.

It was found that the alcohol extract of Galega Officinalis increases the glucose tolerance of healthy rats by 39% and 52% of the third and sixth day of administration correspondingly.

The hypoglycemia effect of Galega Officinalis (in the concentration of 0.6 g/kg of the animal body mass) under streptozotocin-induced diabetes was investigated for 12 days. The glucose concentration decreased by 51% on the third day, by 60% on the sixth day, by 56% on the ninth day, and by 69% on the twelfth day. The sugar reducing effect was the most marked during the terminal stage of the experiment. Moreover, the glucose concentration was closest to that of the control animals on the twelfth day.

The research findings prove the sugar reducing effect of the alcohol extract of Galega Officinalis both on control animals and animals with streptozotocin-induced diabetes. The comparative analysis of hyperglycemic effects on control and diabetic animals shows more visible effects on the glucose tolerance in rats after the administrations of the extract under diabetes.



## КОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КРЫМСКИХ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ (*LAVANDULA VERA* И *SALVIA SCLARIA*) ПРИ ПРОЦЕССАХ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Князева О.А.<sup>1</sup>, Конкина И.Г.<sup>2</sup>, Князев А.В.<sup>3</sup>

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия  
УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: olga\_knyazeva@list.ru, irkonk@anrb.ru

Для торможения неопластических процессов особый интерес представляют вещества, обладающие наряду с противоопухолевой активностью иммуномодулирующими свойствами. Есть указания, что к ним можно отнести эфирные масла различных растений [Сюрин С.А., 2006]. Основное содержание эфирных масел представлено терпеноидами, которые обладают чрезвычайно широким спектром физиологического действия. В частности, отмечено иммунокорригирующее действие как индивидуальных соединений терпенового ряда, так и эфирных масел (Леонова Н.С., 2001, Князева О.А. и др., 2008). Анτικанцерогенный эффект отмечен для лимонена (metyl-4-isopropenyl cyclohexene), который повышает уровень энзимов, включенных в цепочку элиминирования канцерогенов.

Ранее было показано, что снижение уровня опухолеассоциированного антигена СА-125 в плазме крови онкологических больных до и после проведения химиотерапии коррелирует с изменением уровня конформационной формы С3 компонента комплемента С3(Н<sub>2</sub>О) [Князева О.А. и др., 2007]. Было показано, что конформационный переход С3 в форму С3(Н<sub>2</sub>О) является ответом иммунной системы на развитие неопластического процесса. В связи с этим его можно использовать в качестве критерия эффективности воздействия биологически активных веществ на канцерогенез.

Нами была проведена серия экспериментов, включающих исследование противоопухолевой активности крымских эфирных масел *Lavandula vera* и *Salvia sclaria* в режиме ароматерапии (АРТ) на мышцах линии Balb/C, а также конформационных изменений С3 под влиянием АРТ в процессе инкубации сыворотки крови больных с диагнозами: рак молочной железы (I-IIa), мастопатия лимфогранулематоз (IIa), неходжкинские лимфомы.

Было показано ингибирующее влияние АРТ на рост опухолевых клеток Sp 2/0 Ag14, выражающееся в торможении развития асцита у мышей на 54,5 % и увеличении их продолжительности жизни более чем на 100 % по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Определение уровня С3(Н<sub>2</sub>О), проведенное методом ИФА с помощью специфических моноклональных антител в сыворотках крови онкологических больных и здоровых доноров в процессе инкубации показало, что после курса АРТ происходит выравнивание уровня С3(Н<sub>2</sub>О) в сторону контрольного. Особенно интересным на наш взгляд явилось то, что наблюдаемый до процедур повышенный относительно контроля уровень С3(Н<sub>2</sub>О) [Князева О.А. и др., 2007] после курса АРТ снижался или был менее выраженным. При этом уровень С3 становился выше на протяжении всего периода наблюдений. Известно, что снижение содержания С3 коррелирует с другими иммунными нарушениями, сопутствующими онкологическим заболеваниям, поэтому повышение уровня С3 и коррекция профиля его конформационных изменений в процессе инкубации сыворотки крови может свидетельствовать о противоопухолевом воздействии данных эфирных масел в режиме АРТ, а также благоприятном корригирующем влиянии на иммунную систему в целом.



**CORRIGENT INFLUENCE OF CRIMEAN VOLATILE OILS (*LAVANDULA VERA* И *SALVIA SCLARIA*) ON PROCESSES OF CARCINOGENESIS**

*Knyazeva*<sup>1</sup> O., *Konkina*<sup>2</sup> I., *Knyazev*<sup>3</sup> A.

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

URAN Institute of Organic Chemistry at Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa, Russia

Institute of Biochemistry and Genetics at Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa, Russia

e-mail: olga\_knyazeva@list.ru, irkonk@anrb.ru

For inhibiting neoplastic processes of particular interest are substances possessing immunomodulating properties alongside with antitumoral activity. There is evidence that volatile oils can be reckoned among them [S. Syurin, 2006]. The main content of volatile oils is represented by terpenoids which are characterized by a very wide spectrum of physiological effect. In particular, immunocorrigent effect of both individual compounds of terpenoids and volatile oils [N. Leonova, O. Knyazeva et al., 2008]. Anticarcinogenic effect has been noticed for limonene (metyl-4-isopropenyl cyclohexene), which raises the level of enzymes included in the chain of carcinogen elimination.

It was shown earlier that the sag of tumor-associated antigen CA-125 in blood plasma of oncological patients before and after chemotherapy correlates with changing the level of conformational form C3 component of C3(H<sub>2</sub>O) complement [O. Knyazeva et al., 2007]. It was shown that conformational transition of C3 into the form of C3(H<sub>2</sub>O) is the response by immune system to the development of neoplastic process. Owing to this it can be used as a criterion of efficiency of effect of biologically active substances on carcinogenesis.

We have made a series of experiments including the study of anticarcinogenic effect of Crimean volatile oils *Lavandula vera* and *Salvia sclaria* in the mode of aroma therapeutics (ART) on mice of branch Balb/C as well as conformational changes of C3 under the influence of ART in the process of incubation of blood serum of patients with the following diagnoses: breast cancer (I-IIa), mastopathy, lymphogranulomatosis (IIa), non-Hodgkin's lymphoma.

The abscopal effect of ART on the growth of cancer cells Sp 2/0 Ag14 becoming apparent in inhibition of development of ascites with mice by 54,5 % and prolongation of their life more than by 100% compared with the control set ( $p < 0,05$ ) have been shown.

C3(H<sub>2</sub>O)-level test performed by immuno-enzymatic analysis with the help of specific monoclonal antibodies in blood serums of oncological patients and healthy donors in the process of incubation has shown that after the ART course a shift of C3(H<sub>2</sub>O) towards control level takes place. Of particular interest from our point of view is the fact that the level of C3(H<sub>2</sub>O) that used to be high compared to control set before the treatment [O. Knyazeva et al., 2007] had a tendency to lowering and was less pronounced. At the same time the level of C3 was getting higher during all the observation period. It is known that the reduction of C3 content correlates with other immune disorders accompanying oncological diseases, so the rise of level of C3 and the correction of the profile of its conformational changes in the process of blood serum incubation can be evidence of antitumoral effect of these volatile oils in the mode of ART as well as their beneficial effect on the immune system as a whole.





## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И ВВЕДЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Кокошкина О. А., Запорожченко А. В., Станев А. И.*

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Одесса, Украина  
e-mail: sana33@ukr.net

Алкогольдегидрогеназы (АДГ- азы) относятся к категории наиболее полифункциональных ферментов, интегральные функции которых весьма разнообразны – метаболизм ретиноидов, катаболизм нейромедиаторов, превращения стероидных гормонов, процессы синтеза холестерина и желчных кислот и т. д. К механизмам регуляции активности АДГ может относиться наличие пространственно разделенных изоформ фермента, имеющих различные кинетические характеристики и, возможно, независимую регуляцию клеточными метаболитами.

Цель работы состояла в изучении возможности регуляции активности цитоплазматической и митохондриальной АДГ при введении никотиновой кислоты и рентгеновском облучении крыс на ранних сроках наблюдения.

Исследования проведены на крысах линии Вистар. 1 группа - интактные животные. Крысам 2 группы внутримышечно вводили никотиновую кислоту (НК) в дозе 10 мг/кг массы. Животных 3 группы подвергали однократному общему рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр. Крысам 4 группы вводили никотиновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы и подвергали рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр. Через 1 и 6 часов в цитозольной и митохондриальной фракции печени, мозга, тонкого кишечника и гемолизате крови определяли активность электрофоретических изоформ АДГ.

При анализе электрофореграмм с цитоплазматической АДГ, нами отмечено, что рентгеновское облучение крыс, не вызывая появления новых электрофоретических форм в печени, все же способствует изменению активности отдельных форм, в частности снижению активности АДГ1. Аналогичные изменения отмечены в тканях мозга и тонкого кишечника, но при этом в мозге отмечалось появление новой электрофоретической формы, а в тонком кишечнике исчезновение активности двух электрофоретических форм. Через 6 часов отмечались изменения активности электрофоретических форм цитоплазматической АДГ при сравнении с данными, полученными через 1 час после рентгеновского облучения.

Оценивая изменение активности электрофоретических форм цитоплазматической АДГ в зависимости от концентрации субстрата в исследованных группах, следует отметить, что при рентгеновском облучении через 1 час и 6 часов в печени, мозге и тонком кишечнике существенных изменений активности электрофоретических форм цитоплазматической АДГ отмечено не было. В контрольной группе выраженные изменения были выявлены в тканях мозга и тонкого кишечника - наблюдалось повышение активности электрофоретических форм АДГ1 и АДГ2 при увеличении концентрации субстрата от 1 до 10 мМ.

Введение НК также вызывало изменение активности электрофоретических форм цитоплазматической АДГ в различной степени в исследованных тканях в зависимости от ткани и времени после рентгеновского облучения. При изменении концентрации субстрата отмечались незначимые колебания активности электрофоретических форм АДГ в исследованных тканях.

При сочетанном воздействии рентгеновского облучения и НК нами не выявлено защитное действие НК на активность электрофоретических форм цитоплазматической АДГ в исследованных тканях. При изменении концентрации субстрата изменение активности электрофоретических форм АДГ отмечалось в печени и тонком кишечнике, особенно через 1 час после воздействия.

В митохондриальной фракции также отмечалось модифицирующее действие рентгеновского облучения на активность электрофоретических форм митохондриальной АДГ в печени и особенно мозге и тонком кишечнике через 6 часов после рентгеновского облучения.

При введении НК изменения имели менее выраженный характер. Сочетанное воздействие рентгеновского облучения и НК вызывало существенные изменения как активности, так и количества электрофоретических форм митохондриальной АДГ во всех исследованных тканях через 1 и 6 часов после воздействия. Изменение концентрации субстрата в исследованных группах животных вызывало изменения активности электрофоретических форм АДГ в тканях, особенно выраженные при введении НК.

Таким образом, отмечено модифицирующее действие экспериментальных факторов рентгеновского облучения и НК на активность и наличие электрофоретических форм как цитоплазматической АДГ, так и митохондриальной АДГ.

Наличие большего количества изоэлектрофоретических форм АДГ может быть обусловлено наличием множественных молекулярных форм ферментов и посттрансляционными модификациями полипептида. Изменения полипептида-энзима могут быть связаны также с модифицирующим действием различных факторов, в том числе и радиационного воздействия на организм.



**RESEARCH OF ACTIVITY ELECTROPHORETIC IZOFORMS OF CYTOPLASMATIC AND MITOCHONDRIAL ALKOGOL DEHYDROGENASE AFTER X-RAY IRRADIATION AND INJECTION OF NICOTINIC ACID IN TISSUES OF RATS**

*Kokoshkina O.A., Zaporozhchenko A.V., Stanev A.I.*

Odessa National University named after I. I. Mechnikov, Odessa, Ukraine  
e-mail: sana33@ukr.net

Alkohol dehydrogenases (ADG-ases) is most multifunctional enzymes the integral functions of which are very various - is metabolism of retinoids katabolizm of neurotransmitters, transformations of steroid hormones, processes of synthesis of cholesterol and bilious acids and others processes. To mechanisms of regulation of activity ADG can concerns presence of spatially divided isoforms of the enzyme having various kinetic characteristics and, probably, independent regulation cellular metabolites.

The purpose of work consisted of study of possibility of regulation activity by a cytoplasmatic and mitochondrial at injection of nicotine acid and x-ray irradiation of rats on the early terms of supervision.

Researches are conducted on the rats of Vistar line. a 1st group - is intact animals. To the rats of 2nd group intramuscular entered nicotine acid (NA) in a dose 10 mg/kg of mass. 3rd group of animals exposed to the single general x-ray irradiation in a dose 6 Gr. 4th group of rats entered nicotine acid in a dose 10 mg/kg of mass and exposed to the x-ray irradiation in a dose 6 Gr. Through 1 and 6 hours in cytosolic and mitochondrial fraction of liver, cerebrum, thin intestine and hemolysis blood determined activity of electrophoretic isoforms ADG.

At the analysis of electrophorogrammes with cytoplasmatic ADG, it is marked by us, that the x-ray irradiation of rats, not causing appearance of new electrophoretic forms in a liver, it promote in a change activity of separate forms, in particular to the decrease of activity of ADG1. Analogical changes are marked in tissues of cerebrum and thin intestine, but here appearance of new electrophoretic form registered in a cerebrum, and in a thin intestine disappearance of activity of two electrophoretic forms. In 6 hours changes activity of electrophoretic forms of cytoplasmatic ADG were marked when compared to information, got in 1 hour after a x-ray irradiation.

Estimating a change activity of electrophoretic forms of cytoplasmatic ADG depending on the concentration of substrate in investigational groups, it should be noted that at a x-ray irradiation in 1 hour and 6 hours in a liver, cerebrum and thin intestine of substantial changes activity of electrophoretic forms of cytoplasmatic ADG marked it was not. In a control group the expressed changes were exposed in tissues of cerebrum and thin intestine - there was an increase of activity of electrophoretic forms of ADG1 and ADG2 at the increase of substrate concentration from 1 to 10 mM.

Injection of NA also caused a change activity of electrophoretic forms of cytoplasmatic ADG in a different degree in investigational tissues depending on tissues and time after a x-ray irradiation. At a change of the substrate concentration the unmeaningful vibrations of activity electrophoretic forms of ADG were marked in investigational tissues.

At combined influence of x-ray irradiation and NA we are not expose the protective operating of NA on activity of electrophoretic forms of cytoplasmatic ADG in investigational tissues. At a change of the substrate concentration a change activity of electrophoretic forms of ADG registered in a liver and thin intestine, especially in 1 hour after influence.

In mitochondrial fraction also the modifying operating of x-ray irradiation registered on activity of electrophoretic forms of mitochondrial ADG in a liver and especially cerebrum and thin intestine in 6 hours after a x-ray irradiation.

At injection of NA change had the less expressed character. Combined influence of x-ray irradiation and NA caused the substantial changes of both activity and amount of electrophoretic forms of mitochondrial ADG in all investigational tissues through 1 and 6 hours after influence. A change of substrate concentration in the investigational groups of animals caused changes activity of electrophoretic forms of ADG in tissues, especially expressed at injection of NA.

Thus, the modifying operating of experimental factors of x-ray irradiation and NA is marked on activity and presence of electrophoretic forms both cytoplasm ADG and mitochondrial ADG.

The presence of greater amount of isoelectrophoretic forms of ADG can be conditioned the presence of plural molecular forms of enzymes and posttransmission modifications of polypeptide. Change of polypeptide-enzyme can be related also to the modifying action of different factors, including radiation-damage on an organism.



## МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ТОТАЛЬНОМУ РЕНТГЕНОВСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ХИТИН-ПРОТЕИНОВОГО КОМПЛЕКСА

*Коломийчук Т.В.,<sup>1</sup> Черно Н.К.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, Одесса, Украина

<sup>2</sup>Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, Украина

e-mail: Kolomiychuk\_odes@mail.ru

В настоящее время остается актуальным поиск и создание новых биологически-активных веществ природного происхождения для повышения устойчивости организма при действии негативных факторов окружающей среды. Известно, что функциональная активность эритроцитов зависит от устойчивости мембран к повреждающему действию продуктов перекисного окисления липидов и способности мембраны эритроцитов к деформации, необходимой для свободного движения клеток по капиллярам.

Поэтому целью наших исследований явилось определение перекисной резистентности мембран эритроцитов и индекса их ригидности после тотального однократного рентгеновского облучения крыс на фоне применения хитин-протеинового комплекса.

В качестве объекта исследования был использован хитин-протеиновый комплекс (ХПК), полученный на кафедре органической химии Одесской национальной академии пищевых технологий (г. Одесса, Украина) из панциря ракообразных, содержащий каротиноиды, фенольные компоненты, белок и липиды. Исследования были проведены на 27 белых нелинейных крысах самцах в возрасте 7 месяцев и массой 311,5±3,9 г. Все животные были разделены на 4 группы, где первая — интактные животные, вторая и четвертая — крысы, получавшие в корм добавку ХПК на протяжении 60 суток эксперимента, а третья и четвертая — животные, которые на 30 сутки эксперимента были подвергнуты общему однократному рентгеновскому облучению в дозе 5,0 Гр на установке РУМ-17 (160 кВ, 10 мА, фильтр 0,5 мм Си и 0,1 мм А1).

Контроль массы тела животных проводили до и каждые 15 суток эксперимента. На 60 сутки эксперимента в крови животных всех групп исследовали перекисную резистентность эритроцитов и показатель деформируемости (индекс ригидности) эритроцитов. Полученные результаты были обработаны с использованием программы «Statistica».

Установлено, что после применения ХПК во 2 группе животных показатель перекисной резистентности и индекс ригидности эритроцитов крови крыс значительно не изменились по отношению к контрольным животным. У животных 3 группы, подвергнутых только рентгеновскому облучению, в конце эксперимента выявлено нарушение структурно-функциональных свойств клеточных мембран: повышение (по сравнению с контрольной группой) индекса ригидности на 31 % и снижение на 26 % устойчивости мембран эритроцитов к действию перекиси водорода ( $p < 0,05$ ).

Ранее нами было установлено, что ХПК способствует снижению риска развития «истощения» антиоксидантной системы. Также способствует восстановлению баланса между процессами перекисного окисления липидов и антиокислительной активностью в организме крыс в пострadiационный период. При применении ХПК до и после облучения на протяжении 30 суток у крыс 4 группы отмечена тенденция к нормализации исследуемых показателей по сравнению с интактными животными. Отмечено повышение резистентности мембран эритроцитов на 14 % и снижение индекса ригидности на 11 % на фоне достоверного снижения уровня малонового диальдегида по сравнению с облученными животными.

Таким образом, отмеченные изменения при действии рентгеновского облучения могут быть обусловлены изменением морфо-функциональных свойств эритроцитов в связи с нарушением липидного обмена, дисбалансом между уровнем антиоксидантов и оксидантов, играющих важную роль в поддержании архитектоники мембран и их ригидности. Данные изменения могут приводить к нарушению целостности мембран клеток крови.

Улучшение морфо-функциональных свойств эритроцитов крови облученных крыс на фоне применения хитин-протеинового комплекса указывает на перспективность его применения, одним из свойств которого, наряду с антиоксидантными свойствами, является высокая сорбционная способность.



## **MORPHO-FUNCTIONAL PROPERTIES OF RATS BLOOD ERYTHROCYTES EXPOSED TO THE X-RAY RADIATION WITH TREATMENT BY CHITIN-PROTEIN COMPLEX**

*Kolomiychuk T.V.<sup>1</sup>, Chernov N.K.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Odesa National Mechnikov University, Odesa, Ukraine

<sup>2</sup>Odesa National Academy of Food Technologies, Odesa, Ukraine

e-mail: Kolomiychuk\_odes@mail.ru

Actual aims of the modern physiology are search and creation of biologically active compounds of natural origin suitable for enhancement of the organism's resistance to negative environmental influence. It is well known that functional activity of erythrocytes depends from membranes' resistance to impairing by products of lipids' peroxidise oxidation and membrane's ability to cells' shape adjustment during their movement in capillaries.

Thus, the aim of our study was a detection of erythrocytes' membrane resistivity to peroxidation and their rigidity index after single disposal of rats to the X-Ray radiation together with treatment by chitin-protein complex.

We have chosen a chitin-protein complex (CPC) synthesized at a Chair of Organic Chemistry of Odesa State Academy of Food Technologies (Odesa, Ukraine) from crustaceans crust that contains carotenoids, phenol elements, proteins and lipids. Our study was performed at 27 white wild-type 7 month old male rats, weight  $311.5 \pm 3.9$  g. All experimental animals were divided in four groups where the first group was intact, second and fourth group were receiving CPC with food during 60 experimental days, and third and fourth groups were exposed to the X-Ray radiation dose 5,0 Gr at a 30 rd experimental day.

Animals' body mass control was performed before the start of experiment and in 15 days periods during experiment. At a 60<sup>th</sup> day of experiment erythrocytes' resistivity to peroxidation and rigidity index were investigated in blood samples taken from animals of all groups. Raw data were processed with "Statistica" software.

We have shown that after the CPC treatment in the second group the value of resistivity to peroxidation and rigidity index were not changed significantly compared to control group. In the 3<sup>rd</sup> animals group that was exposed to the X-Ray radiation, in the end of experiment we revealed abnormalities in structural-functional properties of cell membranes: increase (compared to control group) of the rigidity index on 31% and decrease of membranes' resistivity to peroxidation on 26% ( $p < 0.05$ ).

As we have shown previously, CPC promotes a decrease of probability of "attenuation" of antioxidant system. Also CPC supports restoration of a balance between processes of lipids peroxidation and antioxidant activity in rats' organism during after-radiation period. At a background of CPC treatment during 30 days before and after exposal to radiation rats of the fourth group manifested a tendency to normalize observed parameters as compared to intact animals. In particular, these animals manifested an increase of erythrocytes' membrane resistivity on 14% and decrease of rigidity index on 11% together with significant decrease of contain of malonic dialdehyde as compared to radiation-exposed group.

Thereby, alterations in physiological parameters provoked by X-Ray radiation can be a sequence of changes in morphological-functional properties of erythrocytes due to the lipid metabolism and misbalance of oxidant-antioxidant ratio that plays an important role in maintenance of membranes' architectonics and rigidity.

Improvement of morphological-functional properties of erythrocytes in radiation-exposed rats' blood at a background of chitin-protein complex treatment reveals good perspectives of use of CPC which could propagate antioxidant properties together with high sorptive power.



## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИИ БАД НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

*Комаров Б.А., Трескунов К.А., Погорельская Л.В., Албулов А.И., Червинец В.М.*

ИПХФ РАН, Больница НЦЧ РАН, Черноголовка, Россия  
ГОУ ДПО «РМАПО» г. Москва, Россия  
ВНИТИ БП РАСХН, Щелково, ТМА, Тверь, Россия  
e-mail: komarov@chgn.net.ru

С 1992 г метод получения БАД на основе хитозана и лекарственных растений постоянно находился в стадии развития и усовершенствования. Удалось сочетать стадии получения хитозана полифракционного состава по молекулярной массе (ММ) и степени деацетилирования с получением экстрактов лекарственных растений в одном технологическом цикле. Получаемые БАД названы фитохитодезами (ФХД), представляющими собой молекулярные комплексы фракций хитозана с экстрагируемыми из лекарственного растительного сырья вещества [1].

Существенно, что благодаря применению на последней стадии получения ФХД лиофильной сушки, удалось повысить выход эфирных масел и, соответственно, увеличить эффективность действия целевой продукции. Высокомолекулярные фракции хитозана выполняют роль активного сорбента, способствуя детоксицирующему действию, связыванию жиров и уменьшению холестерина в организме человека. Олигомерные фракции обладают иммуностимулирующими свойствами [2]. Уместно отметить, что макромолекулы хитозана с ММ  $\leq 50$  кДа при переходе из желудка в кишечник, где рН среды становится равной 7,0 – 7,3, не выделяются в отдельную фазу, а остаются в виде коллоидного раствора, то есть, макромолекулы сохраняют свои наноразмеры, когда на несколько порядков усиливаются комплексообразующие свойства из-за огромной поверхности контакта. В этом направлении работает и тот факт, что в каждом звене макромолекул имеется множество активных центров, способных к донорно-акцепторному взаимодействию. Немаловажную роль играет и сама природа хитозана как катионного полиэлектролита. Наличие положительного заряда в каждом звене не позволяет молекуле из-за электростатического отталкивания образовывать глобулы и они остаются в стержне-подобном состоянии. Известно, что при одном и том же объеме стержни имеют большую поверхность, чем шары или сферы.

Специальные испытания на мышах с меченым тритием хитозаном достоверно показали проникновение олигомерных молекул хитозана в кровь и различные органы при пероральном применении [3]. Эти данные подтверждены фармакокинетикой глюкозамина – одного из основных компонентов американского препарата «Терафлекс». Различие имеется лишь в скорости процесса – у мышей это происходит в 60 – 80 раз быстрее. Совместное применение глюкозамина и его димера с цитостатиками в неэффективных дозах привело к повышению индекса ингибирования метастазов на примере карциномы легких 3-LL до 98 % [4]. Отметить, что анализ размеров капилляров кровеносных сосудов и полученных экспериментальных данных привели к заключению о быстром проникновении в кровь при пероральном применении именно глюкозамина и его димера.

Подобно отмеченному эффекту смеси олигомеров хитозана с цитостатиками, очевидно, возможно и в действии ФХД, преимущественно тех из них, которые по составу лекарственных фитосборов предназначены для лечения и профилактики онкозаболеваний. По существу действие ФХД может быть сравнимо с гибридными молекулами, объединяющими антиоксиданты с веществами целенаправленного действия, обладающими не только повышенной эффективностью, но и пониженной токсичностью [4]. Многолетнее применение в клинической практике показало, что ФХД, как и методы фитотерапии при умелом ее использовании, не дают осложнений, а наоборот, сами их устраняют при антибиотикотерапии, гормонотерапии, лучевой и химио-терапии.

В заключение отметим, что получаемые по современной технологии ФХД, обладая всеми достоинствами фитопрепаратов, имеют особые преимущества широкого применения в ближайшей перспективе. Способы получения хитодеза, фитохитодезов и способы лечения различных заболеваний защищены 11-ю патентами России и освещены в публикациях [1 - 6].

### **Литература:**

1. Б.А.Комаров, А.И.Албулов, К.А.Трескунов, Л.В.Погорельская, В.М.Червинец. Способ получения фитохитодезов. Патент РФ № 2204402 от 14.06.2001.
2. Б.А.Комаров. Применение водорастворимых форм хитозана для лечения и профилактики различных заболеваний. «Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты». Сборник научных трудов РАЕН. Вып. 13. М: РАЕН. 2005. С. 190.
3. Л.В.Погорельская, Б.А.Комаров, А.А.Костенко, А.И.Албулов. Средство для лечения инфекционных заболеваний. Патент РФ № 2273484 от 22.03.2004.
4. Б.А.Комаров, К.А.Трескунов, Л.В.Погорельская, М.Тохири, А.И.Албулов. Фитохитодез; развитие и перспективы. «Клиническая фитотерапия и фитохитодезотерапия, биологически активные пищевые добавки (БАД)». Материалы 7-ой Международной научной конференции. 23, 24 января 2009. С. 84 – 101.
5. Б.А.Комаров, А.И.Албулов, К.А.Трескунов, Л.В.Погорельская, В.М.Червинец и другие. Патенты РФ: № 2215749 от 14.06.2001; № 2165252 от 20.01.1998; № 2144040 от 07.04.1998; № 2174000 от 22.02.2000; № 2172634 от 18.08.1998; № 2150271 от 13.10.1998; № 2151501 от 09.11.1999; № 2153318 от 13.10.1999; № 249719 от 04.02.1985.
6. Б.А.Комаров, А.И.Албулов, К.А.Трескунов, Л.В.Погорельская, В.М.Червинец и другие. Материалы Международных конференций РХО (1999, 2001, 2003, 2006 и 2008) и в Черноголовке (1998, 1999, 2001, 2003, 2004, 2006 и 2009).



## MODERN STATE OF DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF BAA BASED ON CHITOSAN AND HERBS

*Komarov B.A., Treskunov K.A., Pogorel'skaya L.V., Albulov A.I., Chervinets V.M.*

Institute of Problems of Chemical Physics of RAS, Hospital of the Noginsk Scientific Center of RAS Chernogolovka, Russia  
GOU DPO "RMAPO", Moscow, Russia  
Research Institute VNITI BP RASKhN, Shchelkovo, Moscow Region, TMA, Tver, Russia  
e-mail: komarov@chngnet.ru

Since 1992 the method of BAA preparation from chitosan and herbs has currently been in the stage of development and improvement. We succeeded to combine the steps of the synthesis of chitosan of the polyfractional composition by the molecular mass (MM) and degree of deacetylation with the preparation of herbal extracts in one technological cycle. The BAA obtained were named phytochitodeses (PCD), being molecular complexes of chitosan fractions with substances extracted from the medical plant raw materials [1].

It is substantial that the yield of ethereal oils was increased and, correspondingly, the efficiency of the target product was enhanced due to the application of lyophilic drying at the last stage of PCD preparation. High-molecular-weight fractions of chitosan act as an active sorbent, facilitating the detoxication effect, fat binding, and decreasing cholesterol in the human organism. Oligomeric fractions possess immunostimulating properties [2]. It is noteworthy that chitosan molecules with  $\leq 50$  kDa are not isolated as an individual phase on going from the stomach to bowels, where pH of the medium becomes equal to 7.0–7.3, but they remain in the form of a colloidal solution, i.e., the macromolecules retain nanosizes, when the complexation properties are enhanced by several orders of magnitude because of the huge contact surface. The fact that each unit of the macromolecules contains numerous active sites capable of donor-acceptor interaction also "works" in the same direction. The nature of chitosan as a cationic polyelectrolyte also plays an important role. The positive charge in each unit does not allow molecules to form globules due to the electrostatic repulsion, and the molecules remain the rod-like state. It is known that at the same volume rods have a larger surface area than balls or spheres.

Special tests on mice with tritium-labeled chitosan showed reliably that oligomeric chitosane molecules penetrated in the blood and various organs upon peroral administration [3]. These data were confirmed by the pharmacokinetics of glucosamine, which is one of the main components of the American drug Teraflex. The only difference is the rate of the process: in mice this occurred by 60–80 times more rapidly. The combined application of glucosamine and its dimer with cytostatics in inefficient doses increased the index of metastasis inhibition for lung carcinoma 3-LL up to 98 % [4]. Note that an analysis of the sizes of capillaries of blood vessels and obtained experimental data suggested that glucosamine and its dimer rapidly penetrated in the blood upon peroral administration.

Similarly to the mentioned effect of a mixture of chitosan oligomers with cytostatics, the effect of PCD is induced, most likely, by those designed for the treatment and prophylactics of oncology by the composition of medical phytocompositions. In essence, the effect of PCD can be compared with hybrid molecules that combine antioxidants with substances of the target action possessing both the enhanced efficiency and decreased toxicity [4]. Their use in the clinical practice for many years showed that PCD, as well as the methods of phytotherapy, gave no complications if applied skillfully, but, on the contrary, they eliminate complications of antibiotherapy, hormonotherapy, radiation and chemotherapy.

It should be noted in conclusion that PCD prepared by the modern technology possess all advantages of phytodrugs and also special advantages for wide use in the nearest future. The procedures of preparation of chitodes and phytochitodeses and methods for the treatment of diverse diseases were licensed in 11 patents of the Russian Federation and described in many publications [1-6].

### References:

1. B.A. Komarov, A.I. Albulov, K.A. Treskunov, L.V. Pogorel'skaya, V.M. Chervinets. Method of Preparation of Phytochitodeses. Patent RF no. 2204402 of 14.06.2001.
2. B.A. Komarov. Application of Water-Soluble forms of Chitosan for Treatment and Prophylactics of Various Diseases. "Nontraditional Natural Resources, Innovation Technologies, and Products." Collection of Scientific Works of RANS. Issue 13. Moscow: RAEN. 2005. P. 190.
3. L.V. Pogorel'skaya, B.A. Komarov, A.A. Kostenko, A.I. Albulov. Remedy for Treatment of Infection Diseases. Patent RF no. 2273484 of 22.03.2004.
4. B.A. Komarov, K.A. Treskunov, L.V. Pogorel'skaya, M. Tokhiri, A.I. Albulov. Phytochitodeses: Development and Prospects. "Clinical Phytotherapy and Phytochitodesotherapy, Biologically Active Food Additives (BAA)." Proc. 7<sup>th</sup> Conf., January 23, 24, 2009. P. 84 – 101.
5. B.A. Komarov, A.I. Albulov, K.A. Treskunov, L.V. Pogorel'skaya, V.M. Chervinets, et al. Patents RF nos. 2215749 of 14.06.2001; 2165252 of 20.01.1998; 2144040 of 07.04.1998; 2174000 of 22.02.2000; 2172634 of 18.08.1998; 2150271 of 13.10.1998; 2151501 of 09.11.1999; 2153318 of 13.10.1999; 249719 of 04.02.1985.
6. B.A. Komarov, A.I. Albulov, K.A. Treskunov, L.V. Pogorel'skaya, V.M. Chervinets, et al. Proc. Materials of International Conferences of the Russian Chemical Society (1999, 2001, 2003, 2006, and 2008) and Conferences in Chernogolovka (1998, 1999, 2001, 2003, 2004, 2006, and 2009).

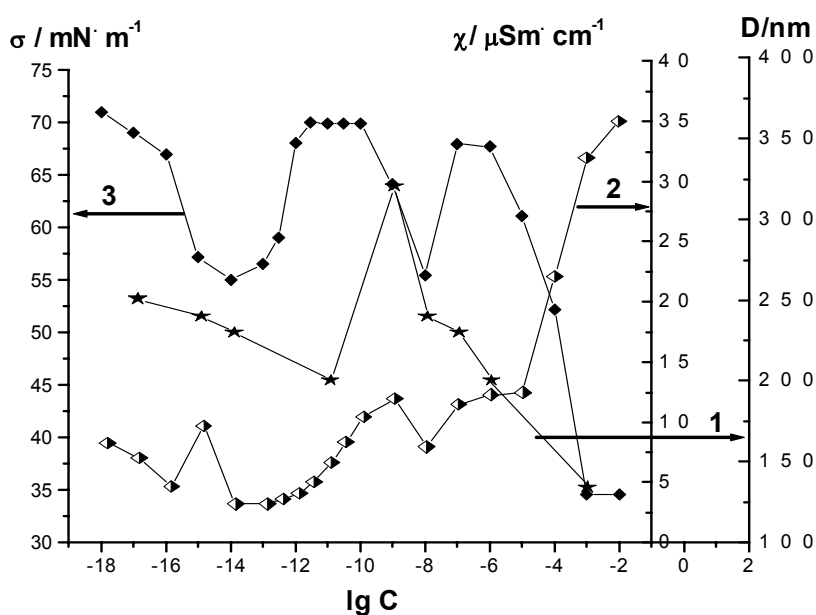


**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОБЛАСТИ НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ: СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, БИОЭФФЕКТЫ**

Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И.

Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: ryzhkina@iopc.knc.ru

Многие природные и синтетические биологически активные вещества (БАВ) проявляют биоэффекты в области низких ( $10^{-10} - 10^{-4}$  моль/л) и сверхнизких ( $10^{-20} - 10^{-11}$  моль/л) концентраций. Существующие в настоящее время гипотезы механизма действия биологически активных веществ в области низких концентраций не могут объяснить природы этого достаточно распространенного явления. Для объяснения накопившихся фактов высокой физиологической активности водных растворов БАВ необходимо раскрыть физико-химические закономерности, присущие разбавленным водным растворам, выяснить влияние низких и сверхнизких концентраций растворенных веществ на процессы структурообразования в водных системах, установить взаимосвязь структурообразования, свойств водных растворов и их биоэффектов [1]. Целью настоящей работы является исследование процесса образования наноассоциатов в воде, разбавленных растворах ряда биологически активных веществ, проявляющих биоэффекты в области низких и сверхнизких концентраций, изучение физико-химических свойств растворов этих веществ, установление взаимосвязи между физико-химическими параметрами, размерами, поверхностным зарядом (дзета-потенциалом) наноассоциатов и биоэффектами растворов низких и сверхнизких концентраций. В качестве таких соединений нами выбраны регуляторы роста растений [1], нейромедиатор, антиоксиданты (см. рис.), транквилизатор, амфифильные соединения, аминокислоты и нуклеотидные основания.



Исследование комплексом физико-химических методов (динамическое светорассеяние, кондуктометрия, тензометрия, рН-метрия) концентрационных зависимостей размеров ассоциатов и свойств водных растворов в области низких и сверхнизких концентраций позволило показать, что в растворах изученных веществ образуются наноассоциаты, которые с изменением концентрации вещества претерпевают перестройку, что отражается на размерах (D) и дзета-потенциале наноассоциатов, а также на физико-химических параметрах растворов, таких как электропроводность ( $\chi$ ), поверхностное натяжение ( $\sigma$ ), рН (см. рис.). Анализ концентрационных зависимостей размеров наноассоциатов, физико-химических параметров и биоэффектов растворов биологически активных веществ, для которых ранее выявлена биологическая активность в области низких и сверхнизких концентраций, позволил установить определяющее влияние наноассоциатов на биологическую активность растворов изученных веществ.

**Литература:**

1. Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2008. № 6. С. 1207-1214.

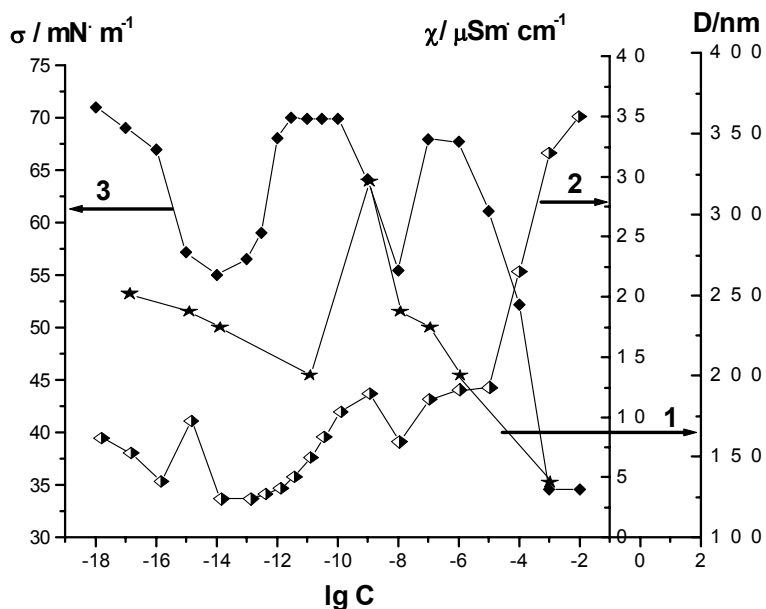


THE NEW APPROACH TO THE INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES IN LOW AND ULTRA-LOW CONCENTRATION: STRUCTURE FORMATION, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND BIOEFFECTS

Konovalov Alexander I., Ryzhkina Irina S., Murtazina Leasan I.

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry KazRC RAS, Kazan, Russia  
e-mail: ryzhkina@iopc.knc.ru

A number of biological active substances exhibit bioeffect in low ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$  M) and ultra-low ( $10^{-20}$  –  $10^{-11}$  M) concentration. The existing hypotheses for the mechanism of action of the superlow doses cannot completely explain the nature of this widespread phenomenon. The new approaches for solving the problems of mechanism of action of high dilute water solution of biological active are considered. Physicochemical properties of aqueous solutions of number of biological active compounds, for example, regulator of plant growth the melamine salt of bis(hydroxymethyl)phosphinic acid dehydrate [1], bioantioxidants (see figure), neurotransmitters, some amino acids and surfactants were studied by the dynamic light scattering, conductometry, tensometry, pH-metry methods. It was shown that the formation of supramolecular nanoassociates (50-300 nm) occurs in the solutions of these compounds. Nanoassociates reconstruct and change their sizes (D) and zeta potential with the decrease of concentration of compounds ( $10^{-2}$ - $10^{-20}$  M). These changes connect with changes of physicochemical properties of aqueous solutions, for example, conduction ( $\chi$ ), surface tension ( $\sigma$ ), pH (see figure). Nanoassociates exert basic influence on biological activity of solutions with ultra-low concentration of compounds.



References:

1. A.I.Konovalov, I.S.Ryzhkina et al. *Russ.Chem. Bull.*, Int.Ed., 2008, **57**, no.6, p.1-8.





### **ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЛИПРОЛИНОВ ПРИ СТРЕССЕ**

*Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Самонина Г.Е., Эдеева С.Е., Бондаренко Н.С., Гусева А.А.*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
e-mail: bellaum@mail.ru

В последнее время нами ведется активное исследование семейства коротких пролинсодержащих пептидов – глипролинов (ГП), которые представляют собой фрагменты коллагена, состоящие из аминокислот глицина и пролина, и обладают широким спектром физиологической активности. Наиболее изученные представители этого семейства - пептиды PGP, GP и PG. В сообщении представлены результаты изучения возможности профилактики и коррекции некоторых пострессорных патологий. Работа выполнена на беспородных крысах самцах весом 200-250 г. Использовали разные виды стрессорного воздействия: иммобилизацию животных (1, 3 часа), неизбежное плавание, воспаление, вызванное внутрибрюшинным введением тиюглолата, а также введение холецистокенина-4 для имитации психо-эмоционального стресса.

Анализировали состояние слизистой оболочки желудка (СОЖ), секреторную активность тучных клеток (ТК) брыжейки, состояние микроциркуляторного русла брыжейки и поведенческую активность животных. Стресс вызывал появление эрозий и язв СОЖ, нарушение работы лимфатических и кровеносных сосудов брыжейки, массивную дегрануляцию ТК, нарушения поведения, выражавшиеся в повышении тревожности, депрессии и снижении уровня ориентировочно-исследовательской активности. При разных способах предварительного введения (перорально, внутрибрюшинно, интраназально) PGP и GP в дозах 3,7 и 37 мкМ/кг значительно ослабляли эти нарушения. Пептид PG был менее эффективен. Механизм защитного действия пептидов до конца не ясен. По-видимому, его реализация может осуществляться как на центральном, так и на периферическом уровне. Действие пептидов на структуры ЦНС может обеспечивать формирование более адекватного ответа на стрессорное воздействие. Влияния на ткани периферических органов, может способствовать повышению их устойчивости к действию медиаторов стресса. Есть основания полагать, что одним из важных моментов в реализации защитного эффекта пептидов является их стабилизирующее действие на тучные клетки, уменьшающее выброс физиологически активных соединений, в частности провоспалительного медиатора гистамина. Важно отметить, что введение ГП интактным животным не вызывает каких-либо изменений анализируемых показателей.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ. Грант № 09-04-00669-а.*



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### CENTRAL AND PERIPHERAL MECHANISMS OF GLYPROLINES PROTECTIVE EFFECTS UNDER STRESS

*Kopylova G.N., Umarova B.A., Samonina G.E., Bondarenko N.S., Guseva A.A.*

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
e-mail: bellaum@mail.ru

Recently we have extensively investigated the family of short peptides named glyprolines. They represent collagen fragments and consist of amino acids glycine and proline. These peptides have a wide spectrum of biological activities. The most investigated members of this family are proliil-glycil-proline (PGP), glycil-proline (GP) and proliil-glycine (PG). In this report we present our data about the possibility of some stress-induced pathologies prophylaxis and its correction. Experiments were performed on male outbred albino rats weighing 200-250 g. We used different models of stress: immobilization (1, 3 hours), inescapable swimming, thioglycolate-induced inflammation (i.p.) and intraperitoneal injection of cholecystokinin-4 (psychoemotional stress imitation).

We analyzed animals' behavior, mesenteric mast cells secretory activity, the state of stomach mucous coat and mesenteric microcirculatory bed. It was shown, that stress induced the appearance of erosions and ulcers in the stomach mucous coat, disorders of mesenteric lymphatic and blood vessels activity, the high-grade mast cells degranulation and behavioral disorders, such as increase of anxiety level, depression and decrease of orientative-trying reaction level. Preliminary injection of PGP and GP (per os, i.p., intranasal; 3,7 & 37 mkM/kg) decreased these disorders significantly. PG was less effective. The mechanism of these peptides protective action is not clear. It is possible that glyprolines can act as at central as at peripheral level. And this action on CNS structures may provide more adequate reaction to the stress. Moreover, the influence on peripheral organs tissues can promote the increase of their resistance to the stress mediators' action. We can suppose that stabilizing action of these peptides on mast cells may be one of the main mechanisms connected with their protective effect. Such action can decrease the secretion of mediators (especially histamine) by mast cells. At last, it is important to notice that the glyprolines injection into intact animals doesn't induce any changes of analyzed indexes.



## ВИКОРИСТАННЯ ПЕКТИНОВИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ СВИНЦЕМ В УМОВАХ ВИРОБНИЦТВА

*Короленко Т.К.*

ДУ „Інститут медицини праці АМН України”, Київ, Україна  
e-mail: dmytrukha@ukr.net

В комплексній системі профілактичних заходів, спрямованих на попередження шкідливого впливу важких металів на організм людини, важливе значення належить широкому профілактичному використанню пектина і препаратів на його основі.

Нами були обстежені працюючі одного з великих підприємств по виробництву свинцевих акумуляторів, а в подальшому проведений курс пектинопрофілактики пектин-вітамінним препаратом (ПВП). Одноразова доза ПВП складала для працюючих по 1,0 г пектина, 3-4 р. на день до їжі протягом 4-х тижнів.

При обстеженні робітників до початку курсу прийому були встановлені окремі зрушення і зміни у осіб основної групи в порівнянні з контрольною, які свідчили про професійну експозицію свинцем (вміст свинцю у сечі робітників становив в середньому 0,07 мг/л, в сироватці крові кількість загальних SH груп 31,4 мкМ/100 мл, активність церулоплазміна 221 мг/л, активність фруктозо-1,6-дифосфатальдолази 0,216 мМ/л час, активність АСТ — 0,167/мкМ час, кількість d -амінолевулінової кислоти в сечі 2,91 мг/г креатинину, активність лужної фосфатази 2,98 мМ/час, спостерігалось достовірне підвищення рівня гемоглобіна, кількості сегментоядерних нейтрофілів, збільшення частоти дегенеративних форм еритроцитів - еритроцитів з базофільною зернистістю).

В результаті прийому ПВП у працюючих при порівнянні з даними до прийому мало місце підвищення в сироватці крові кількості загальних SH груп (на 35%), церулоплазміну (на 25%), активності фруктозо-1,6 — дифосфатальдолази (на 66%), зниження коефіцієнта де Рітиса (на 30%), активності лужної фосфатази (на 24%), в сечі — зниження рівня виділення свинцю (на 33%), що свідчить про поліпшення процесів обміну речовин, функції серцево-судинної системи і печінки.

Після закінчення пектинопрофілактики у обстежених робітників нормалізувався морфологічний склад периферичної крові та знизився вміст еритроцитів з базофільною зернистістю на 76% в порівнянні з початковим рівнем.

Таким чином, на основі отриманих результатів досліджень, підтверджуються раніше отримані дані про захисну дію пектину при дії свинцю та його сполук. Можна дійти висновку, що в комплексі профілактичних міроприємств при контакті з цим металом рекомендовано використання ентеросорбента ПВП. Використання цього препарату сприяє елімінації токсичного металу із організму, а також відновленню зміни в морфологічному складі крові, біохімічних процесах, пов'язаних з активністю функціональних (реактивних) груп тканинних білків. Використання пектину доцільно, перш за все, при виявленні в процесі періодичних медичних оглядів працюючих зі свинцем ранніх (початкових) функціональних зрушень.

Рекомендовано періодичне проведення курсів пектинопрофілактики з метою зменшення надходження свинцю в організм і стимуляцію його елімінації з депо при умові контролю, який передбачає визначення вмісту металу в індикаторних біосередовищах, а також по можливості з використанням адекватних показників (тестів), в тому числі гематологічних і біохімічних.



## USE OF PECTIN PREPARATIONS IN CHRONIC LEAD INTOXICATIONS IN INDUSTRIAL CONDITIONS

*Korolenko T.K.*

SI "Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: dmytrukha@ukr.net

In the combination of measures, directed at prevention of the harmful effect of heavy metals on the human body, a particular attention is paid to a wide prophylactic use of pectin and pectin-based preparations.

We have examined workers of one of the largest enterprises, engaged in production of lead accumulators, followed by a course of preventive therapy with pectin-vitamin preparation (PVP). A single dose of PVP made for workers 1,0 g pectin, 3-4 times a day, before taking food, within 4 weeks.

After examination of workers, before undertaking a preventive course, there were found some disorders and changes in persons of the main group, as compared with the control group, pointing to the occupational exposure to lead (content of lead in urine of workers made 0,07 mg/l on the average; in blood serum the number of general SH groups made 31,4 mkM/100 ml, ceruloplasmin activity - 221 mg/l, activity of fructoso-1,6-diphosphatealdolase 0,216 mM/l an hour, ACT activity - 0,167/mkM an hour, the content of delta-aminolevulinic acid in urine 2,91 mg/g of creatinin, activity of alkaline phosphatase 2,98 mM/l an hour; a significant increase of hemoglobin level, number of segment-nuclear neutrophiles, increase of the rate of degenerative types of erythrocytes with basophile granulosity have been recorded).

As a result of taking PVP, the increase of the number of general SH groups in blood serum (by 35%), ceruloplasmin (by 25%), activity of fructose -1,6- diphosphate aldolase (by 66%), decrease of the Pirica coefficient (by 30%), activity of alkaline phosphatase (by 24%), in urine - decrease of the level of lead excretion (by 33%) have been found, pointing to improvement of processes of the metabolism of substances, cardio-vascular system and liver.

After finishing the prophylactic course with pectin the morphological content of the peripheric blood reached normal values in the examined workers and the decrease of the content of erythrocytes with basophile granulosity decreased by 76% as compared with initial levels.

So, on the basis on the obtained results the earlier available data on the defensive effect of pectin under exposures to lead and to its combinations can be confirmed. A conclusion can be made that the use of enterosorbent PBP can be recommended as a combined prophylactic measure in cases of contacts with lead. The use of this preparation can promote elimination of the toxic metal from the body and renew changes in the morphological content of blood, in biochemical processes, related to the activity of the functional (reactive) groups of tissue proteins. The use of pectin is reasonable, first of all, for detection of earlier (initial) functional changes in the human body in the process of periodic medical examinations of workers, exposed to lead.

It is recommended to periodically take courses on prophylactics with pectin, in order to decrease the content of lead in the body, and to promote its elimination from the depot on conditions of the control, providing the determination of lead content in indicative biomedica and, if possible, to use adequate indices (tests), including hematological and biochemical ones.



**ВИВЧЕННЯ ВМІСТУ ІНТЕРФЕРОНУ- $\gamma$  У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ НА ФОНІ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ «СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ» ТА «АПІБАКТ®»**

Короткий О.Г., Берегова Т.В., Компанець І.В., Карповець Т.П., Кравченко О.О., Остапченко Л.І.

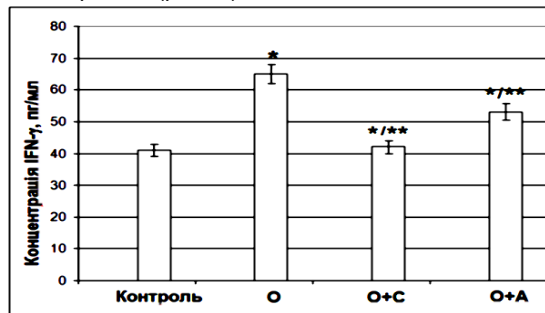
<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра біохімії  
пр. Академіка Глушкова, 2, г. Київ, 03022, Україна  
e-mail: biochem@biocc.univ.kiev.ua

Актуальним питанням сьогодення є розробка нових ефективних засобів для лікування гіпергастринемії – захворювання шлунково-кишкового тракту, пов'язаного з підвищеною секрецією гастрину G-клітинами антрального відділу шлунка. Розвиток гіпергастринемії може призводити до виникнення раку шлунка внаслідок атрофії та метаболічних змін клітин його слизової оболонки. Встановлено, що інгібітори  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФази (мембранного ферменту парієтальних клітин шлунку) пригнічують секрецію соляної кислоти, що провокує стан гіпергастринемії, а також викликає дисбаланс у шлунковій мікрофлорі й порушує функціонування імунної системи. Тому є необхідною корекція ендогенної мікрофлори, зокрема з метою профілактики онкологічних захворювань шлунково-кишкового тракту. Особливий інтерес викликають мультипробіотики: «Симбітер® ацидофільний» (є живою біомасою симбіозу 14 штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій, в 10 мл якого міститься не менше  $10^9$  живих клітин) та «Апібакт®» (крім біомаси симбіозу вищезазначених для «Симбітера® ацидофільного» мікроорганізмів містить у своєму складі 2,5% екстракт прополіса).

Одним з основних медіаторів клітинної імунної відповіді та запалення є інтерферон- $\gamma$  - багатфункціональний цитокін з потужною протипухлинною, імуномодуючою та прозапальною активністю. Виявлено, що існує кореляція між рівнем гастрину у крові та секрецією інтерферону Th1-лімфоцитами: гастрин посилює експресію генів інтерферону- $\gamma$  під час гіпергастринемії. Отже, метою представленої роботи було вивчення рівню інтерферону- $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ) у сироватці крові щурів при гіпергастринемії, викликаній введенням блокатору іонної помпи – омепразолу, а також дослідження впливу на цей показник мультипробіотиків «Симбітер® ацидофільний» і «Апібакт®»

Гіпоацидний стан у щурів викликали 28 денним внутрішньочеревинним введенням препарату «Омез®» (O), діючою речовиною якого є омепразол. Одночасно із введенням омепразолу тваринам вводили «Симбітер® ацидофільний» (C) та «Апібакт®» (A). Забій тварин здійснювали на 29 добу після введення препаратів. Вміст ІФН- $\gamma$  в сироватці крові щурів визначали методом імуноферментного аналізу.

Показано, що після 28 денного введення шурам омепразолу концентрація ІФН- $\gamma$  в сироватці крові зростала на 58,5% порівняно з контролем (рис. 1).



**Рис.1.** Вміст ІФН- $\gamma$  в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності при введенні мультипробіотиків «Симбітер® ацидофільний» і «Апібакт®», пг/мл (n=7)

\* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  порівняно з групою тварин, яким вводили «Омез®»

Одночасне введення O та C нормалізувало рівень ІФН- $\gamma$ : він знижувався на 35,4% порівняно з групою тварин, яким вводили тільки O, і наближався до значень контролю. Введення O сумісно з A хоча і зменшувало концентрацію ІФН- $\gamma$  на 18,5% порівняно з групою тварин, яка отримувала тільки O, але вона контролю залишалася збільшеною на 29,3% відносно контролю.

Отже, під час гіпергастринемії у щурів стимулюється синтез інтерферону- $\gamma$  лімфоїдними клітинами, що є проявом клітинно-опосередкованої імунної відповіді та розвитку запальної реакції в організмі. Причиною такої стимуляції може бути зниження шлункової секреції при дії омепразолу, що супроводжується заселенням умовно-патогенної мікрофлори в шлунку та кишечника. Мультипробіотики «Симбітер® ацидофільний» і «Апібакт®» спричиняють протизапальну дію через нормалізацію мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту, в результаті чого знижується секреція ІФН- $\gamma$  Th1-лімфоцитами і, відповідно, зменшується до норми його рівень у сироватці крові.

Таким чином, інтерферон є залученим до процесів розвитку гіпергастринемії на фоні гіпоацидності у щурів. Його можна вважати біохімічним маркером запального процесу, що має місце при даній патології. Вивчення ролі цього цитокіну є важливим для з'ясування механізмів розвитку пухлин шлунково-кишкового тракту та розробки нових ефективних засобів корекції його стану.



**THE INVESTIGATION OF INTERFERON- $\gamma$  LEVEL IN RAT PLASMA UPON HYPERGASTRINEMIA AGAINST A BACKGROUND OF MULTIPROBIOTICS "SYMBYTER® ACIDOPHILIC" AND "APYBACT®" ADMINISTRATION**

*Korotkiy O.G., Beregova T.V., Kompanets I.V., Karpovets T.P., Kravchenko O.O., Ostapchenko L.I.*

Taras Shevchenko Kiyv National University, Biochemistry Department  
Academician Glushkov str., 2, Kyiv, 03022, Ukraine  
E-mail: biochem@biocc.univ.kiev.ua

The development of new effective preparations for treatment of hypergastrynemia is very actual today. This disease is accompanied with gastrin enhanced secretion by G-cells of stomach antrum. The development of hypergastrynemia can cause the stomach cancer a result of atrophy and metaplasia of mucous cells. It was shown that inhibitors of  $H^+,K^+$ -ATPase (parietal cells membrane enzyme) suppress the hydrochloric acid secretion. It provokes hypergastrynemia and also causes a misbalance in a gastric microflora and breaks immune system functioning. Therefore a correction of endogenous microflora is necessary, in particular for the purpose of prophylaxis of oncological diseases of gastrointestinal tract. The special interest is caused by multiprobiotics. «Simbiter® acidophilic» is a living biomass of 14 symbiotic bifidobacteria, lactobacilli, lactococci and propionic bacteria cultures (10 ml contains not less than  $10^9$  living cells). «Apibakt®» contains 2,5% propolis extract except for biomass of «Simbiter® acidophilic» microorganisms.

Interferon is one of the main mediators of immune response and inflammation. It is a multifunction cytokine with potent antiproliferative, immunomodulatory and proinflammatory activities. The correlation between serum gastrin level and interferon secretion by Th1-lymphocytes was detected. Gastrin stimulates the expression of interferon genes at hypergastrynemia. So, the aim of this work was the investigation of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) level in rat serum at hypergastrynemia, caused by omeprazol (ionic pump inhibitor) administration. It was also planned to investigate the influence of multiprobiotics «Simbiter® acidophilic» and «Apibakt®» on this parameter.

The hypoacidity was caused by 28 daily intraperitoneal injection of «Omez®» preparation (O), which consists of omeprazol. The «Simbiter® acidophilic» (S) and «Apibakt®» (A) preparations were administered simultaneously with omeprazol. Animals were decapitated on 29 day after introduction of preparations. The IFN- $\gamma$  level in rat serum was determined by immune-enzyme assay.

The concentration of serum IFN- $\gamma$  was shown to increase on 58,5% by comparison with control after 28 day omeprazol injection (fig. 1).

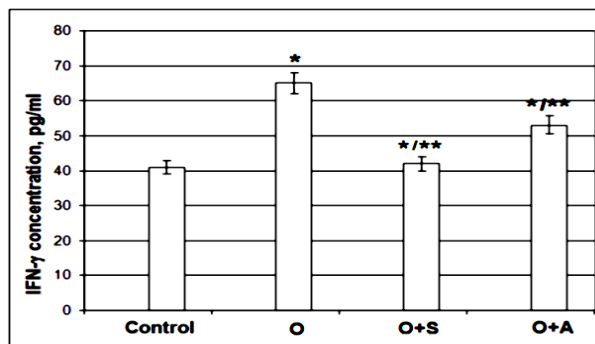


Fig. 1. The concentration of IFN- $\gamma$  in rat blood serum at long-term hypoacidity, caused by «Omez®» (O) injection, against a background of multiprobiotics «Simbiter® acidophilic» (S) and «Apibakt®» (A) administration

\* -  $P < 0,05$  in comparison to control, \*\* -  $P < 0,05$  in comparison to group of animals which received O

Simultaneous O and S introduction normalized the IFN- $\gamma$  level. It decreased on 35,4% in comparison to the group of animals, which received O only, and verged towards control. Although the combined O and A administration declined the IFN- $\gamma$  level on 18,5% in comparison to the group of animals, which received O only, it remained augmented on 29,3% in relation to control.

Thus, the interferon synthesis is stimulated during hypergastrynemia caused by hypoacidity in rats. Probably, it's a result of cellular immune response manifestation and inflammation development. It may occur owing to acid secretion decrease under the action of omeprazol, that is accompanied opportunistic microflora colonization. Multiprobiotics «Simbiter® acidophilic» and «Apibakt®» cause anti-inflammatory action through tract microbiocenosis normalization. Consequently, the IFN- $\gamma$  secretion by Th1-lymphocytes declines and it's serum level accordingly decreases to normal.

Thereby interferon is implicated into hypergastrynemia development against a background of hypoacidity in rats. It may be considered as biochemical marker of inflammatory process at this pathology. A study of this cytokine role in hypergastrynemia is important for clarifying the mechanisms of gastrointestinal tumor development and design of new effective preparations adjusting it's functioning.



## СИСТЕМЫ АТФ-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА КАТИОНОВ В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ И КАЛИКСАРЕНЫ

Костерин С.А.

Институт биохимии им.А.В.Палладина Национальной Академии Наук Украины, Киев, Украина  
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

Каликсарены обладают способностью формировать супрамолекулярные комплексы с биологически значимыми молекулами и ионами, они могут оказывать влияние на протекание биохимических процессов и, соответственно, рассматриваться в качестве перспективных молекулярных платформ для создания физиологически-активных веществ. В наших исследованиях мы изучили влияние каликс[4]аренов на активность  $Mg^{2+}$ , АТФ-зависимых кальциевого и натриевого насосов миомерия и на неэнзиматический гидролиз АТФ. Это исследование было проведено в творческом содружестве с член.-кор. НАНУ проф. В.Кальченко и его коллегами (Институт органической химии НАН Украины). В наших экспериментах мы использовали различные биохимические модели (фракции мембранных субклеточных структур, солюбилизованную и реконструированную в липосомы высокоочищенную  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазу плазматической мембраны, суспензию миоцитов, обработанных раствором дигитонина).

Каликс[4]арен **С-91** (5,17-ди[2(4-фторофенил)окси]ацетиамидо-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигидрокси-25,27-дипропокси-каликс[4]арен) (100 мкМ), внесённый в среду инкубации, стимулирует аккумуляцию ионов Са в изолированных митохондриях миомерия, но практически не влияет на активность кальциевых насосов, локализованных в плазматической мембране и саркоплазматическом ретикулуме миомерияльных клеток.

В экспериментах, проведенных с использованием суспензии плазматических мембран клеток миомерия, обработанной раствором дигитонина (0,1 %), было исследовано влияние каликс[4]аренов **С-97** (5-ди-фосфонометилден-26,28-дигидрокси-25,27-дипропоксикаликс[4]арен) и **С-107** (5,17-ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигидрокси-25,27-дипро-поксикаликс[4]арен) на эффект оубаина на  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазную активность. В случае влияния каликсаренов на указанную активность величина кажущейся константы ингибирования  $I_{0.5}$  составляла < 100 нМ, в то время как для оубаина - 15–25 мкМ. Для ингибирующего действия всех эффекторов свойственно явление отрицательной кооперативности: величина коэффициента Хилла  $n_H = 0.3-0.5 < 1$ . Каликсарен **С-97** (10 нМ) не только подавлял  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазную активность относительно контроля, но также индуцировал возрастание сродства фермента к сердечному гликозиду: величина  $I_{0.5}$  составляла  $21.0 \pm 5.2$  и  $5.3 \pm 0.7$  мкМ соответственно.

Установлено, что каликсарен **С-107** может гидролизовать АТФ. Кинетическая кривая гидролиза имела негиперболический вид и характеризовалась выходом на плато (во времени), которое наблюдалось на 45<sup>ми</sup>-60<sup>ми</sup> мин. инкубации, когда реакция практически завершалась. Были рассчитаны эмпирические кинетические параметры реакции. Скорость каликсарен-зависимого гидролиза АТФ превышала скорость спонтанного гидролиза этого нуклеозидтрифосфата в 14 – 15 раз. С использованием метода ОФВЭЖХ для реакции взаимодействия между каликсареном **С-107** и АТФ было продемонстрировано комплексобразование в системе «Гость-Хозяин», характеризующееся константой диссоциации  $K_d = 197 - 231$  мкМ и стехиометрией 1:1. Обсуждается роль электростатических, ион-дипольных, диполь-дипольных и других слабых взаимодействий в стабилизации комплекса «каликсарен **С-107** - АТФ». Была продемонстрирована зависимость кинетических характеристик реакции гидролиза АТФ от концентрации реагентов: оказалось, что максимальное количество освобождённого  $F_n$  не зависит от концентрации АТФ и линейно возрастает с ростом концентрации каликсарена, в то время как возрастание концентрации АТФ и каликсарена приводит к возрастанию максимальной скорости гидролиза АТФ и уменьшению характеристического времени её протекания. Одновалентные катионы ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ , холин<sup>+</sup>) и двухвалентные катионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  не влияли на протекание АТФ-гидролазной реакции; в присутствии других двухвалентных катионов наблюдалось её ингибирование, эффективность которого убывала в последовательности:  $Cu^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$ . Защелачивание среды инкубации в диапазоне рН 6,0 – 8,0 стимулировало гидролиз АТФ. Величина энергии активации АТФ-гидролазной реакции  $E_a$  составляла  $50,7 \pm 8,9$  кДж/моль. Не наблюдалась выраженная субстратная специфичность относительно гидролиза нуклеозидтри- или дифосфатов.

Т.о. наши биохимические модели вполне приемлемы для скрининга действия каликсаренов на активность катион-транспортирующих систем гладких мышц. Мы полагаем, что полученные результаты могут быть полезны для последующего исследования кинетики, энергетики и механизма реакций как энзиматического, так и неэнзиматического гидролиза АТФ, а также для создания синтетических АТФ-гидролизующих систем.

Я хотел бы выказать мою признательность к.б.н.Л.Бабич, к.б.н.С.Шлыкову, к.б.н.Т.Веклич, асп.А.Шкрабаку (Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины) и проф. В.Кальченко, к.х.н.О.Кальченко, к.х.н.Р.Родику, к.х.н.В.Бойко (Институт органической химии Национальной Академии Наук Украины, Киев), принявшим активное участие в наших исследованиях.

Эта работа была поддержана грантами (№№ Ф7/426-2001 и 5А/4Б-2005) Государственного Фонда Фундаментальных Исследований Украины.



## ATP-DEPENDENT CATIONS TRANSPORTING SYSTEMS IN THE SMOOTH MUSCLES AND CALIXARENES

*Kosterin S.O.*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

Calixarenes, owing to the ability to form supramolecular complexes with biologically important molecules and ions, can influence a course of biochemical processes and, accordingly, be considered as perspective molecular "platforms" for creation of physiologically active compounds. In our investigations we examined the effect of calix[4]arenes on the activity of the  $Mg^{2+}$ ,ATP-dependent calcium and sodium pumps of myometrium and on the nonenzymatic ATP hydrolysis. This investigation is being carried out in cooperation with professor V.Kalchenko and his colleagues (Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv). In our experiments, we used different biochemical models (namely, fractions of the membrane subcellular structures, solubilized and reconstituted in the lysosomes highly purified  $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane, and suspension of digitonin-treated smooth muscle cells).

It has been shown, that calyx[4]arene **C-91** (5,17-di[2(4-fluorophenyl)oxi]acetamido-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) (100  $\mu$ M) addition to incubation medium led to an increase in  $Ca^{2+}$  accumulation level in isolated mitochondria of the myometrium, but practically does not influence calcium pumps activity of the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum of myometrial cells.

In the experiments carried out with the suspension of the myometrium cell plasma membranes treated with 0.1% digitonin solution we investigated influence of the calix[4]arenes **C-97** (5-Bis(dihydroxyphosphoryl)methyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) and **C-107** (5,17-di([2-pyridyl]dihydroxyphosphoryl)methylamino-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) on ouabain effect on the  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase activity. In the case of the action of the calixarenes on the  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase activity the value of the apparent inhibition constant  $I_{0.5}$  was < 100 nM while for ouabain it was 15–25  $\mu$ M. The negative cooperative effect was typical of the inhibitory action of calixarenes, as well as ouabain: the value of Hill's factor  $n_H = 0.3-0.5 < 1$ . Calixarene **C-97** (10 nM) not only led to inhibition of the  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase activity relative to control, but also simultaneously increased the affinity of the enzyme for the cardiac glycoside: the magnitudes of the apparent constant of inhibition  $I_{0.5}$  were  $21.0 \pm 5.2$  and  $5.3 \pm 0.7$   $\mu$ M, respectively.

It was shown that calix[4]arene **C-107** can hydrolyze ATP. The kinetic curve of the ATP hydrolysis induced by calixarene **C-107** was nonhyperbolic and had a tendency to plateau (in the course of time) observing from 45-60 minutes of the incubation period when the reaction practically came to the end. The empirical kinetic characteristics of this reaction were calculated. The velocity of calixarene- dependent hydrolysis of ATP exceeds the velocity of spontaneous hydrolysis of ATP at least 14–15 times. The "Host-Guest" complexation of the calixarene **C-107** with adenosinetriphosphate in acetonitrile/water (47/53 v/v) solution was investigated by the reversed-phase high performance liquid chromatography, the dissociation constants of the 1:1 "Host-Guest" complexes of ATP-"Guest" with the calixarene-"Host" when using two columns Zorbax CN and LiChrosorb RP 18 within 197–231  $\mu$ M were determined from the capacity factor of the "Guest" and concentration of the calixarene-"Host" in the mobile phase. The electrostatic, ion-dipole, dipole-dipole and other weak interactions in the "Host-Guest" complexes were discussed. It has been shown the dependences of the kinetic characteristics of the ATP hydrolysis from reagent concentration: the maximal value released  $P_i$  did not depend on ATP concentration and linearly increased with the growth of calixarene concentration. Besides the growth concentration of ATP or calixarene increased the maximum instantaneous velocity of the reaction and decreased characteristic time. It was identified that univalent cations ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ , choline $^+$ ) and bivalent cations  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  did not influence the reaction of ATP hydrolysis; in the presence of other bivalent cation the inhibition of the reaction occurred in line with the sequence:  $Cu^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$ . The alkalization in the range of pH 6.0 – 8.0 stimulated the ATP hydrolysis. The magnitude of activation energy of the reaction was  $50.7 \pm 8.9$  kJ/mole. The specificity for nucleoside tri- and di-phosphates was not observed.

So, our biochemical models are suitable experimental objects for screening the mechanisms of calixarenes action on the active cations transporting systems in the smooth muscle cells. We believe that obtained data can be useful for subsequent investigation of kinetics, energetics and mechanism of both enzymatic and nonenzymatic ATP hydrolysis reaction and also for designing the synthetic ATP hydrolyzing catalysts.

I would like to express my gratitude to Dr.L.Babich, Dr.S.Shlykov, Dr.T.Veklich, J.Shkrabak (Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv) and prof. V.Kalchenko, Dr.O.Kalchenko, Dr.R.Rodik, Dr.V.Boyko (Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv), who have taken an active part in our investigations.

*This work was supported by grants (№№ 07/426-2001 and 5A/45-2005) from the Fundamental Researches State Fund of Ukraine.*





## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНОВИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ РТУТНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

Козлов К.П.

ДУ «Інститут медицини праці АМНУ», Київ, Україна

Значну групу токсикантів серед хімічних забруднювачів утворюють метали та їхні сполуки, серед яких одне з чільних місць посідають ртуть та її сполуки. Наявність ртуті в організмі на рівнях, що перевищують фонові, найчастіше співпадає з порушенням нормальних процесів метаболізму. Саме у таких випадках речовинам природного походження і препаратам приділяється увага, оскільки їх застосування дає змогу позбутися ряду істотних недоліків синтетичних протекторів, зокрема. Вельми важливим є той факт, що біологічно активні компоненти рослинного походження, ближчі людському організму за своєю природою, легко включаються в процеси життєдіяльності і є біодоступнішими.

Експеримент було проведено на щурах-самцях, які утримувались на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води з інтраперитонеальним введенням водного розчину хлориду ртуті (II) у дозі  $1/150$  ЛД<sub>50</sub> (0,2 мг/кг) терміном 70 діб (50 введень по п'ять введень речовини протягом тижня). Всього було 5 груп тварин: контрольна, група, яка одержувала розчин HgCl<sub>2</sub> та три групи які разом з HgCl<sub>2</sub> одержували з їжею три різні пектини – буряковий (БП), яблучний (ЯП) і пектин-вітамінне драже (ПВД).

При введенні хлориду ртуті (II) в тканині печінки контрольних щурів залежно від віку тварин простежується невелике зниження вмісту загальних і небілкових SH-груп. В тканині нирок було виявлено найвище значення у тварин середнього віку порівняно з контрольними тваринами як старого, так і молодого віку. При введенні хлориду ртуті (II) тваринам у старших щурів вміст загальних SH-груп у нирках залишався на рівні контрольних значень, у середнього віку – спостерігалася тенденція до зниження, а у молодих – до збільшення даного показника. Кількість небілкових SH-груп знижувалася у старших тварин, була достовірно знижена у середнього віку, і підвищена у молодих. Аналогічні зміни, але менші, були отримані і при додаванні в корм тварин БП. При дії ЯП і ПВД у старших тварин було виявлено зниження вмісту загальних SH-груп і збільшення небілкових, у щурів середнього віку – вміст загальних SH-груп залишався в межах контрольних величин, а небілкових знижувалося, у молодих – незначне збільшення рівня загальних сульфгідрильних груп супроводжувалося незначним зростанням вмісту і небілкових SH-сполук.

Концентрація ртуті поступово зростала в крові молодих щурів, при цьому найбільша кількість ртуті зареєстрована у крові молодих щурів (0,093±0,022 мг/л), а найменша – у старших (0,037±0,015 мг/л). Спостерігалось також достовірне зниження рівня ртуті у крові молодих і старших щурів, котрі одержували всі три види пектинів порівняно з дослідною групою, що одержувала тільки ртуть та тенденція до зниження – у крові щурів середнього віку. Цікаво, що саме у крові тварин середньої вікової групи при призначенні пектинів було виявлено найменшу кількість ртуті (на рівні 0,007-0,008 мг/л залежно від виду пектину), тоді як у молодих і старших ця кількість була приблизно однаковою.

Також було виявлене достовірне накопичення ртуті у печінці тварин всіх досліджуваних груп, причому у молодих щурів кількість ртуті в печінці (0,258±0,048 мкг/г) у декілька разів перевищувала аналогічні показники тварин середнього (0,085±0,037 мкг/г) і старшого віку (0,081±0,001 мкг/г). Призначення пектинових препаратів сприяло зменшенню кількості ртуті у печінці у незначних кількостях.

Деяко неоднозначні результати отримані при дослідженні вмісту ртуті у нирках. З одного боку, спостерігалось достовірне накопичення ртуті у нирках молодих (12,959±1,322 мкг/г), середніх (10,303±2,055 мкг/г) та старших (14,202±2,263 мкг/г) щурів, що у 20-25 разів перевищувало контрольні величини, а з другого – картина дії пектинів суттєво відрізнялась. Так, впадає в око тенденція до збільшення вмісту ртуті у нирках молодих щурів при дії ЯП (18,123±0,841 мкг/г) та ПВД (18,838±1,553 мкг/г) та незначне зниження вмісту ртуті при дії БП (11,855±1,062 мкг/г). У щурів середнього віку при дії всіх трьох пектинів спостерігалось зниження вмісту ртуті (відповідно для БП, ЯП та ПВД – 9,399±0,740; 7,767±0,677; 8,283±0,484 мкг/г), а у старших на тлі суттєвого зростання порівняно з чистим контролем при введенні хлориду ртуті (II) відзначалось також і суттєве зниження вмісту ртуті при дії пектинів, особливо БП (3,937±0,681 мкг/г). Таке зниження при дії БП контрастує з даними морфологічних досліджень.

Використання морфометричного методу дослідження дозволило виявити адаптаційні процеси в печінці щурів і особливості функціонального стану інтактної печінки, печінки після введення щурам хлориду ртуті (II) і в умовах додавання до їхнього раціону різних пектинових препаратів. Так, при введенні хлориду ртуті знайдено достовірне збільшення (щодо контролю) кількості гепатоцитів в полі зору у тварин всіх вікових груп на фоні малої зміни кількості двоядерних і багатоядерцевих клітин. Це, можливо, свідчить про адаптаційні процеси в печінці, що найхарактерніше виявляється у молодих щурів. При додаванні пектинових препаратів адаптаційні процеси в печінці здійснювалися головним чином за рахунок гіпертрофії гепатоцитів, що виявляється зменшенням їх кількості в полі зору на фоні малого числа диплоїдних клітин.

Дослідження виявили певні вікові особливості дії хлориду ртуті (II) у дозі  $1/150$  ЛД<sub>50</sub> та протекторної дії пектинових препаратів за показниками вмісту ртуті в крові та органах, а також результатами біохімічних та морфологічних досліджень. Буряковий пектин виявився найефективнішим для щурів середньої вікової групи, тоді як для щурів старшої вікової групи найефективнішим був пектин-вітамінне драже, що може пояснюватись неспецифічним характером дії за рахунок впливу біологічно активних речовин (вітамінів, есенціальних мікроелементів) як складників композиції. Значимість та доцільність даних про ефективність дії пектинів як засобів біологічної профілактики мікромеркуріалізм узгоджуються з даними спостережень над контингентами осіб, що стикались у процесі професійної діяльності зі ртуттю у концентраціях переважно на рівні сотих та тисячних мг/м<sup>3</sup>.



## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PECTINS USED FOR PROPHYLAXIS OF MERCURY INTOXICATION

*Kozlov K.P.*

Institute for Occupational Health of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Metals and their derivatives represent a large group of chemical substances and are widely used in national economies, science and technology. Modern industry uses about 70 metals of the periodic table, among them mercury occupies a special place. Recent years have seen a wide implementation of new technologies in industry which made it possible to decrease metal contamination. However, in many cases this effect was achieved at the expense of higher emissions of metals into the atmosphere, where they spread and enter water and soil. Moderate degrees of heavy metal elevation may be effectively treated with a nutritional and supplemental approach. The most preferable and promising within the scope of the pathogenic means of individual prophylactics is the usage of some substances contained in food products. Among such substances that produce no side effects on the body there are, in particular, pectin substances, which are polysaccharides, present in various fruits and root crops. It is necessary to point out that pectin itself has long been used in such preventive treatment. The question is to prepare special pectin containing compositions, selective to particular elements. The basic goal of this study was to justify pectin prophylaxis under mercury exposure in low doses taking into account age peculiarities.

Experiment was performed on white male Wistar rats injected intraperitoneally with 0.2 mg/kg HgCl<sub>2</sub>. Animals were divided into five groups with first group being intact, second injected with HgCl<sub>2</sub> three other groups along with HgCl<sub>2</sub> injection received corresponding pectin (sugar-beet, apple, and pectin dragee with vitamins). Each group was divided into three subgroups according to age – young, mature and old. Mercury accumulation in blood, kidney and liver was studied as well as the efficiency of pectin treatment after 10 weeks. Measurements were taking using atomic absorption spectroscopy method. Taking into account that mercury blocks sulfhydryl groups (SH-groups) measurements of SH-groups in liver and kidney tissues were also carried out. Mercury chloride caused different changes in SH-groups content in liver tissues. Old rats showed significant increase of SH-groups content comparing to intact, mature rats showed tendency to increase and young rats showed decrease in total SH-groups content which is more characteristic for mercury action. Decrease in thiol content can be explained by accumulation of free radicals as by-products of cell metabolism causing SH-equilibrium to shift towards increase of disulfide level. Administration of pectin caused different changes with sugar-beet pectin showed the increase in total SH-groups content followed by statistically significant increase of non-protein SH-groups content in liver tissues, while apple pectin and dragee caused statistically significant decrease of total SH-groups content in liver tissues of old rats with increase of non-protein, in case of mature and young rats SH-groups content remained at the same level just as of intact.

Mercury content was significantly higher in the blood of rats injected with inorganic mercury alone than in the blood of rats treated with pectin. Mercury also accumulated in the liver and kidneys. At the same time certain age peculiarities were revealed. Statistically significant decrease was observed in all groups of rats that received pectin except of mercury content in kidney of young rats, which remained at the same level. This can probably be explained that compensatory processes are not well developed in kidneys of young rats. Pectin-vitamin dragee showed much higher efficiency for older rats, which can be explained by unspecific action due to influence of biologically active substances such as vitamins and microelements on different reaction of older organism. Therefore, the efficiency of pectin and pectin types differs with age and thus should be taken into account when applying to humans.



## ПРИМЕНЕНИЕ МОРСКИХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, СВЯЗАННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Кривошапко О.Н., Попов А. М., Артюков А. А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия  
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

Сахарный диабет и атеросклероз являются в значительной мере болезнями воспаления. В связи с этим корректирующее действие при нарушениях углеводного и липидного обмена оказывают антиоксиданты, которые принимают участие в предотвращении развития указанных заболеваний, благодаря их способности ингибировать перекисное окисление липидов мембран, стабилизировать структуру последних и создавать оптимальные условия для гомеостаза клеток и тканей при самых разнообразных воздействиях патогенных факторов на организм.

Целью настоящей работы явилось изучение корректирующих свойств эхинохрома А (ЭХА) из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* и полифенольного препарата из морской травы *Zostera marina*, названного нами «Люромарин», при экспериментальном нарушении углеводного и липидного обмена.

Эксперименты проводили на мышах линии СВА весом 18-20 г. Диабет моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 120 мг/кг в физрастворе мышам, предварительно оставленным на ночь без пищи. Атеросклероз моделировали однократным введением животным препарата "Тулохарол" из расчета 40 мг/100 г массы тела. ПП в дозе 20 и 4 мг/кг и ЭХА в дозе 1 и 0,2 мг/кг вводили перорально. При аллоксановом диабете вещества вводили в течение 4+4 дней до и после его индукции, а при экспериментальном атеросклерозе в течение 3 дней до его индукции. После окончания эксперимента проводили забор крови и определяли с помощью биохимического анализатора («ROCHE», Швейцария).

На экспериментальных моделях аллоксанового диабета и атеросклероза отмечено четкое положительное терапевтическое действие ЭХА, который нормализовал такие биохимические показатели в плазме крови животных по сравнению отрицательным контролем (группа нелеченных животных с индуцированным аллоксановым диабетом), как уровень глюкозы, триглицеридов, малонового диальдегида (МДА), а также уровень активности аминотрансфераз (АЛТ и АСТ).

Полученные нами экспериментальные данные позволяют предположить следующие механизмы действия ЭХА при заболевании метаболическим синдромом: 1) ЭХА усиливает метаболизм глюкозы, снижая ее количество в крови; 2) ЭХА взаимодействует с ДТ-диафоразой эндотелиальных клеток сосудов, продуцируя  $H_2O_2$ ; 3)  $H_2O_2$  – обладает вазодилатацией (сосудорасширяющим действием); 4) в условиях ишемии и гипоксии  $H_2O_2$  дополнительный источник получения кислорода клетками за счет функционирования каталазы; 5)  $H_2O_2$  выступает в роли плейотропной сигнальной молекулы и вызывает резкое усиление синтеза разных видов PPAR – главных регуляторов углеводного и липидного обмена.

Экспериментальные исследования с использованием модели аллоксанового диабета и атеросклероза показали, что «Люромарин» из *Zostera marina* обладает наиболее выраженным антидиабетическим действием, способствуя существенной нормализации клинических показателей в плазме крови по сравнению с нелечеными животными. Можно предположить, что положительный эффект комплексного препарата «Люромарин», который состоит из лютеолина (ЛТ) и розмариновой кислоты (РК), связан с отмеченным ранее модулирующим действием этих полифенольных соединений на различные изоформы PPAR.

Изоформы PPAR $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  - это клеточные рецепторы, которые играют ключевую роль в защите от нарушений при данном заболевании. Вслед за активацией они формируют гетеродимеры с ретиноид-Х рецепторами, которые могут связываться со звеном ответа PPAR в промоторной области экспрессируемых генов и модулировать (повышать или понижать) их транскрипцию. PPAR $\gamma$  преимущественно экспрессируется в жировой ткани, а лиганды к ним используются как препараты для лечения сахарного диабета 2 типа. Экспрессия PPAR $\alpha$  происходит главным образом в печени, коричневом жире, почках, сердце и скелетной мускулатуре. Активация PPAR $\alpha$  стимулирует экспрессию липопротеинлипазы и ее активатора аполипопротеина А-V, вызывая снижение печеночного аполипопротеина С-III, ингибитора липопротеинлипазы, что ведет к уменьшению уровня триглицеридов в хиломикронах и в липопротеидах очень низкой плотности. Кроме того, активация PPAR $\alpha$  приводит к увеличению уровня холестерина-липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) путем увеличения экспрессии печеночного аполипопротеина А-I и II и содействует переходу холестерина из клеток к ЛПВП. PPAR $\delta$  экспрессируется повсеместно. Его активация на клеточном уровне увеличивает окисление жирных кислот и расход энергии в мышцах, в адипоцитах, стимулирует липогенез в печени и уменьшает продукцию глюкозы. В организме нормализуется липопротеиновый профиль и снижается уровень триглицеридов и инсулинопорезистентность. Поэтому не случайно PPAR $\delta$  выступает в качестве мишени для потенциальных препаратов при лечении ожирения. Можно предположить, что РК и ЛТ в составе препарата «Люромарин» вероятно выступают как лиганды всех трех подтипов PPAR и играют роль в уменьшении проявлений патологий, связанных с метаболическим синдромом.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные говорят о том, что РК и ЛТ в составе препарата «Люромарин» и биоантиоксидант ЭХА приводят к системному улучшению при патологиях, связанных с развитием метаболического синдрома, что позволяет рекомендовать указанные выше препараты в качестве средств профилактики и лечения нарушений липидного и углеводного обмена.



## THE APPLICATIONS OF MARINE ANTIOXIDANTS AT METABOLIC IMBALANCES

*Krivoshapko O.N., Popov A.M., Artyukov A.A.*

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

The diabetes mellitus and atherosclerosis are appreciably illnesses of an inflammation. In this connection resolve action at lipids and carbohydrate metabolic imbalances an exchange antioxidants which take part in prevention of development of the specified diseases, owing to their ability inhibition lipid peroxygenation membranes, to stabilize structure of the last and to create optimum conditions for a homeostasis of cells and tissues at the diversified influences of pathogenic factors on an organism.

The purpose of the present work was studying resolve properties of the echinochrome A (EHA) from flat sea urchin *Scaphechinus mirabilis* and a polyphenolic preparation from sea grass *Zostera marina*, named by us «Luromarin», at experimental models of carbohydrate and lipid metabolic imbalances.

Experiments spent on mice of line CBA in weight 18-20 the Diabetes stimulated intraperitoneal administration of alloxan in dose of 120 mg/kg in saline to the mice preliminary left for night without food. An atherosclerosis stimulated by administration of mice of "Tyloxapol" preparation on the basis of 40 mg/100g weights of body. At alloxan diabetes of substances was administered within 4+4 days before and after stimulation, and at an experimental atherosclerosis within 3 days up to its induction. After the termination of experiment spent blood samples and defined by means of the biochemical analyzer («ROCHE», Switzerland).

On experimental models alloxan diabetes and an atherosclerosis precise positive therapeutic action of the EHA is noted, which normalized such biochemical parameters in plasma of blood of animals in comparison by the negative control (group untreated animals with induced alloxan diabetes) as a level of glucose, triglycerides, malondialdehyde, and also a level of activity amino transferases (AIT and AsT).

The experimental data received by us allow to assume following mechanisms of action of the EHA at disease by a metabolic syndrome: 1) the EHA strengthens a metabolism of glucose, reducing its quantity in blood; 2) the EHA cooperates with DT-diaphorase endothelial cells of vessels, producing  $H_2O_2$ ; 3)  $H_2O_2$  - possesses vasodilatation (vasodilating action); 4) in conditions ischemia and hypoxia  $H_2O_2$  an additional source of reception of oxygen cells due to functioning catalase; 5)  $H_2O_2$  acts in a role pleiotropic signal molecule and causes sharp strengthening synthesis of different PPAR types - the main regulators carbohydrate and lipid metabolism.

Experimental researches with use of model alloxan diabetes and an atherosclerosis was shown that «Luromarin» from *Zostera marina* possesses the most expressed antidiabetic action, promoting essential normalization of clinical parameters in plasma of blood in comparison with untreated animals. It is possible to assume, that a positive effect of complex «Luromarin» preparation which consists from luteolin (LT) and rosmarinic acids (RA), it is connected with the modulating action of these polyphenolic connections noted earlier on various isoforms PPAR.

The isoforms PPAR also are cellular receptors which play a key role in protection against infringements at the given disease. After activation they form heterodimers with retinoid receptors which can communicate with a part of PPAR responses in promoter area expressing genes and modulate (to raise or lower) their transcription. PPAR mainly expressing in a fatty tissue and ligands to them 2 types are used as preparations for treatment of diabetes. PPAR expression occurs mainly in a liver, brown fat, kidneys, heart and skeletal muscles. Activation PPAR stimulates expressing lipoprotein lipase and its activator apolipoprotein A-V, causing decrease hepatic apolipoprotein C-III, inhibitor lipoprotein lipase that conducts to reduction of a level triglycerides in chilomicrones and in lipoproteids very low density. Besides activation PPAR leads to increase in a level of cholesterol-lipoproteid of high density by increase expression hepatic apolipoprotein A-I and II and promote transition of cholesterol from cells to high-density lipoprotein cholesterol. PPAR expressed everywhere. Its activation at a cellular level increases oxidation of fat acids and power consumption in muscles, in adipocytes, stimulates lipogenesis in a liver and reduces production of glucose. In an organism it is normalized structure lipoproteins and the level triglycerides and also is improved insulin sensitivity. Therefore PPARs represents as a target for potential preparations at treatment of adiposity. It is possible to assume, that RA and LT in structure of a preparation «Luromarine» possibly act as ligands all three subtypes PPAR and play a role in reduction of the pathologies connected with a metabolic syndrome.

Thus, the experimental data received by us suggested that RA and LT in structure of «Luromarin» preparation and polyhydroxynaphthaquinone preparation of EHA lead to system improvement at the pathologies connected with development of metabolic syndrome that allows to recommend of the specified above preparations as of preventive at lipid and a carbohydrate metabolic imbalances.



## **НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ “МАГНОЛИЯ” НА ОСНОВЕ НАНОКОМПОЗИЦИОННЫХ ПОРОШКОВ ЖЕЛЕЗА**

*Кущевская Н.Ф., Кущевский А.Е., Воробйова Т.В., Иващенко Е.В., Горбачевский А.Н.*

Институт коллоидной химии и химии воды им.А.В. Думанского, Киев, Украина  
e-mail: honch@icccw.kiev.ua

Анемия является патологическим процессом, который характеризуется уменьшением количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в единице объема крови и развитием гипоксии тканей организма. В структуре всех анемий удельный вес железодефицитной анемии (ЖДА) составляет 80-90%. Число людей с дефицитом железа в мире достигает 200 млн. человек (по данным ВОЗ 2005-2007 гг). В Украине заболеваемость ЖДА составляет 160 человек на 100 тыс. Суточная потребность в железе для мужчин составляет 10-20 мг, а для женщин – 20-30 мг.

В клинической практике используются в основном соли  $Fe^{2+}$  (глюконат, сульфат, фумарат, аспарагинат) в комбинации с различными препаратами.

Нами впервые создана целая серия диетических добавок “Магнолия” (торговая марка) на основе нанодисперсных частиц железа, полученных термохимическим способом [1]. В такой форме частицы на своей поверхности содержат ионизированную форму железа, которая в организме сразу включается в биохимические процессы, что было установлено экспериментально.

Проведена клиническая апробация добавок диетических «Магнолия» и их переносимость у больных с ЖДА.

Разработаны БАД:

- для детей до 18 лет (диетическая детская);
- от 18-35 лет (диетическая молодежная);
- от 35-50 лет (диетическая для расцвета жизни);
- после 50 (диетическая для зрелости).

Применение БАД “Магнолия” целесообразно назначать всем больным с синдромом ЖДА, для улучшения состояния сердечно-сосудистой системы и др.

### **Литература:**

1. Н.Ф. Кущевская. Физико-химические условия синтеза наноконпозиционных порошков ферромагнетиков биомедицинского назначения: Автореф. дис. д-ра техн. наук. – К., 2001. – 39 с.



**NEW BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES "MAGNOLIA" ON BASE  
OF NANOCOMPOSITE FERRIC POWDERS**

*Kuschevskaya N.F., Kushevskiy A.E., Vorobjova T.V., Ivaschenko E.V., Gorbachevskiy A.N.*

A.V. Dumansky Institute of colloid and water chemistry, Kiev, Ukraine  
e-mail: honch@icwc.kiev.ua

The anemia is a pathological process, which is characterized by reduction of эритроцитов amounts and hemoglobin concentrations in the in unit of the blood volume and development of гипоксия гипоксии of organism issues. The specific gravity of ferricdeficit anemia in structure of all anemia (FDA) forms 80-90%. The number of the people with ferric deficit reaches 200 mln person in the world (on data of VHO in 2005-2007 years). The disease of FDA in Ukraine forms 160 persons on 100 thousands. Dayly need of ferric for men forms 10-20 mg, but for women - 20-30 mg.

It is used basically salts of  $Fe^{2+}$  (glyukonat, sulphate, fumarat, asparginat) in combination with different preparation in clinical practice.

It was created by us for the first time a whole series of the dietetic additives "Magnolia" (the trademark) on base nanodispersed particles of ferric, which were got by thermochemically way [1]. The particles on the surfaces in such form contain the ionized form of ferric, which is immediately includes in biochemical processes in organism that was set experimentally.

The clinical approbation of the dietetic additives "Magnolia" and their bearableness of patients with FDA was carried out.

It Is developed biologically active additions (BAA):

- for children before 18 years (the dietetic child);
- from 18-35 years (dietetic youth);
- from 35-50 years (dietetic for bloom of the lifes);
- after 50 (dietetic for maturity).

The using of BAA "Magnolia" reasonable to up point for all patients with FDA syndrome for improvement of cardiovascular system and others.

**Reference:**

1. Kushevskaya N.F. Physico-chemical conditions of Nanocomposite ferromagnetic powders for biomedical application. – Manuscript.



## НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «МЕБИКАР» В МЕДИЦИНЕ И ВЕТЕРИНАРИИ

*Лебедев О.В., Кравченко А.Н.*

Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Российская Федерация  
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru

Современной тенденцией медицинской химии является конструирование многофункциональных лекарственных препаратов широкого спектра действия. Бициклические бисмочевинны октанового ряда являются новым классом нейротропно активных соединений [1]. В медицинской практике с 1979 года используется препарат для лечения неврозов Мебикар (2,4,6,8-тетраметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион) [2]. Он до сих пор продолжает привлекать внимание биологов и медиков.

Изучение спектра действия препарата продолжает расширяться [3]. Так, Мебикар исследовался в наркологии для купирования расстройств при абстиненции, для предупреждения неврозоподобных расстройств и купирования влечения к алкоголю и наркотикам в период ремиссий алкоголизма и наркомании, для лечения алкоголиков и наркоманов с психическими расстройствами (в комбинации с нейролептиками); в невропатологии – для лечения больных с пароксизмами после черепно-мозговой травмы; в терапии – для лечения больных с кардиалгиями, ишемической болезнью сердца, для реабилитации после инфаркта миокарда; в гинекологии – для купирования предменструальных расстройств, для лечения климактерических явлений [3-16]. В настоящее время он испытывается в качестве адаптогена медикаментозной коррекции отрицательных влияний солнечных магнитных бурь на организм.

Кроме того, важное практическое значение Мебикар приобретает в ветеринарии [17-21]. Проведены исследования по его использованию для профилактики желудочно-кишечных стронгилятозов овец путем коррекции иммунного статуса [17], профилактики транспортного стресса у лошадей [18], предотвращения стрессовых состояний у норок и песцов при промышленном выращивании их в звероводческих хозяйствах [19,20].

### **Литература:**

1. О. В. Лебедев, Л. И. Хмельницкий, Л. В. Епишина и др., Сб. Целенаправленный поиск новых нейротропных препаратов, Зинатне, Рига, 1983, 81.
2. М. Д. Машковский. Лекарственные средства. Новая волна, Москва, 2005, с 86.
3. Г. Я. Базаревич, И. Е. Зимакова, Г. М. Харин и др., Вестник хирургии, 1981, **127**, (7), 81.
4. А. В. Вальдман, И. В. Заиконникова, М. М. Козловская и др., Фармакол. и токсикол., 1981, **44**, (1), 47.
5. А. В. Вальдман, Э. А. Костандов, А. В. Мартынихин, Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1983, **95**, (1), 47.
6. И. Е. Зимакова, Фармакол. и токсикол., 1977, **40**, (6), 684.
7. И. Е. Зимакова, И. В. Заиконникова, Р. А. Камбург, С. В. Киршин, Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1981, **91**, (12), 767.
8. И. Е. Зимакова, Р. А. Камбург, С. В. Киршин, Фармакол. и токсикол., 1980, **43**, (4), 368.
9. И. Е. Зимакова, Р. А. Камбург, С. В. Киршин, Фармакол. и токсикол., 1982, **45**, (5), 23.
10. И. Е. Зимакова, Н. С. Макаричов, А. М. Карпов, Фармакол. и токсикол., 1986, **49**, (5), 50.
11. И. Е. Зимакова, Д. Г. Семенихин, А. М. Карпов, Фармакол. и токсикол., 1988, **51**, (1), 21.
12. Р. А. Камбург, И. Е. Зимакова, Фармакол. и токсикол., 1982, **45**, (4), 16.
13. М. М. Козловская, Р. У. Островская, Н. Н. Клейменова и др., Фармакол. и токсикол., 1981, **44**, (6), 654.
14. Д. М. Менделевич, И. Е. Зимакова, В. Д. Менделевич, Акуш. и гинекол., 1983, (2), 51.
15. Т. С. Тагирова, Казан.мед.жур., 1984, **65**, (1), 47.
16. Л. А. Щербатенко, Т. С. Тагирова, Р. А. Камбург, Казан.мед.журн., 1986, **67**, (5), 321.
17. Э. Х. Даугалиева, К.С. Балаян, Ветеринария, 1989, (7), 45.
18. С. А. Пушкарева, Л.С. Томанова, Сб. «Достижения физиологии и их применение в коневодстве», ВНИИ коневодства, 1984, 79.
19. В. А. Берестов, Л. К. Кожевникова, И. М. Олейник, Тез.докл.III Всосоюз.науч.конференции «Биология и патология пушных зверей», Петрозаводск, 1981, 36.
20. И. Е. Зимакова, В. А. Берестов, Х. И. Мелдо, Тез.докл.III Всосоюз.науч.конференции «Биология и патология пушных зверей», Петрозаводск, 1981, 53.



## NEW POTENTIAL APPLICATIONS OF *MEBIKAR* IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

*Lebedev O.V., Kravchenko A.N.*

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian  
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru

A modern trend in medical chemistry pertains to constructing of multifunctional medicinal preparations with a broad scope of action. Bicyclic bis-urea compounds of the octane series are a new class of neurope-active molecules [1]. The drug *Mebikar* (2,4,6,8-tetramethyl-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-dion) has been in use in practical therapeutics for curing neuroses since 1979 [2]. It still attracts biologists and physicians' attention.

The researches on its action are extending continuously [3]. For instance, *Mebikar* was examined in narcology for a relief of disorders in abstinent patients, for preventing neurosis-like disorders and relieving cravings for alcohol and narcotics in the period of alcohol and drug addiction remission, for treatment of alcohol and drug addicts with mental disorders (in combination with neuroleptics); in neuropathology – for treating patients with paroxysms in the post-cranio-cerebral injury state; in therapy – for treating patients with cardio disorders, ischemic disease and for the rehabilitation after myocardial infarction; in gynecology – for a premenstrual disorder relief and for treating climacteric disturbances [3-16]. Currently it undergoes testing as an adaptogen in the correction of negative impacts from solar magnetic storms on the human organism.

In addition, *Mebikar* is gaining practical importance in veterinary medicine [17-21]. It was examined for applications in the prophylaxis of gastroenteric strongilatoses in sheep through the immune status correction [17], transport stress prevention in horses [18], and prevention of stress states in minks and polar foxes in their commercial breeding [19,20].

### References:

- O. V. Lebedev, L. I. Khmel'nitskii, L. V. Epishina et al., in *Tselenapravlenniy poisk novykh neirotroponykh preparatov* (Directed Search for Novel Neurotropic Drugs), Zinatne, Riga, 1983, 81 (in Russian).
- M. D. Mashkovskii, *Lekarstvennye sredstva* (Drugs), Novaya Volna, Moscow, 2005, **1**, 86.
- G.Ya. Bazarevich, I.E. Zimakova, G.M. Harin et al., *Vestnic hirurgii*, 1981, **127**, (7), 81.
- A.V. Val'dman, I.V. Zaikonnikova, M.M. Kozlovskaya et al., *Farmakol. i toksikol.*, 1981, **44**, (1), 47.
- A.V. Val'dman, Ey.A. Kostandov, A.B. Martynihin, *Byull.eksperim.biol. i med.*, 1983, **95**, (1), 47.
- I.E. Zimakova, *Farmakol. i toksikol.*, 1977, **40**, (6), 684.
- I.E. Zimakova, I.V. Zaikonnikova, R.A. Kamburg, S.V. Kipshin, *Byull.eksperim.biol. i med.*, 1981, **91**, (12), 767.
- I.E. Zimakova, R.A. Kamburg, S.V. Kipshin, *Farmakol. i toksikol.*, 1980, **43**, (4), 368.
- I.E. Zimakova, R.A. Kamburg, S.V. Kipshin, *Farmakol. i toksikol.*, 1982, **45**, (5), 23.
- I.E. Zimakova N.S. Makarchikov, A.M. Karpov, R.A. *Farmakol. i toksikol.*, 1986, **49**, (5), 50
- I.E. Zimakova, D.G. Semenihin, A.M. Karpov, *Farmakol. i toksikol.*, 1988, **51**, (1), 21
- R.A. Kamburg, I.E. Zimakova, *Farmakol. i toksikol.*, 1982, **45**, (4), 16.
- M. M. kozlovskaya, P.U. Ostrovskaya, N.N. Kle`menova at al., *Farmakol. i toksikol.*, 1981, **44**, (6), 654.
- D. M. Mendelevich, I.E. Zimakova, V. D. Mendelevich, *Akush i ginekol.*, 1983, (2), 51.
- T. S. Tagirova, *Kazan.med. :juor*, 1984, **65**, (1), 47.
- L. A. Tcherbatenko, T. S. Tagirova, R.A. Kamburg, *Kazan.med. :juor*, 1986, **67**, (5), 321.
- Ye. X. Daugalieva, K.S. Balayan, *Veterinariya*, 1989, (7), 45.
- S. A. Pushkareva, L.S. Tomanova, *Sb. «Dostizheniya fiziologii i ih primeneniye v konevodstve»*, VNII konevodstva, 1984, 79.
- V. A. Berestov, L. K. Kothevnikova, I. M. Ole`nik, *Tez.dokl.III Vsesouyz.nauch.konferenzii «Biologiya i patologiya pushnyih zverei»*, Petrozavodsk, 1981, 36.
- I.E. Zimakova, V. A. Berestov, H. I. Meldo, *Tez.dokl.III Vsesouyz.nauch.konferenzii «Biologiya i patologiya pushnyih zverei»*, Petrozavodsk, 1981, 53.





## ДІЯ РОЗЧИНІВ ПІРИМІЛФОСМЕТИЛУ НА ДИНАМІКУ СКОРОЧЕННЯ ПООДИНОКИХ М'ЯЗОВИХ ВОЛОКОН ЖАБИ *RANA TEMPORARIA*

Левківська Л.В., Ноздренко Д.М., Мірошніченко М.С.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Фосфорвмісні сполуки є одним з найбільш важливих класів пестицидів, які використовуються в сільському господарстві. Широке використання органофосфатів обумовлене тим, що вони володіють високою інсектицидною та анкарицидною дією і при цьому відносно швидко розпадаються в організмі людини та тварин. Проте одним з їх важливих недоліків є висока токсичність, яка пов'язана з інгібуючою дією даних речовин на ферментні системи організму, особливо ацетилхолінестеразу. Прикладом фосфорвмісних пестицидів є піримілфосметил, який завдяки своїй невисокій вартості широко використовується у всьому світі. Значна кількість досліджень присвячені дії високих доз органофосфатів на такі системи організму як імунна, нервова, ендокринна та репродуктивна. Проте їх вплив на динаміку м'язового скорочення на сьогодні залишається не з'ясованим.

Дослідження проводили на поодиноких волокнах м'язу *m.tibialis anterior* жаби *Rana temporaria*. Один кінець волокна приєднували до емнісного датчика сили, дугий жорстко фіксували до датчика довжини. Стимуляцію здійснювали за допомогою двох платинових електродів, розміщених у дослідницькій камері на відстані 4 мм по обидві сторони м'язового волокна. Стимуляцію проводили прямокутними імпульсами частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс. Період релаксації складав 2 хв. За отриманими даними будували криві залежності сили скорочення та зміни довжини м'язового скорочення в результаті дії різних концентрацій піримілфосметилу.

З метою встановлення концентрацій піримілфосметилу, під дією яких відбувались зміни динамічних параметрів скорочення, досліджено його вплив на м'язове скорочення у діапазоні концентрацій  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  моль/л. В результаті досліджень показано, що розчини піримілфосметилу в концентраціях нижчих ніж  $10^{-9}$  моль/л майже не впливали на роботу скелетно-м'язових препаратів, при використанні піримілфосметилу в концентрації  $10^{-6}$  моль/л відбувалося майже повне пригнічення скорочення. Виходячи з вищенаведеного для оцінки впливу піримілфосметилу на динамічні параметри скорочення ми використовували його розчини в діапазоні концентрацій  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  моль/л.

Зміни в динаміці скорочення відбувались вже після 2-ї хвилини дії розчину піримілфосметилу протягом всього акту скорочення, за винятком дотетанічної ділянки. Впродовж подальшої дії використаної сполуки, протягом 4-6хв, найменше зниження сили м'язового скорочення відбувалось на дотетанічній ділянці, досягнення стаціонарного стану скорочення відбувалось з затримкою тривалістю до 150мс. Максимальне зниження сили скорочення відбувалось після 14-ї хвилини досліду на ділянці утримання стаціонарного стану скорочення. Слід відмитити, що при використанні розчину піримілфосметилу використаних концентрацій зменшення довжини м'язового скорочення мало дещо нерівномірний характер на дотетанічних та тетанічних ділянках. Відмивання м'язових препаратів розчином Рінгера супроводжувалося відновленням динамічних параметрів скорочення до вихідних значень. Збільшення часу відновлення було пропорційним підвищенню використаних концентрацій препарату. Показано, що динамічні параметри скорочення зазнавали найменшого впливу на ділянках дотетанічного скорочення

Результати досліджень показали, що піримілфосметил істотно впливає на роботу скелетних м'язових волокон. Слід відзначити, що ці зміни, насамперед, стосувалися загального зниження досліджуваних динамічних параметрів скорочення м'язових волокон.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про те, що піримілфосметил по-різному впливає на окремі динамічні параметри скорочення скелетного м'язу (силу, довжину та швидкість вкорочення) на всіх функціональних ділянках скоротливого процесу. Отримані нами експериментальні дані, можна пояснити впливом піримілфосметилу як на примембранні процеси, так і на здатність його проникати крізь плазматичну мембрану в клітину і в такий спосіб впливати на АТФазну активність актоміозинового комплексу саркомеру.



**EFFECT OF PIRIMIPHOSMETHYL ON DYNAMICS OF SINGLE MUSCLE  
FIBERS CONTRACTION (*RANA TEMPORARIA*)**

*Levkivska L.V., Nozdrenko D.M., Miroshnichenko M.S.*

Taras Shevchenko Kyiv National University, Faculty of Biology, Department of Biophysics

The organophosphorus compounds are one of the most important class of pesticides which are widely used in agriculture because they have strong insecticidal and acaricidal effects and high rate of decay in human and animal organisms. The main disadvantage of organophosphate is high toxicity evoked by its inhibitory effects on organism enzyme systems especially acetylcholinesterase. One of such compounds is pirimiphosmethyl which is a cheap pesticide widely used in the world. Significant amount of the research are devoted to investigation of the effects of high doses of pesticides on such systems as nervous, immune, endocrine and reproductive systems. However, its effects on muscle contraction dynamics are incompletely understood.

The experiments were carried out on single skeletal fiber from *Rana temporaria* m.tibialis anterior muscle. One of the ends was attached to capacitive force sensor and other end was strongly fixed to sensor of length. Fibers were stimulated by means of platinum electrodes placed in experimental chamber at a distance 4 mm from both sides of muscle fiber. The stimulation was carried out by means of rectangular stimulus (frequency – 30Hz, duration – 3000ms). The period of relaxation was 2 min. According to obtained results length-force curves were graphed under the influence of different concentration of pirimiphosmethyl.

To reveal concentrations of pirimiphosmethyl in which it induces changes of dynamical parameters of contraction its influence on muscle contraction in the range of concentration from  $10^{-9}$  to  $10^{-6}$  m/l have been previously estimated. It has been established that pirimiphosmethyl at concentrations lower than  $10^{-9}$  m/l has no effects on skeletal muscle fiber. Nevertheless, pirimiphosmethyl in concentration  $10^{-6}$  m/l induced almost full inhibition of muscle contraction. Consequently, use was made of solution in concentration from  $10^{-7}$  to  $10^{-6}$  m/l to estimate effect of pirimiphosmethyl on dynamical parameters of muscle contraction.

The changes of muscle contraction dynamics have already occurred after 2 min of influence of pirimiphosmethyl solution during the whole of contraction act but such changes have not been observed on pretetanic section. However, the influence of used compound during 4-6 min induced lightest changes of the force on pretetanic section. The steady-state of contraction has been attained with delay (duration -150 ms). Maximal force reduction was observed in the course of steady state retention after 14 min of experiment. Furthermore, influence of various concentrations of pirimiphosmethyl was characterized by nonlinear behavior on both pretetanic and postetanic section. Pirimiphosmethyl washing out from muscle fiber by Ringer solution led to recovery of muscle contraction dynamic parameters to initial values. Increasing in time of recovery process was proportional to increasing in concentration of pirimiphosmethyl. It was shown that lightest changes of dynamical parameters of muscle fiber contraction were observed on section of pretetanic contraction.

Pirimiphosmethyl have been revealed to affect on skeletal muscle fiber contraction. It should be noted that such changes are concerned with general reducing of dynamical parameters of muscle fiber contraction. It was revealed that pirimiphosmethyl has different effects on such parameters as force, length and velocity on (at) all functional section of muscle contraction. The results obtained could be explained by influence of pirimiphosmethyl on both membranous process and its possibility to penetrate through membrane into the cells and affect on ATPase activity of sarcomeric actomyosin complex.



## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСОВ ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО

Логвина А.О., Дитченко Т.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь  
e-mail: anna.logvina@mail.ru, ditchenko@inbox.ru

Растения являются уникальными источниками многих биологически активных соединений. Несмотря на успехи в области применения синтетических лекарств, препараты природного происхождения приобретают все больший вес в практической медицине в связи с широким спектром их биологической активности и экологической безопасностью изготовления.

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) является одним из древнейших лекарственных растений. Лекарственным сырьем обычно служат семена, экстракты из которых обладают противовоспалительными, антихолестеринными, тонизирующими, антианемическими и другими терапевтическими эффектами. Препараты, изготовленные из пажитника, с успехом используются при лечении инсулиннезависимого диабета.

Основными биологически активными веществами пажитника греческого являются стероидные сапогенины, фитостерины, алкалоид тригонеллин, никотиновая кислота, флавоноиды, эфирные масла и др. В настоящее время сапогенины находят широкое применение в фармацевтической промышленности для синтеза гормональных препаратов. Кроме того, у этих соединений была обнаружена способность тормозить рост некоторых форм злокачественных образований; снижать уровень холестерина в крови, а также фунгицидная, антибактериальная и антивирусная активности. Наибольшее значение среди стероидных сапогенинов имеет диосгенин, отсутствие которого в Белоруссии как исходного сырья для медицинской промышленности восполняется за счет импорта.

В этой связи большой практический интерес представляет биотехнологический способ получения фитомассы пажитника греческого, основанный на культивировании в искусственных условиях на питательных средах его клеток и тканей. Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием интактных растений: радикальное решение проблемы дефицита исходного сырья; независимость от климатических условий и вредителей; возможность управления процессом биосинтеза целевых продуктов.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния состава питательной среды (концентрации фитогормонов, содержания сахарозы как источника углерода) на продукцию биомассы каллусной культуры пажитника греческого.

Для индукции каллусогенеза были использованы листовые экспланты асептически выращенных 4-5 недельных растений пажитника греческого. Минеральная основа питательной среды соответствовала прописи Мурасиге и Скуга (МС). Было использовано 7 вариантов сред, которые различались соотношением регуляторов роста – ауксинов и цитокининов, но с постоянной концентрацией сахарозы равной 30 г/л. В качестве ауксина в состав сред входила 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,0 мг/л, в качестве цитокинина – кинетин в таком же диапазоне концентраций. Варьирование концентрации сахарозы в питательной среде осуществлялось в диапазоне от 30 до 50 г/л. Контролем служила питательная среда МС, включающая 30 г/л сахарозы. Выращивание каллусов осуществлялось в условиях термостата при 24,5°C в темноте. Для оценки ростовых процессов каллусных культур определяли индекс роста, удельную скорость роста и время удвоения биомассы.

В ходе проведенных исследований установлено, что наиболее высокие показатели ростовой активности были характерны для каллусной культуры пажитника греческого, выращиваемой на питательной среде, содержащей 2,4-Д и кинетин в максимальной из использованных концентраций, равной 2,0 мг/л. Удельная скорость каллусов при этом составляла в среднем 0,048 сут<sup>-1</sup>, а время удвоения биомассы 17,7 суток. Достаточно высокие показатели ростовой активности каллусов *Trigonella foenum-graecum* наблюдались также в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина. В целом скорость прироста биомассы каллусной культуры на данных вариантах сред была практически в 2 раза больше по сравнению результатами, полученными на других протестированных 5 вариантах.

При изучении характера влияния повышенных концентраций сахарозы в среде культивирования каллусов была обнаружена выраженная стимуляция ростовых процессов. Увеличение уровня сахарозы до 40 г/л приводило к возрастанию удельной скорости роста каллусов в среднем в 1,5 раза по сравнению с контролем. При культивировании каллусов пажитника на среде, включающей 50 г/л сахарозы, скорость прироста биомассы увеличивалась более чем в 2 раза.

Таким образом, с целью оптимизации состава питательной среды для культивирования каллусов пажитника греческого можно использовать в сравнительно высоких концентрациях 2,4-Д и кинетин (2,0 мг/л для каждого), а также повышать концентрацию сахарозы вплоть до 50 г/л, что способствует существенному возрастанию интенсивности ростовых процессов.



## OPTIMIZATION OF GROWTH MEDIUM COMPOSITION FOR CULTIVATION OF FENUGREEK CALLUS

*Logvina Anna, Ditchenko Tatyana*

Belarus State University, Minsk, Belarus  
e-mail: anna.logvina@mail.ru, ditchenko@inbox.ru

Plants are unique sources of many biologically active compounds. Despite successes in implications of synthetic medicines, preparations of a natural origin get the increasing weight in applied medicine because of wide spectrum of their biological activity and ecological safety of manufacturing.

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) is one of the most ancient herbs. Normally seeds of fenugreek are used as medical raw materials for preparation of extracts that possess anti-inflammatory, anti-cholesterol, toning up, anti-anaemic and other therapeutic effects. The preparations made from fenugreek are used with success at insulin-independent diabetes treatment.

The basic biologically active substances from fenugreek are steroid sapogenins, phytosterols, alkaloid trigonelline, nicotinic acid, flavonoids, essence, etc. At the moment, sapogenins find wide application in pharmaceutical industry for synthesis of hormonal preparations. Besides, it has been found out that these substances interrupt growth of some forms of malignant formations, reduce cholesterol level in blood, and possess also fungicidal, antibacterial and antiviral activity. The greatest value among steroid sapogenins has diosgenin, which absence in Belarus as initial raw material for medical industry is filled by import.

Thereupon, a biotechnological way for a fenugreek phytomass manufacturing based on the cultivation of plant cells and tissues on nutrient mediums at simulated conditions, is of a big practical interest. The given method possesses a number of advantages in comparison with the use of intact plants: the radical solving of a problem of initial raw materials deficiency; independence from environmental conditions and wreckers; possibility for management of process of target products biosynthesis.

The goal of the present work was investigation of influence of a growth medium composition (concentration of phytohormones, addition of sucrose as carbon source) on biomass production in fenugreek callus cultures. For induction of fenugreek callusogenesis, leaves explants of plants raised at aseptic conditions for 4-5 week have been used. The mineral basis of growth medium corresponded to Murasige and Skuga (MS) protocols. Seven medium variants differed in ratio of growth regulators, auxins and cytokinins, but with constant sucrose concentration (30 g/l), have been used. As auxin, in mediums was included 2,4-dihlorfenoksiuksusnaja acid (2,4-D) in a range of concentration from 0.5 to 2.0 mg/l, as cytokinin, kinetin in the same range of concentrations was taken. The variation in sucrose concentration in medium was in a range from 30 to 50 g/l. MS medium including 30 g/l sucrose served as a control. Callus cultivation was carried out at 24.5°C in the dark. For an estimation of growth processes in callus cultures, growth index, specific growth rate and time of biomass doubling were defined.

During investigations, it was established that the highest levels of growth activity indicators were found for fenugreek callus cultures grown up on the nutrient medium containing 2,4-D and kinetin at maximal concentrations among the used ones – 2.0 mg/l. Specific callus growth rate, thus, averaged at 0.048 per day, and the time of biomass doubling was 17.7 days. Also in the presence of 1.0 mg/l 2,4-D and 2.0 mg/l kinetin were observed high levels of growth activity indicators for callus cultures of *Trigonella foenum-graecum*. As a whole, rate of a biomass gain of callus cultures maintained on the given medium variants was practically in two times higher in comparison to the results received on other 5 tested medium variants.

Studying character of influence of the raised sucrose concentration in cultivation medium, the significant stimulation of growth processes has been found out. Increase in the level of sucrose up to 40 g/l led to increase of specific callus growth rate - on average 1.5 fold in comparison to the control. During cultivation of fenugreek callus on the medium including 50 g/l sucrose, rate of a biomass gain increased more than in two times.

Thus, for optimization of growth medium composition for cultivation of fenugreek callus culture, it is possible to include rather high concentration of 2,4-D and kinetin (2.0 mg/l for both), and also the raised sucrose concentration (up to 50 g/l), that promotes essential increase in intensity of growth processes.



## ЭФФЕКТИВНОСТЬ А-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ГИПЕРФЕРРЕМИИ И ГИПЕРГЛИКЕМИИ У РАБОЧИХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

Лубянова И.П., Краснокутская Л.М., Мартыросова В.Г.

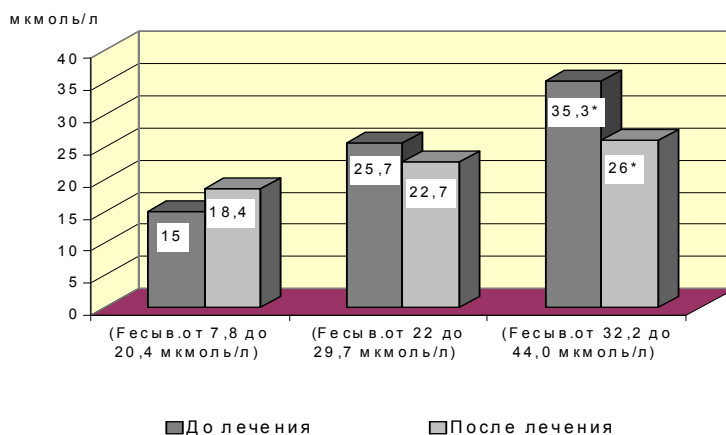
Институт медицины труда АМН Украины, Киев, Украина  
e-mail: kostatram@gmail.com

Условия для повышенного поступления железа и его соединений в организм человека создают достаточно мощные антропогенные источники загрязнения окружающей и производственной среды. Железо – металл с переходной валентностью, который принимает участие во многих реакциях на уровне клеточных и субклеточных структур, способен продуцировать активные кислородные радикалы и развитие оксидативного стресса. Перегрузка организма железом, как известно, связана с риском развития метаболического синдрома и развития сахарного диабета 2 типа [1,2,3]. Результаты эпидемиологических исследований у больных сидеросиликозом показали, что более, чем в половине исследований сахарные кривые имели диабетический характер [4]. При сварке конструкций из сталей и чугуна большую часть сварочных дымов составляют оксиды железа [5,6]. Через 8–10 лет возможно накопление железа в организме, достаточное для развития характерных для него патологических изменений.

**Материалы и методы.** В когортах из 356 здоровых сварщиков и 45 лиц контрольной группы определяли в сыворотке % насыщения трансферрина железом (%НТЖ), содержание железа и глюкозы натощак.

**Результаты.** Среднее содержание железа в цельной крови ( $Fe_{кр}$ ), превышающее верхнюю границу нормы (52 мг/л), отмечено почти у половины обследованных ( $46,4 \pm 3,9\%$ ). Маркер перегрузки организма железом (%НТЖ > 45%), критичный для развития гемохроматоза (уровень, регистрировался у каждого 9 практически здорового сварщика ( $12,6 \pm 3,7\%$ ). В группе сварщиков с повышенным содержанием в организме железа увеличивается частота больных с повышенным содержанием глюкозы в сыворотке крови. У обследованных с высокой степенью насыщения трансферрина железом (>45%) содержание глюкозы в сыворотке крови коррелировало с содержанием железа в сыворотке ( $r=0.53$ ,  $P < 0.05$ ) и было заметно выше, чем в общей группе сварщиков (соответственно  $6,4 \pm 0,4$  ммоль/л и  $5,7 \pm 0,3$  ммоль/л, в контрольной группе -  $5,1 \pm 0,12$  ммоль/л). Полученные данные подтверждают, что проблема развития вторичной перегрузки железом в условиях современного промышленного производства и связанные с ней гипергликемия и риск развития СД актуальна и требует разработки комплекса мероприятий первичной и вторичной её профилактики.

Влияние препарата этилендиаминовая соль  $\alpha$ -липовой кислоты на показатели обмена железа у больных с гиперферремией, обусловленной избыточным поступлением железа в организм в условиях производства, было изучено с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра (ААС) (модели «Сатурн» и Perkin-Elmer).



**Рис.1.** Изменения с учетом исходного уровня содержания железа в сыворотке крови в процессе лечения  $\alpha$ -липовой кислотой больных с гиперферремией.

У больных с гиперферремией в результате приема препарата происходит уменьшение содержания железа в сыворотке крови (рис 1), коррелирующее с усилением экскреции железа с мочой, уменьшением уровня билирубина сыворотки крови, нормализуется содержание глюкозы в сыворотке крови. В модельных экспериментах найдено, что препарат хелатирует железо из комплекса железо (III) – цитрат, образуя стабильный комплекс с железом (III). Вероятно, при гиперферремии положительный эффект  $\alpha$ -липовой кислоты связан с нормализацией обмена железа и уменьшением пула “лабильного” железа. Таким образом, препарат  $\alpha$ -липовой кислоты можно рекомендовать для лечения больных с гиперферремией и перегрузкой организма железом, и особенно в сочетании с сахарным диабетом.



## EFFICIENCY OF ALPHA-LIPOIC ACID AT HYPERFERREMIA AND HYPERGLICEMIA IN WELDERS FOR THE WORKERS OF INDUSTRIAL ENTERPRISES

*Lubyanova I.P., Krasnokutskaya L.M., Martirosova V.G.*

Institute for Occupational Health, of AMS of Ukraine, KievUkraine  
e-mail: kostatram@gmail.com

Antropogenic pollution of environment produces conditions for increased iron intake by human organism. Iron is a transitional metal and a potential catalyst in many cellular reactions that produce reactive oxygen species and increase oxydative stress, thereby iron overload is known to have an impact on the risk of metabolic syndrom and type 2 diabetes[1,2,3]. In epidemiological studies in workers of metallurgic factories with syderosylosis the increased incidence of impaired glucose tolerance (>50%) was found [4]. In welding of steel and cast iron a great part of smoke consists of iron oxides aerosols, and in 8-10 years the accumulation of iron in organism of workers can reach a pathological level [5,6]. The aim of investigation was to evaluate risk of carbohydrate metabolism disturbance in workers with elevated accumulation of iron in organism.

**Materials and Methods.** In cohort of 356 healthy welders of black metals and in 45 control subjects percent serum transferrin saturation by ferrous (%TSFe), iron content and fasting plasma glucose level were measured.

**Results.** In 46,4±3,9% of welders content of iron in whole blood exceeded the maximal normal level (52 mg/l). A marker of iron overload (TSFe >45%) was critical for development of hemochromatosis in every 9<sup>th</sup> of subjects (12,6±3,7%). The incidence of high serum glucose level was increased in group of welders with iron overload in comparison with normal iron store group. In subjects with high degree of serum transferrin saturation (>45%) concentration of glucose in serum (6,4±0,4 mmol/L) correlated with content of iron in blood serum (r=0.53, P < 0.05) and was substantially higher then in whole group of welders (5,7±0,3 mmol/L) and in control group (5,1±0,12 mmol/L). The data suggest that problem of secondary iron overload of workers' organism in modern metallurgic industry and related hyperglycemia and risk of type 2 diabetes mellitus is highly actual and requires to develop complex of profilactic measures.

The influence of ethylenediamine salt of alpha-lipoic acid on the indices of iron metabolism in patients with occupational hyperferremia pathologies has been studied using atomic absorption spectrometry (AAS) using the models «Saturn» and by Perkin-Elmer;

In the cause of treatment in patients with hyperferremia the decrease iron concentration in the serum occurs and correlates with the enhancement of iron excretion with urine, decline of bilirubin and glucose levels in serum. We have found that the alpha-lipoic acid chelates iron from iron (III)-citrate complex and form stable iron (III) complexes. The conclusion is that positive effects of lipoic acid preparation in patients with hyperferremia at least partially can be associated with normalization of iron exchange and reduction in the labile iron pool.

It is possible to suppose, that at hyperferremia the positive effects of ethylenediamine salt of alpha-lipoic acid are related to normalization of exchange of iron and diminishing of pool of "labile" iron. On this grow, preparation of alpha-lipoic acid can be recommended for treatment of patients with hyperferremia and overload of organism iron, and especially in combination with diabetes mellitus.

### References:

1. Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV: The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care*, July 1, 2007; 30(7): 1926 - 1933.
2. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W: Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem* 51: 1201-1205, 2005
3. Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Wood RJ. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr*. 2001 Mar;73(3):638-46.
4. Карапата А.П., Шевченко А.М. Профессиональные пылевые болезни легких.- Киев: Здоров'я, 1980. – 184 с.
5. Явдошин И.Р., Походня И.К. Образование сварочного аэрозоля при дуговой сварке плавлением и его гигиеническая оценка. //Сборник трудов 1-й Международной научно-практической конференции «Защита окружающей среды, здоровье, безопасность в сварочном производстве» 11-13 сентября 2002 г., г. Одесса. – Одесса. «Астропринт». - 2002. – С. 38-54.
6. Лубянова И.П. Хроническая интоксикация железом как профессиональное заболевание //Український журнал з проблем медицини праці. – 2005, - № 2. – С.3-11



## ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА КУКОЛОК КИТАЙСКОГО ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА НА ПРОЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У КРЫС

Лукиевская О.Я.<sup>1</sup>, Нарута Е.Е.<sup>1</sup>, Чиркин А.А.<sup>2</sup>, Балаева-Тихомирова О.М.<sup>2</sup>, Буко В.У.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, г. Гродно, Беларусь;

<sup>2</sup>Государственный университет им. П.М. Машерова, г. Витебск, Беларусь

e-mail: buko@biochem.unibel.by; vu.buko@tut.by

**Цель исследования:** Оценить эффект препарата экстракта шелкопряда на развитие инсулиновой резистентности и других признаков метаболического синдрома у белых крыс, содержащихся на высокожировой диете.

**Методы исследования.** Крысы- самки линии Вистар (220-240 г) в течение 12 нед. получали высокожировую диету по Либеру-Де Карли (Ssniff Specialdiaten GmbH, Германия), где к базовой диете добавлялось кукурузное масло в количестве 40 г на 1 кг диеты. Группы животных, содержащихся на ВЖД, получала водный экстракт куколок шелкопряда из расчёта 7 мг свободных аминокислот/100 г массы тела внутривентрикулярно ежедневно в течение последнего месяца эксперимента. Забой животных осуществляли после 18-часового голодания с целью определения содержания «голодных» инсулина и глюкозы.

**Определение активности АСТ и АЛТ сыворотки крови и триглицеридов печени** проводили с помощью наборов фирмы «LaChema» (Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. **Измерение уровня инсулина сыворотки крови** осуществляли радиоиммунным методом набором «РИО-инсулин-ПГ- $J^{125}$ » (ИБОХ НАН Беларуси). **Содержание лептина, адипонектина и фактора роста опухолей альфа(TNF $\alpha$ )** было проведено иммуноферментным методом (ELISA) с использованием наборов фирмы «BioCat» (Германия). **Концентрацию глюкозы крови** измеряли глюкометром «Companion-2» (США) энзиматическим методом. **Содержание ТБК-позитивных веществ и восстановленного глутатиона (GSH)** определяли в печени крыс спектрофотометрически. **Индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR)** рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{Концентрация инсулина, пмоль/л} \times \text{Концентрация глюкозы, мкмоль/л}}{405}$$

**Статистическая обработка** проводилась методами непараметрического анализа по программе ANOVA.

**Результаты.** Вес животных, существенно повысившийся после скормливания ВЖД, снижался под влиянием экстракта шелкопряда. Скармливание ВЖД крысам активировало АСТ и АЛТ сыворотки, повышало содержание триглицеридов печени, а применение экстракта шелкопряда существенно не влияло на эти показатели. Содержание инсулина сыворотки крови достоверно повышалось после скармливания диеты. Введение экстракта шелкопряда снижало этот показатель. Динамика глюкозы на протяжении всего эксперимента характеризовалась значительным повышением её концентрации у крыс, поедавших ВЖД. Введение экстракта шелкопряда привело к снижению динамики и конечного уровня глюкозы в крови.

Для интегральной оценки инсулиновой резистентности нами использовался параметр НОМА-IR. Этот показатель постепенно повышался по мере длительности скармливания ВЖД, достигнув более, чем двукратного увеличения к 3 месяцам опыта. Экстракт шелкопряда уменьшал толерантность животных к глюкозе, снижая этот показатель. Скармливание ВЖД резко повышало уровень TNF $\alpha$  и снижало содержание лептина сыворотки, не влияя при этом на сывороточную концентрацию адипонектина. Экстракт шелкопряда существенно не влиял на содержание TNF $\alpha$  и адипокинов, свидетельствуя как об отсутствии противовоспалительного потенциала у исследуемого препарата, так и о недостаточном влиянии на систему адипокинов, регулирующую процесс накопления липидов в печени. Скармливание ВЖД вызывало проявления окислительного стресса, характеризующиеся повышением содержания ТБК-реагирующих субстанций и падением уровня восстановленного глутатиона в печени. Экстракт шелкопряда снижал ТБК-реагирующие субстанции печени до контрольного уровня и достоверно повышал уровень восстановленного глутатиона печени.

**Заключение.** Экстракт куколок китайского дубового шелкопряда обладает эффектом, снижающим проявления метаболического синдрома, а именно: достоверно уменьшает массу тела, нормализует уровень глюкозы крови, уменьшает содержание инсулина сыворотки крови, снижает индекс инсулиновой резистентности, не влияя, однако, на развитие неалкогольного стеатогепатита. Кроме того, экстракт куколок китайского дубового шелкопряда проявляет выраженные антиоксидантные свойства.



## EFFECT OF WATER EXTRACT FROM PUPAE OF CHINESE OAKEN SILKWORM ON METABOLIC SYNDROME IN RATS

Lukivskaya<sup>1</sup> O., Naruta<sup>1</sup> E., Chirkin<sup>2</sup> A., Balaeva-Tikhomirova<sup>2</sup> O., Buko<sup>1</sup> V.

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology and Biochemistry, Division of Biochemical Pharmacology, Grodno, Belarus,

<sup>2</sup>Masherov State University, Department of Chemistry, Vitebsk, Belarus

e-mail: buko@biochem.unibel.by; vu.buko@tut.by

**Aims.** We studied the effects of water extract from pupae of silkworm (EPS) *Antheraea pernyi* on insulin resistance and other signs of metabolic syndrome in rats fed on high-fat diet (HFD).

**Methods.** Female Wistar rats, (220-240 g) fed on the Lieber-DeCarli HFD (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Germany) where the base diet was supplemented with maize oil (40 g per 1 kg of diet). One of HFD-fed group was treated intragastrically with EPS (7 µg of free amino acids/100 g b.w.) during last month of the trial. Rats were killed after 18 h fasting to measure insulin and glucose concentrations.

Serum AST and ALT activities and liver triglyceride content were measured using LaChema kits (Czech Republic) according to the manufacturer instruction. Serum insulin was determined by radioimmune techniques with kits RIO-insulin-PG- J<sup>125</sup> (Belarus). Contents of leptin, adiponectin and tumor necrosis factor alpha (TNFα) were measured by ELISA techniques with kits from Bio-Cat (Germany). Blood glucose concentration was determined enzymatically with Compagnion-2 glucometer (USA). Thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) and reduced glutathione (GSH) contents in the liver were measured spectrophotometrically. Insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated as follows:

$$\frac{\text{Insulin concentration, pmol/l} \times \text{Glucose concentration, } \mu\text{mol/l}}{405}$$

Statistical analysis was performed using nonparametrical ANOVA test.

**Results.** Body weight which was significantly increased in the HFD-fed rats, lowered after the EPS administration. The feeding of HFD activated serum AST and ALT activities and raised triglyceride content in the liver. The EPS treatment did not significantly affect these parameters. Serum insulin concentration increased in HFD-fed rats whereas the EPS administration decreased it. Blood glucose dynamics characterized by significant elevation its concentration during all the period of the trial. Glucose dynamics and the end concentration lowered in rats receiving EPS. HOMA-IR was used for an integral evaluation of insulin resistance. This parameter slowly increased during the feeding of HFD and increased 2-fold at the end of the trial. EPS decreased tolerance of rats to glucose decreasing this parameter.

The feeding on HFD dramatically elevated serum TNFα content and decreased leptin concentration, whereas serum adiponectin content was not changed. EPS did not affect serum cytokine/adipokines concentrations suggesting an absence of anti-inflammatory potential as well as effects on adipokines regulating lipid accumulation in the liver. The HFD feeding induced oxidative stress which characterized by liver TBARS elevation and GSH depletion. EPS acts as an antioxidant normalizing liver TBARS content and decreasing GSH concentration.

**Conclusion.** EPS reduced signs of metabolic syndrome, namely significantly decreased body weight and corrected insulin resistance. Additionally, EPS develops antioxidative properties. However, EPS did not affect inflammation and lipid accumulation in the liver.





## ВПЛИВ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ ТА ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

*Линчак О.В., Яблонська С.В., Філінська О.М., Харчук І.В., Островська Г.В., Рибальченко В.К.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: lynchak@mail.ru

Печінка є першим бар'єром на шляху речовин екзогенного походження, та основним органом детоксикації. Показано, що хлорид кобальту викликає оксидативний стрес, який виникає при багатьох розповсюджених патологіях, в тому числі раку. Перспективним у лікуванні раку є похідне малеїміду - 1-(4-Cl-бензил)-3-хлоро-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі MI-1), що має виражену цитостатичну активність по відношенню до культур трансформованих клітин. Метою нашої роботи стало вивчення можливості зниження пошкоджуючого впливу хлориду кобальту на морфо-функціональний стан печінки за допомогою MI-1.

Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях масою 180-200 г. Тварини протягом 10 днів отримували перорально MI-1 у дозі 5 мг/кг розчинений в соняшниковій олії та внутрішньочеревинно хлорид кобальту (CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O) в дозі 15 мг/кг маси тіла розчинений у фізіологічному розчині. Тварин було поділено на чотири групи: 1 – контрольна, яким вводили олію та фізіологічний розчин; 2 – MI-1 та фізіологічний розчин; 3 - хлорид кобальту та олію; 4 – MI-1 та хлорид кобальту. Шматочки печінки фіксували у суміші Буена, заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном з дофарбуванням еозином. Стан печінки визначали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних даних. У печінці вимірювали площі поперечного перетину гепатоцитів та їх ядер у централобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерія Стьюдента.

Під впливом хлориду кобальту печінка щурів зазнає значних структурних та функціональних змін. Є ознаки запальних процесів у печінці. Гепатоцити зберігають нормальну округло-полігональну форму, проте цитоплазма значної частини клітин вакуолізована, спостерігається навколо мембранна еозинофілія. У централобулярній зоні ядра деяких гепатоцитів мають змінену форму. Спостерігається велика кількість некротичних ядер в обох зонах печінкової часточки. Площі поперечного перетину гепатоцитів та їх ядер централобулярній і перипортальній зон печінкової часточки зменшуються. Відбуваються істотні зміни у мікроциркуляторному руслі печінки.

Під впливом MI-1 не відбувається значних структурних змін в печінці. Гепатоцити мають нормальну форму, чітко окреслені, містять ядра округлої форми. Зернистість цитоплазми дещо збільшується. Площі поперечного перетину гепатоцитів обох зон печінкової часточки мають тенденцію до зменшення відносно контролю та достовірно більші за показники при дії хлориду кобальту. Площі поперечного перетину ядер гепатоцитів мають тенденцію до збільшення відносно контролю як у централобулярній, так і у перипортальній зонах, і є достовірно більшими, ніж при дії хлориду кобальту.

Дія хлориду кобальту в поєднанні з MI-1 не викликає значних деструктивних змін у печінці щурів. У деяких щурів цитоплазма частини клітин вакуолізована. Гепатоцити та їх ядра зберігають нормальну форму, навколосмембранна еозинофілія спостерігається лише у поодиноких випадках. Значно зменшується кількість некротичних ядер в клітинах обох зон печінкової часточки порівняно з дією одного хлориду кобальту. Площі поперечного перетину гепатоцитів як централобулярної, так і перипортальної зон достовірно зменшуються відносно контролю, водночас ці показники є достовірно вищими, ніж при дії одного хлориду кобальту. Площі ядер клітин обох зон печінкової часточки близькі до контролю. Немає істотних змін мікроциркуляторного русла.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що похідне малеїміду частково попереджає пошкоджуючий вплив хлориду кобальту на морфо-функціональний стан печінки щурів, зокрема зменшує кількість пошкоджених гепатоцитів, сприяє збереженню розмірів та форми клітин та їх ядер, захищає мікроциркуляторне русло печінки.



**THE INFLUENCE OF COBALT CHLORIDE AND MALEIMIDE DERIVATE ON THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE RAT LIVER**

*Lynchak O., Yablonska S., Filinska O., Kharchyk I., Ostrovska G., Rybalchenko V.*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: lynchak@mail.ru

The liver is the first barrier for exogenous agents and the main detoxication organ. The cobalt chloride causes oxidative stress, that is the base of different frequent pathologies, including cancer. The perspective trend in the cancer treatment is 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione (MI-1). It causes cell growth suppression in cultures of transformed cells. The goal of our investigation is to study the possibility of the maleimide derivate to decrease the cobalt chloride injurious influence on the morpho-functional state of the rat liver.

24 male white rats weighing between 180 and 250 g were used. During 10 days rats received an oral injection of MI-1 (5 mg/kg) dissolved in sunflower oil and a subcutaneous injection of cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 15 mg/kg) dissolved in saline. Animals were randomly assigned to four groups: 1 – control, that received oil and saline; 2 – MI-1 and saline; 3 – oil and cobalt chloride; 4 – MI-1 and cobalt chloride. Liver samples was placed in Bouin's fluid, than embedded in paraffin. Slices (5- to 7- $\mu$  m) were stained with hematoxylin and eosin. The state of the liver was determinated by the visual analisis of slices and morphometric data. There were measured cross-section area of hepatocytes and their nuclear in centrolobular and periportal zone of lobules of liver. Data analyses were made by standard methods of variational statistics, using Student's t-criteria.

There are significant structural and functional changes in rat liver under the cobalt chloride influence. Inflammatory proseses take place in the liver. Hepatocytes have normal configuration, but cytoplasm of considerable quantity of cells are vacuolated, the perimembrane eosinophilia take place. In the centrolobular zone nuclei of some hepatosites have changed form. There are many necrotic cells in both zones. In the centrolobular and periportal zones hepatocytes and nuclei areas are increased. There are significant changes in liver microcirculation.

There are no significant structural changes in the liver under the MI-1 influence. Hepatocytes have normal form, clear outlined, and orbicular nuclei. Cytoplasmic granularity is slightly increased. Cross-section area of hepatocytes of both zones of liver lobules have tendency to decrease relative to control and increase relative to cobalt chloride influence. Areas of centrolobular and periportal hepatocytes' nuclei have tendency to increase relative to control and decrease relative to cobalt chloride influence.

Combined introduction of cobalt chloride and MI-1 doesn't provoke destructive changes in rat liver. Partial cells of some rats have vacuolated cytoplasm. Hepatocytes and their nuclei maintain normal form, the perimembrane eosinophilia take place in solitary causes. The number of necrotic nuclei are considerably reduced in both zones of liver lobule as compared with cobalt chloride influence alone. Cross-section area of hepatocytes of centrolobular and periportal liver lobules decrease relative to control and increase relative to cobalt chloride influence. Cross-section area of hepatocytes' nuclei of both zones of liver lobules are closed to control. There are no significant changes in liver microcirculation.

Data analysis shows that maleimide derivate partly decrease the cobalt chloride injurious influence on the morpho-functional state of the rat liver, especially reduce number of damaging hepatocytes, promotes maintaining of normal dimension and form of cells and their nuclei, protects liver microcirculation.



## **ДЕЙСТВИЕ ЦЕРЕБРАЛА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ИНСУЛЬТЕ НА УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

*Макаренко А.Н., Святецкая В.Н., Кульчигов А.Е., Савосько С.И., Моложавая О.С., Позур В.К.*

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
e-mail: omolozhavaya@ukr.net

Многочисленные заболевания сопровождаются образованием и персистенцией растворимых иммунных комплексов антиген-антитело. Одним из побочных эффектов при геморрагическом инсульте также является повышенный уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови больных. В этой связи, поиск поликомпонентных лекарственных средств, которые кроме ноотропного действия, обладают иммуномодулирующими эффектами, в том числе влияя на уровень ЦИК, представляет собой одно из важных направлений доклинических исследований. Ранее нами с использованием модели экспериментального геморрагического инсульта было показано высокую терапевтическую эффективность в качестве ноотропного средства для лечения этой патологии у животных – “церебрала”. Этот агент является вытяжкой из неокортекса свиньи после успешно перенесенного экспериментального инсульта. Влияние “церебрала” на уровень ЦИК в сыворотке крови экспериментальных животных проводили в сравнении с препаратом церебролизин (Ebewe, Австрия). Исследования уровня ЦИК при аутогеморрагическом инсульте проводили на следующих группах животных: контроль, ложнооперированные, инсульт+плацебо, инсульт+церебролизин, инсульт+церебрал. Иммунопреципитация ЦИК проводили с использованием различных концентраций препарата. Было выявлено, что церебрал, также как и его аналог по ноотропному действию церебролизин, снижает уровень ЦИК в сыворотке крови после терапии животных этими агентами. Особенно выраженный эффект зафиксировали для ЦИК со средней молекулярной массой (снижение уровня почти в 3 раза в сравнении с группой плацебо и группой животных без терапии). Таким образом, церебрал, кроме терапевтического эффекта в качестве трофинотропного вещества, проявляет позитивное действие как агент снижающий уровень ЦИК в крови животных с индуцированным экспериментальным инсультом.



**THE INFLUENCE OF THE CEREBRAL UNDER INDUCIBLE STROKE ON THE LEVEL CIRCULATORY IMMUNE COMPLEXES IN THE SERUM OF BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS**

*Makarenko A.N., Svjatezkaja V.N., Kulchikov A.E., Savosko S.I., Molozhavaya O.S., Pozur V.K.*

Taras Schevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine.  
e-mail: Omolozhavaya@ukr.net

The numerous of diseases are accompanied by formation and persistation soluble immune complexes the antigen-antibody. One of side effects at a hemorrhagic stroke also was the increased level of circulatory immune complexes (CIC) in the serum of blood of patients. In this communication, search of polycomponents medications which except for nootropic effect, possess immunomodulating effects, including affecting on the CIC level, is one of important directions of preclinical researches. We were before shown high therapeutic efficiency as a nootropic mean for medical treatment of this pathology at animals cerebral on experimental hemorrhagic stroke model. This agent is extract of pigs neocortex from animals with successfully carried experimental stroke. Influence of cerebral on the CIC level in the serum of blood of experimental animals conducted by comparison to drug cerebrolysin (Ebewe, Austria). Researches of the CIC level at an autohemorrhagic stroke were conducted on the following groups: control, shamoperated, stroke+placebo, stroke+cerebrolysin, stroke+cerebral. Conducted immunoprecipitation CIC with using different concentrations of drug. It was exposed, that cerebral, as well as his analogue on nootropic action lowers the CIC level in the blood serum after therapy of animals by these agents. The especially expressed effect was fixed for CIC with middle molecular mass (decreased of level almost in 3 times by comparison to the group of placebo and group of animals without therapy). Thus, cerebral, except for a therapeutic effect as a trofinotropic matter, shows positive action as an agent witch lowering level of CIC in the blood of animals with an inducible experimental stroke.



## СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ АЛКАНДИОЛОВ – УСИЛИТЕЛИ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

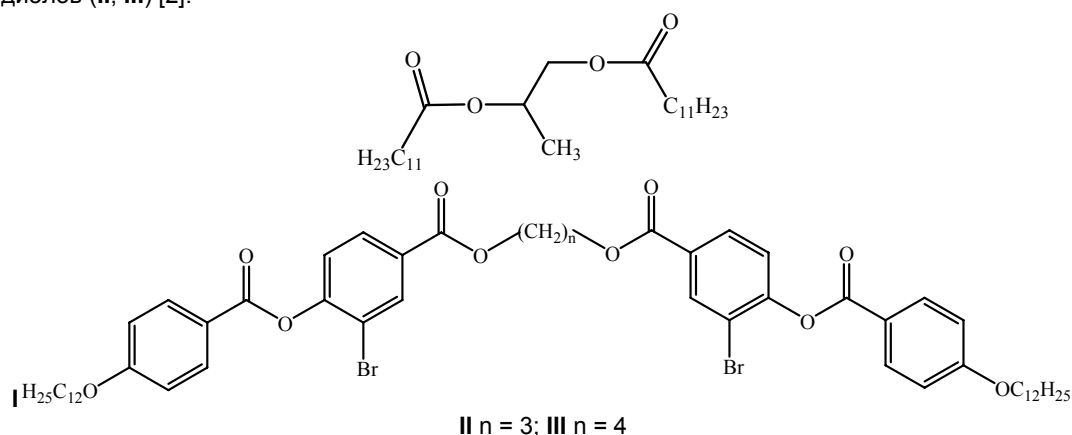
<sup>1</sup>Максименко С.И., <sup>1</sup>Новикова Н.С., <sup>2</sup>Бойко Ю. А., <sup>2</sup>Кравченко И.А.

<sup>1</sup>Физико-химический институт им. А.В.Богатского НАН Украины, Одесса, Украина  
e-mail: physchem@paco.odessa.ua; maksxx@rambler.ru

<sup>2</sup>Одесский национальный университет, Одесса, Украина  
e-mail: yuriyalex@mail.ru

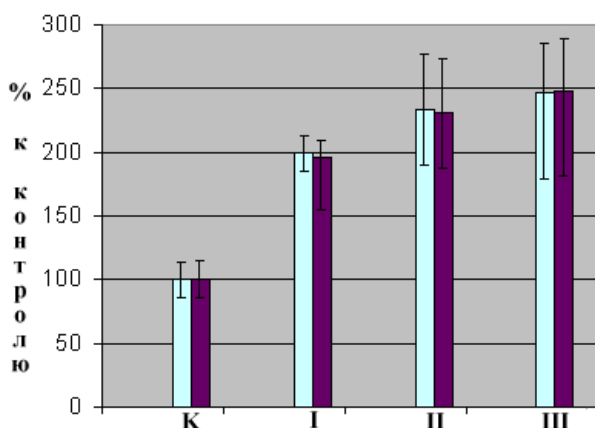
Проблема создания трансдермальных лекарственных форм производных 1,4-бенздиазепина, является актуальной, учитывая увеличение числа неврологических и психических заболеваний. Известно, что 1,2-пропиленгликоль и лауриновая кислота являются эффективными усилителями проницаемости для производных 1,4-бенздиазепина [1].

В настоящей работе впервые исследовались в качестве усилителей трансдермальной проницаемости 7-бром-5'(орто-хлор)фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она сложные эфиры алкандиолов – дилаурат 1,2-пропандиола (I) и так называемые «сдвоенные мезогены» - сложные эфиры 1,3-пропан и 1,4-бутандиолов (II, III) [2].



1,3-бис[4-(4-Додецилоксибензоилокси)-3-бромбензоилокси]пропан (II) не проявляет мезоморфных свойств, а 1,4-бис[4-(4-додецилоксибензоилокси)-3-бромбензоилокси]бутан (III) обладает нематическим мезоморфизмом.

Согласно полученным данным, наиболее существенное влияние на степень проникновения 7-бром-5'(орто-хлор) фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она оказывают «сдвоенные мезогены» (II, III), причем увеличение длины центрального фрагмента не влияет на величину противосудорожного эффекта.



**Рис.** Величины противосудорожного эффекта трансдермальной формы 7-бром-5'(орто-хлор) фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она исследованных эфиров алкандиолов.

### Литература:

- Кравченко И.А., Андронати С.А., Ларионов В.Б. Физико-химические основы усиления трансдермального введения лекарственных препаратов. Одесса. – Астропринт. – 2002.
- Максименко С.И., Новикова Н.С., Кондратьева Р.В., Кузьмин В.Е., Огниченко Л.Н., Яркова М.Ю.
- Журн. орган. химии. - 2007. - Т. 43, вып. 12. - С.1772 – 1779.



ALKANDIOLS ESTERS - AMPLIFIERS OF THE TRANSDERMAL PERMEABILITY

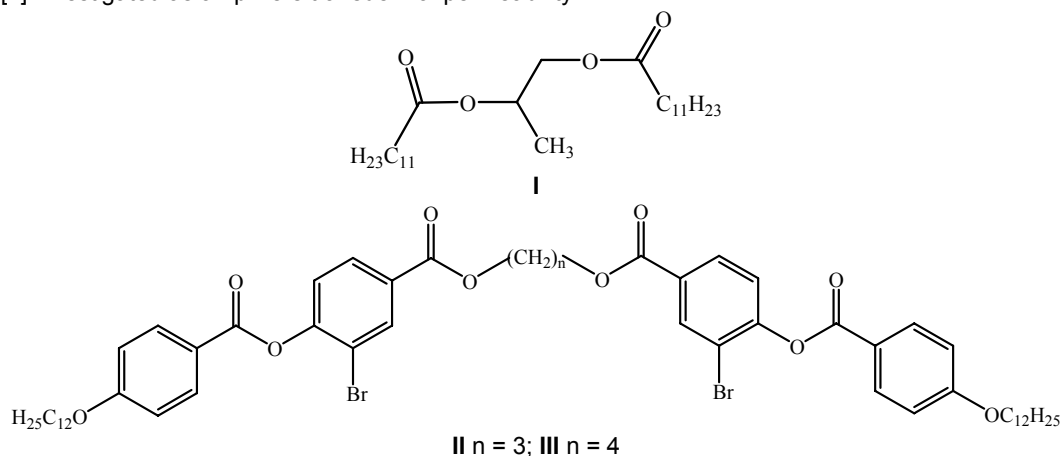
<sup>1</sup>Maksimenko S.I., <sup>1</sup>Novikova N.S., <sup>2</sup>Boiko Yu.A., <sup>2</sup>Kravchenko I. A.

<sup>1</sup>Physico-Chemical Institute by A.V.Bogatskiy name of the National Academy of sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine  
e-mail: physchem@paco.odessa.ua; makssx@rambler.ru

<sup>2</sup>The Odessa national university, Odessa, Ukraine  
e-mail: yuriyalex@mail.ru

The problem of the transdermal medicinal forms creation of 1,4-benzodiazepine derivatives is actual, considering increase the number of neurologic and mental diseases. It is known, that 1,2-propilenglikol and laurate acid are effective amplifiers of permeability for 1,4-benzodiazepine derivatives [1].

In the present work 7-bromine-5'(ortho-chlorine)phenil-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one esters alkandioles - dilaurate 1,2-propandiol (**I**) and so-called «dual mesogens» - esters 1,3-propan and 1,4-butanediols (**II**, **III**) [2] investigated as amplifiers transdermal permeability.



1,3-bis[4-(4-Dodeciloxybenzoiloxy)-3-brombenzoiloxy]propan (**II**) has not form the mesomorphic properties, and 1,4-bis[4-(4-dodeciloxybenzoiloxy)-3-brombenzoiloxy] butane (**III**) possesses the nematic mesomorphism..

According to the received data, the most essential influence on the 7-bromine-5'(ortho-chlorine)phenil-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one degree of penetration the «dual mesogens» (**II**, **III**) exert, and the increase of the length of the central fragment does not influence on size of the anticonvulsive effect.

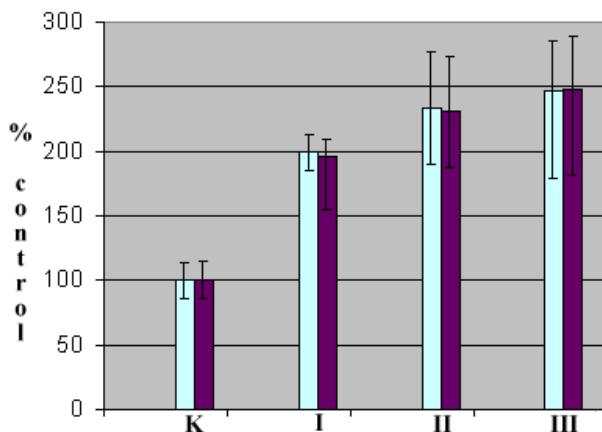


Fig. Sizes of transdermal forms anticonvulsive effect of prepared esters alkandioles 7-bromine-5'(ortho-chlorine)phenil-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one.

References:

1. Kravchenko I.A., Andronati S.A., Larionov V.B. Fiziko-himicheskie osnovi ysileniya transdermalnogo vvedeniya lekarstvennih preparatov.Odessa. – Astroprint. – 2002.
2. Maksimenko S.I., Novikova N.S., Kondratyeva R.V., Kyzmin V.E., Ognichenko L.N., Yarkova M.Yu. Russian journal of organic chemistry - 2007. - Vol. 43, № 12. - P.1772 – 1779.



## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНА НА ПОВЕДЕНИЕ ЛАКТИРУЮЩИХ САМОК *MUS MUSCULUS*.

Марков А.Г., Д. А. Честных, Виноградова Е.П.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.  
e-mail: katvinog@yahoo.com

Одним из важнейших этапов развития человека и животных является процесс рождения и воспитания потомства. При этом лактационная (материнская) мотивация у млекопитающих играет роль необходимого фактора для выживания и развития детёнышей. Её возникновение и поддержание после родов контролируется эндокринными и нейрогенными механизмами, как врожденными, так и приобретёнными (1). Изучение лактационного поведения позволяют выделить несколько основных компонентов, которые можно обозначить как «забота о потомстве», «вскармливание потомства», «кормление потомства» (1), которые могут быть подвержены модификации факторами внешней среды, в том числе и фармакологическими препаратами. В медицине в практике родовспоможения в настоящее время широко используются препараты простагландинов, которые, проходя через гематоэнцефалический барьер, могут оказывать воздействия на функции ЦНС. В связи с этим встает вопрос об изучении их влияния на физиологические показатели кормления, и на поведение в период выкармливания. Целью данной работы явилось изучение влияния простагландина F2альфа на реализацию лактационного поведения и уровень тревожности в модельных экспериментах на самках белых мышей.

Работу проводили на лактирующих самках белых мышей (n=19). Мышам первой группы (Г1) ежедневно со 2-3 дня лактации сублингвально вводили препарат «Ксалатан», содержащий простагландин F2альфа, животным второй (Г2) группы раствор NaCl (0,9%). Третья группа была контрольной. Исследование лактационного поведения начинали с 10-12 дня после рождения потомства. В течение 3-х дней по 3 часа фиксировались характеристики кормления и активность самок в гнезде. Было показано, что у самок Г1 (по сравнению с Г2) наблюдалась большая продолжительность и количество актов кормлений, эти показатели были постоянными в течение 3-х дней. На основании оценки таких показателей кормления, как интервал между реакцией выведения молока (РВМ) и количеством РВМ было установлено, что интенсивность кормления у самок группы Г1 была выше по сравнению с Г2, что проявлялось в росте числа РВМ и уменьшения интервалов между рефлексом. Эти данные свидетельствуют об усилении лактационной мотивации у самок, получавших простагландин по сравнению с самками группы Г2. Количество актов груминга было одинаковое, но продолжительность отдельных актов ниже у Г1, что свидетельствует об увеличении доли смещенного поведения в групп Г2, что является показателем стрессорной реакции. Для более детальной оценки уровня тревожности кормящих самок на 13-15 дни лактации был использован тест «приподнятый крестообразный лабиринт». На основании этого теста был выявлен сниженный уровень тревожности и смещенной активности у животных этой же группы по сравнению с Г2. Сама процедура введения препаратов оказывает стрессорное воздействие на животных, тем не менее, самки, получавшие простагландин, демонстрировали менее выраженную стрессорную реакцию, что сказывалось на их поведении в гнезде и уровне тревожности. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что простагландин F2альфа влияет на материнское поведение лактирующих самок, потенцируя лактационную доминанту и динамику кормления.

### Литература:

1. Марков А.Г. Изучение продолжительности кормлений и перерывов между ними у мышей в период установившейся лактации - Физиол. журн. СССР, 1991., Т.77. №8. С. 142-148.



## **PROSTAGLANDIN FA MODIFIED MATERNAL BEHAVIOR IN LACTATING FEMALE MICE *MUS MUSCULUS*.**

*Markov A.G., Chesnich D.A, Vinogradova E.P.*

St-Petersburg State University, biological faculty, St-Petersburg, Russia  
e-mail: katvinog@yahoo.com

One of the major stages of development of man and animals is a process of birth and education of posterity. Thus lactation (maternal) motivation for mammals acts part necessary factor for a survival and development of pups. Its origin and maintenance after births is controlled endocrine and neuronal mechanisms, both innate and influences of environment. A few basic components which can be designated as a «anxiety about posterity», «rearing of posterity», «feeding is posterities» allow to select the study of lactation conduct, (1), which can be subject to modification the factors of external environment, including pharmacological preparations. In medicine in practice of acceptance of births prostaglandins are widely used presently, which, passing through a blood-brain barrier, can render influences on the function of CNS. So a question gets up about the study of their influence on the physiological descriptions of feeding, and on a conduct in the period of rearing. The purpose of this work was a study of influence of prostaglandin of F2 $\alpha$  on realization of lactation behavior and anxiety in model experiments on the females of white mice. The study provide on lactating female white mice (n=19). The animals were divided on 3 groups. The mice (from 2-3days of lactation) of first group sublingual received «Xalatan», including prostaglandin F2 $\alpha$  (G1), in second group solution of NaCl (0,9%) (G2). The third group was control. (G3). Lactation behaviors observed from 10–12 of postpartum. During 3 days the actions of female in the nest and parameters of lactation was observed during 3 hours. To determine the anxiety and locomotion on 13-15 days of lactation the elevated plus maze was used. In female of G1 the increase of number and duration of feeding were observed, it doesn't change during 3 days. On the basis of estimation of such indexes of feeding, as an interval between the milk ejection reflex (MER) and amount of MER was set that intensity of feeding for the females of group of G1 was higher as compared to G2, which showed up in growth of number of RVM and diminishing of intervals between reflexes. These data testify to strengthening of lactation motivation for females, getting prostaglandin as compared to the females of group of G2. The number of grooming was equal, but grooming duration was higher in G2, that demonstrated more expressed behavior stress reaction in groups G2. For more detailed estimation of anxiety of feedings females on 13-15 days of lactation a test was used the «elevated plus-maze». On the basis of this test the lower level of anxiety and grooming was exposed for the rats of the same group as compared to G2. Procedure of introduction of prostaglandin induced stress in animals, nevertheless, females, getting prostaglandin, demonstrated the less expressed stress reaction, which influence on their behavior in a nest and anxiety.

So it is possible to conclude that prostaglandin of F2 $\alpha$  influences on the maternal behavior of lactating females, increasing a dominant of lactation and dynamics of feeding.

### **References:**

1. Марков А.Г. Изучение продолжительности кормлений и перерывов между ними у мышей в период установившейся лактации - Физиол. журн. СССР им. И.М.Сеченова, 1991., Т.77. №8. С. 142-148.





## ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКИХ ЧАСТОТ МОДУЛИРУЮТ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВ

*Мартынюк В.С.<sup>1</sup>, Темурьянц Н.А.<sup>2</sup>, Цейслер Ю.В.<sup>3</sup>, Лукьяненко И.В.<sup>1</sup>, Собко В.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,  
e-mail: mavis@science-center.net

<sup>2</sup> Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина

<sup>3</sup> Международный открытый университет развития человека «Украина», Киев, Украина

Анализ литературных данных показывает, что электромагнитные поля крайне низких частот в определенных экспериментальных условиях могут снижать или модулировать активность природных регуляторных веществ, таких, например, как мелатонин, витамина А, гликозидов и др., а также некоторых фармакологических препаратов, в частности тамоксифена, используемого в терапии раковых заболеваний, и других биоактивных веществ.

В наших исследованиях показано, что действие магнитных полей крайненизких частот отменяет ингибирующее действие хромогликата натрия на функциональную активность тучных клеток и модулирует их ответ на активирующее влияние ионов кальция и морфина, что свидетельствует о модулирующем влиянии данного фактора на процессы внутриклеточной сигнализации. Одним из возможных механизмов такого влияния может быть непосредственное влияние  $Ca^{2+}$ -зависимые пути внутриклеточной регуляции, что широко обсуждается научной общественностью. Нами также показано, что альтернативным путем влияния низкочастотных магнитных полей на систему внутриклеточной регуляции может быть связано с изменением лигандирования регуляторных веществ с белками. Такое влияние надежно проявляется в моделях связывания низкомолекулярных веществ неполярной и амфифильной природы с белками. Одновременно с этим, нельзя исключить влияние магнитных полей на свободнорадикальные процессы, которые регулируются про- и антиоксидантной системой клеток.



**EXTREMELY LOW FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELDS MODULATE THE ACTIVITY  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

*Martynyuk V.S.<sup>1</sup>, Temuryants N.A.<sup>2</sup>, Tseyslyer Yu.V.<sup>3</sup>, Lukyanenko I.V.<sup>1</sup>, Sobko V.M.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, e-mail: mavis@science-center.net

<sup>2</sup>V.I.Vernadsky National University, Simferopol, Ukraine

<sup>3</sup>International Open University of Human Development "Ukraina", Kyiv, Ukraine

The analysis of data shows that the extremely low frequency electromagnetic fields(ELF MF) in certain experimental conditions can reduce or modulate activity of natural regulator substances, such, for example, as melatonin, vitamin A, glycosides and other, and also some pharmacological substances that use in therapy of cancer diseases, in particular tamoxifenum, and other bioactive matters.

The abolishing of the inhibitory effects of sodium chromoglicate on functional activity of mast cells and modulates their response to activating influence of ions of calcium and morphine was revealed in our researches. These facts testify to modulating influence of this electromagnetic factor on the processes of cell signaling. One of the possible mechanisms of such influence can be connected with Ca<sup>2+</sup>-depended pathways of cell signaling that widely discussed in scientific community. Nevertheless, our researches show that changes of liganding of regulator compounds with proteins can be alternative way of influence ELF MF on cell signaling pathways. Such influence can be revealed in the investigations using models of binding low molecular hydrophobic and amphipatic compounds with proteins. At the same time, it is impossible to eliminate influence of ELF MF on free-radical processes that are controlled by pro- and by the antioxidant system of cells.



## ДАЛЬНЕ-КРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК ДЛЯ СКРИНИНГА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Морозова Е.С.<sup>1,2</sup>, Верхуша В.В.<sup>2</sup>, Перский Е.Э.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра биохимии, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина,

<sup>2</sup> Кафедра анатомии и структурной биологии, Медицинский колледж им. А.Эйнштейна, Нью-Йорк, США  
e-mail: kmorozova@rambler.ru

Генетически кодируемые флуоресцентные белки широко используются в качестве тест-систем на биологически активные вещества и процессы, протекающие в животных клетках. Они позволяют детектировать ферментативную активность, концентрацию вторичных мессенджеров, активацию и ингибирование промоторов, а также внутриклеточную транслокацию белковых конструкций слияния с флуоресцентными белками.

В настоящее время спектральный диапазон таких флуоресцентных белков находится в пределах от 445 нм (синяя флуоресценция) до 635 нм (красная флуоресценция). Физические характеристики оптических фильтров и источников света, применяемых для детекции в флуоресцентной микроскопии, позволяют одновременно спектрально различать не более четырёх флуоресцентных белков в указанном диапазоне. Дальнейшее развитие методов детекции требует расширения спектрального диапазона тест-систем. Поскольку автофлуоресценция и светорассеивание в клетках уменьшаются с увеличением длины волны, крайне востребованной является разработка белков с флуоресценцией в дальней красной области спектра.

В качестве исходного материала для разработки вариантов таких белков нами был взят белок mKate, обладающий одной из самых ярких и сдвинутых в красную область флуоресценцией, с пиками возбуждения и эмиссии, равными 588 нм и 635 нм, соответственно. Ген mKate был подвергнут сайт-специфическому мутагенезу с использованием вырожденных праймеров и дальнейшему случайному мутагенезу с применением ПЦР. Из различных вариантов белка, возникших в результате молекулярной эволюции был выделен мутант, названный RFP660, с пиками возбуждения на 615 нм и флуоресценции на 660 нм. Это на 25-27 нм превышает таковые для mKate. RFP660 не имеет внешних мутаций, следовательно, сохраняет мономерное состояние, как и исходный mKate. Рекомбинантный очищенный RFP660 обладает рН-стабильностью с наблюдаемой величиной  $pK_a$  равной 5,5. Коэффициент поглощения для RFP660 равен  $21000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , и квантовый выход белка 0,09.

Плазмиды, экспрессирующие mKate и RFP660 в различных белковых конструкциях слияния были одновременно трансфецированы в клетки линии HeLa. Микроскопию живых клеток проводили на третьи сутки после начала экспрессии. mKate и RFP660 конструкции нормально встраивались в эндогенные цитоскелетные структуры клетки. Соответствующие структуры чётко отличались в красном (HQ615/30) и дальне-красном (640LP) фильтрах флуоресценции.

Смесь клеток, меченных mKate или RFP660 с цитоплазматической экспрессией, сканировали на цитофлуориметре BD FACSAria, используя лазеры с длинами волн 561 нм и 635 нм для возбуждения, а также фильтры 590/20 нм и 670/30 нм для детекции флуоресценции. Клетки с mKate отчётливо детектировались в канале 561 нм лазера, тогда как клетки с RFP660 не отличались от уровня шума. В канале 635 нм лазера детектировалась флуоресценция клеток с RFP660, а флуоресценция mKate была незначительной.

Таким образом, белок RFP660, добавляя новый дальне-красный цвет, существенно расширяет возможности тест-систем, используемых в микроскопических и цитофлуориметрических исследованиях. А это, в свою очередь, позволит детектировать больше клеточных параметров, на которые могут влиять биологически активные вещества, и осуществлять их независимый скрининг.



## FAR-RED FLUORESCENT PROTEIN TO SCREEN FOR BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN CELL CULTURES

*Morozova K.S.<sup>1,2</sup>, Verkhusha V.V.<sup>2</sup>, Perskyi Ye.E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine,

<sup>2</sup>Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA

e-mail: kmorozova@rambler.ru

Genetically encoded fluorescent proteins are widely used in test-systems for biologically active substances. The test-systems provide detection of the following biological processes in mammalian cells: enzymatic activity, concentration of secondary messengers, activation and inhibition of promoters, as well as intracellular translocation of protein fusion constructs with fluorescent proteins.

Currently, a spectral range of the fluorescent proteins used in the test-systems spreads from 445 nm (blue fluorescence) till 635 nm (red fluorescence). The physical characteristics of optical filters and light sources used for detection in fluorescence microscopy permit spectrally distinguish not more than four fluorescent proteins in the indicated region simultaneously. Development of far-red fluorescent proteins is highly desirable because of a requirement for the additional color for test-systems, as well as because of a decrease of the autofluorescence and light-scattering in cells with the increase of the wavelength.

We used a fluorescent protein mKate as a template to design new far-red fluorescent variants. mKate is one of the brightest and the most shifted to the red region proteins with an excitation peak at 588 nm and a fluorescence emission peak at 635 nm. The mKate gene was applied to a site-specific mutagenesis using degenerated primers as well as to a random mutagenesis using error-prone PCR. As the result of the molecular evolution, we have found a mutant, called RFP660, with an excitation peak at 615 nm and a fluorescence emission peak at 660 nm, which 25-27 nm exceed those for mKate. RFP660 does not have any external mutations and, therefore, preserves a monomeric state of the parental mKate. A recombinant purified RFP660 has a pH-stability with an apparent  $pK_a$  value of 5.5. An extinction coefficient of RFP660 is  $21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A quantum yield for RFP660 is 0.09.

Plasmids encoding mKate и RFP660 in different protein fusion constructs were simultaneously transfected into HeLa cultured cells. The live cell microscopy was performed three days after the start of the expression. The mKate и RFP660 constructs normally incorporated and stained the endogenous cytoskeletal cell structures. The mKate and RFP660 structures were clearly distinguishable in the red (HQ615/30) and far-red (640LP) fluorescence emission filters.

A mixture of cells cytoplasmically expressing either mKate or RFP660 was scanned using a BD FACSAria flow cytometer equipped with 561 nm and 635 nm lasers for excitation, and 590/20 nm and 670/30 nm filters for fluorescence emission. The cells expressing mKate were observed with a high-level fluorescence in the channel of the 561 nm laser while the fluorescence of the RFP660 expressing cells in the same channel was at a background level. In the channel of the 635 nm laser, the RFP660 cells exhibited the detectable moderate-level fluorescence. On the other hand, a fluorescence of the mKate cells was very low.

In conclusion, the RFP660 protein will expand possibilities of the test-systems used in microscopy and flow cytometry by adding the new far-red color. That, in turn, will permit to detect more cellular parameters, which can be affected by biologically active substances, as well as to perform their independent screening.



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В КАЧЕСТВЕ МОДУЛЯТОРА УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА В АСЦИТНОЙ ОПУХОЛИ НА ПРИМЕРЕ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ

*Наумов А.А., Шаталин Ю.В., Поцелуева М.М.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
e-mail: exzikutor@rambler.ru

В последнее десятилетие резко увеличился интерес к природным антиоксидантам – флавоноидам, в частности, к дигидрокверцетину (ДГК). В настоящее время ДГК используют в производстве различных косметических препаратов, пищевых добавок и лекарственных средств. Известно, что ДГК является мощным антиоксидантом, эффективно убирающим активные формы кислорода (АФК), что позволяет эффективно использовать его при различных патологиях, связанных с гиперпродукцией АФК. В тоже время, во многих подобных процессах увеличению концентрации АФК сопутствует повышение продукции оксида азота.

В нашем исследовании в качестве модели патологического процесса была использована культура клеток гепатомы Зайделя, трансплантированная в брюшную полость крыс линии Вистар. При развитии клеток данной культуры быстро развивается асцитная опухоль и продолжительность жизни опухоленосителя составляет 10-12 суток. При использовании этой модели легко вести мониторинг различных параметров окислительного стресса в зоне патологии, в том числе отслеживать различные метаболиты оксида азота и продукцию АФК.

Целью работы было изучение изменения содержания нитритов и нитратов (NOx), нитротирозина (маркер на пероксинитрит) в асцитной жидкости при развитии гепатомы Зайделя, а также влияние на них введения ДГК в область патологии.

Было установлено, что в ходе развития гепатомы Зайделя уровень содержания (NOx) в асцитной жидкости незначительно увеличивается на 8-9 сутки (до  $\sim 8 \cdot 10^{-6}$  моль/л). Наряду с этим наблюдается пиковое значение содержания нитротирозина на 7 сутки ( $\sim 7 \cdot 10^{-9}$  моль/л), связанное, как мы предполагаем, с максимальной активностью пероксинитрита. Установлено, что систематические инъекции раствора ДГК в брюшную полость незначительно увеличивает содержание NOx (~2-3%) и снижает уровень нитротирозина, что связано, скорее всего, с антиоксидантными свойствами ДГК и, в частности, с его способностью убирать супероксиданион радикал (пероксинитрит образуется при взаимодействии  $O_2^-$  с NO). В пользу этого предположения говорит и тот факт, что при инъекциях ДГК имеет место выраженное снижение продукции АФК в асцитной жидкости.

*Работа поддержана проектами рособразования согласно тематическому плану ТЗН №1,4,08 и программой РНП грантами №6663 и №6872*



**USE OF DIHYDROQUERCETIN TO MODULATE THE LEVEL OF ACTIVE (REACTIVE) NITROGEN FORMS (SPECIES) IN ASCITES TUMORS BY THE EXAMPLE ZEIDEL HEPATOMA**

*Naumov A.A., Shatalin Yu.V., Potselueva M.M.*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushino, Russia  
e-mail: exzikutor@rambler.ru

In the past decade considerable interest in natural flavonoid antioxidants, dihydroquercetin (DHQ) in particular, has developed. At present DHQ is employed in production of various cosmetic preparations, dietary supplements, and drugs. DHQ is known to be a strong antioxidant that effectively eliminates reactive oxygen species (ROS), which enables its application in the case of pathologies related to ROS hyperproduction. In these processes the increased ROS concentration is usually accompanied by elevated production of nitrogen oxide.

As a model of the pathological process, we used Seidel hepatoma cells transplanted to the abdominal cavity of Vistar rats. The development of this culture yields rapidly an ascite tumor, and the life duration of tumor-bearing rats is 10-12 days. This model permitted us to monitor different parameters of oxidative stress in the pathology zone, specifically, to follow various nitrogen oxide metabolites and ROS production.

The purpose of our work was to follow changes in the nitrite/nitrate contents (NO<sub>x</sub>), nitrotyrosine (marker for peroxynitrite) in the ascites upon development of Zeidel hepatoma, as well as to study the effect of DHQ on these parameters.

It was found that the level of (NO<sub>x</sub>) in the ascitic fluid increased to about  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l by days 8-9 of Zeidel hepatoma development. Concomitantly, a peak value of nitrotyrosine content was observed by day 7 (about  $7 \cdot 10^{-9}$  mol/l), which was presumably connected with the maximum activity of peroxynitrite. It was established that injections of DHQ solution to the abdominal cavity increased slightly the NO<sub>x</sub> level (by about 2-3%) and decreased nitrotyrosine content, which is most probably due to the antioxidant properties of DHQ, inter alia, to its capacity to eliminate the superoxidanion radical (peroxynitrite is formed upon interaction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> with NO). This suggestion is supported by the fact that DHQ injections resulted in a pronounced decrease in ROS production in the ascitic fluid.

*This work was supported by the Projects of "Rosobrazovanie" according to the thematic Plan ESN N 1, 4, 08 and by the RNP Program, Grants N 6663 and N 6872.*



## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ $\omega$ -3 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА

*Николаевич Л.Н., Морозова Е.В., Анисович М.В.*

ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Беларусь  
e-mail: elenamorozova@tut.by

Интерес к  $\omega$ -3 полиненасыщенным жирным кислотам (ПНЖК) резко возрос в начале 80-х годов, когда в результате исследований датских ученых J. Dyerberg и H. Bang [1] было установлено, что крайне низкий уровень сердечно-сосудистых заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь) у жителей Гренландии объясняется потреблением большого количества морских жиров с высоким содержанием  $\omega$ -3 ПНЖК. Авторы обнаружили в плазме крови жителей Гренландии высокую концентрацию эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот при низком содержании линолевой и арахидоновой кислот. В последующем было установлено, что  $\omega$ -3 ПНЖК наряду с гиполипидемическим эффектом оказывают гипокоагуляционное, антиагрегантное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [2]. Однако малоизучены механизмы действия  $\omega$ -3 ПНЖК на геном соматических клеток при старении организма.

Целью исследования явилось изучение влияния полиненасыщенных жирных кислот  $\omega$ -3 (эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот) на пролиферацию и апоптоз клеток различной функциональной специализации при старении организма.

Исследования проведены на крысах (самки) линии WAG/Y молодого (3 мес) и старого (18 мес) возраста (средняя масса 115 г и 252 г соответственно). Пищевую добавку ROPUFA в виде 30% суспензии на кукурузном масле  $\omega$ -3 полиненасыщенных кислот (эйкозапентаеновой 125 мг/г и докозагексаеновой 80 мг/г кислот) (производитель DSM Nutritional Products Ltd. Швейцария) вводили в течение 14 дней с пищей молодым и старым животным в дозах 0,3 г/кг/сутки (общая доза 4,2 г/жив; для человека норма в день 3-4 г); 0,16 г/кг/сутки (общая доза 2,2 г/жив;  $\frac{1}{2}$  суточной дозы для человека); 0,014 г мг/кг/сутки (общая доза 0,2 г/жив, 1г/сут для человека); контроль интактный (обычный рацион питания).

Определение молекулярно-генетических показателей плоидности клеток крови, костного мозга, тимуса, селезенки и печени крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на Cytomics FC 500 (Becton Coulter, USA). На основании плоидности клеток по содержанию ДНК изучены: частота апоптотических клеток и клеток на разных стадиях клеточного цикла, пролиферация.

Результаты исследований сравнивали с помощью непараметрического теста Манна-Уитни (U-критерий). Различия считали значимыми при  $P < 0,05$

Показано, что у молодых животных при дозе 0,3 г/кг/сут  $\omega$ -3 ПНЖК наблюдается увеличение пролиферации клеток печени (на 58%), тимуса (на 71%), селезенки (на 99%), а уровень пролиферации клеток крови, костного мозга не превышает контроль. По мере старения организма, после введения  $\omega$ -3 ПНЖК, пролиферация клеток крови, костного мозга, селезенки, печени не превышает контрольный уровень. Однако у старых животных наблюдается повышение пролиферации тимоцитов на 66% по сравнению с контролем. Наблюдается высокая (в 1,5 раза) пролиферация гепатоцитов, тимоцитов и спленоцитов у старых животных по сравнению с молодыми. Проллиферация клеток крови и костного мозга старых животных не отличается от контрольного уровня.

У молодых животных по мере уменьшения дозы  $\omega$ -3 ПНЖК снижается гибель клеток по механизму апоптоза в селезенке (на 48%), увеличивается в костном мозге (на 30%) и не изменяется в печени и по сравнению с контролем. Низкая частота гибели клеток наблюдается у старых животных в крови (доза 0,16 г/кг/сут), костном мозге (дозы 0,3; 0,16 г/кг/сут), печени (0,3; 0,014 г/кг/сут) по сравнению с высоким уровнем гибели клеток у молодых животных. При дозах 0,3 г/сут и 0,16 г/сут снижается частота гибели клеток в печени и крови у старых животных.

Таким образом, наблюдаемые в клеточных популяциях крови, костного мозга, тимуса, селезенки и печени молекулярно-генетические эффекты носят разнонаправленный характер и зависят от функциональной специализации клеток и возраста организма. Кроме того, снижение апоптоза в крови, костном мозге и печени старых животных по сравнению с молодыми животными свидетельствует о новых свойствах эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот.

### **Литература:**

1. Dyerberg J. Coronary heart disease in Greenland Inuit: A paradox. Implication for Western diet patterns // *Artie. Med. Res.* - 1989. - Vol. 48. - P. 47 - 54.
2. Kremer J.M. Effects of modulation of inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids // *Lipids.* - 1996. - Vol. 31. Suppl: S243 - 247.



**MOLECULAR AND GENETIC EFFECTS OF LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS  
INFLUENCE ON CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS DURING AGEING OF ORGANISM**

*Nikolaevich L.N., Morozova E.V., Anisovich M.V.*

SI "SPC "Institute of pharmacology and biochemistry of the NAS of Belarus", Belarus  
e-mail: elenamorozova@tut.by

Interest to  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) had dramatically increased in the early eighties, when as a result of Danish scientists J. Dyerberg and H. Bang researches [1] it has been established, that the lowest level of cardiovascular diseases (atherosclerosis, ischemic heart disease, idiopathic hypertension) at Greenland inhabitants is caused by a consumption of a considerable quantity of sea fats with a high  $\omega$ -3 PUFA content. Authors had found out high concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in blood plasma of Greenland inhabitants with the lower content of linoleic and arachidonic acids. It had been established subsequently, that  $\omega$ -3 PUFA have along with hypolipidemic effect also hypocoagulation, antiaggregative, anti-inflammatory and immunomodulatory effects [2]. However mechanisms of  $\omega$ -3 PUFA action on somatic cells genome during ageing of organism have been poorly studied.

The aim of the research was to study the influence of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids) on cell of various functional specialization proliferation and apoptosis during ageing of organism.

Researches were carried out on rats (female) of strain WAG/Y of young (3 month) and old (18 month) age (average body weight was 115 g and 252 g accordingly). Food supplement ROPUFA in the form of 30 %  $\omega$ -3 polyunsaturated acids suspension in corn oil (eicosapentaenoic 125 mg/g and docosahexaenoic 80 mg/g of acids) (manufacturer is DSM Nutritional Products Ltd. Switzerland) was added within 14 days to the food of young and old animals in doses of 0,3 g/kg/day (the general dose is 4,2 g/animal; human norm in day is 3-4 g/day); 0,16 g/kg/day (the general dose is 2,2 g/animal; 1/2 of human daily dose); 0,014 g/kg/day (the general dose 0,2 g/animal, 1g/day for human); the intact control (the usual laboratory diet).

Determination of molecular and genetic indicators of blood, bone marrow, thymus, spleen and liver rats' cells ploidy was conducted using a flow cytometry method on Cytomics FC 500 (Becton Coulter, USA). Apoptotic cells and cells on different stages of cellular cycle frequency and proliferation were studied based on cells ploidy under DNA content. The results of the investigation were compared using the nonparametric Mann-Whitney test (U - criterion). Statistical significance was accepted at  $p < 0,05$ .

Young animals were shown to have the increased liver (on 58 %), thymus (on 71 %) and spleens (on 99 %) cells proliferation at the dose of 0,3 g/kg/day  $\omega$ -3 PUFA, but blood and bone marrow cells proliferation level does not exceed the control one. In process ageing of organism, after  $\omega$ -3 PUFA administration blood, bone marrow, spleen and liver cells proliferation does not exceed the control level. However the increased old animals' thymocytes proliferation on 66 % is observed in comparison with the control. High (in 1, 5 times) proliferation of old animals' hepatocytes, thymocytes and splenocytes is observed in comparison with the young animals. Proliferation of old animals' blood and bone marrow cells does not differ from the control level.

Young animals have decreased cells death on the mechanism of apoptosis in process of  $\omega$ -3 PUFA dose reduction the in a spleen (on 48 %), increased in a bone marrow (on 30 %) and there no changes in a liver in comparison with the control. Low frequency of cells death is observed in old animals blood (a dose of 0, 16 g/kg/day), bone marrow (doses 0, 3; 0, 16 g/kg/day), liver (0, 3; 0,014 g/kg/day) in comparison with high level of young animals cells death. At the doses 0, 3 g/day and 0, 16 g/day the frequency of old animals' liver and blood cells death decreases.

Thus, observed in cellular populations of blood, bone marrow, thymus, spleen and liver molecular and genetic effects have multifold character and depend on cell functional specialization and the organism age. Besides, decrease of old animals' blood, bone marrow and liver apoptosis in comparison with young animals suggests the new properties of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids.

**References:**

1. Dyerberg J. Coronary heart disease in Greenland Inuit: A paradox. Implication for Western diet patterns//Artie. Med. Res. - 1989. - Vol. 48. - P. 47 - 54.
2. Kremer J.M. Effects of modulation of inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids//Lipids. - 1996. - Vol. 31. Suppl: S243 - 247.





## ВПЛИВ ХЛОРИДУ АЛЮМІНІУ НА ДИНАМІКУ СКОРОЧЕННЯ М'ЯЗОВОГО ВОЛОКНА

*Ноздренко Д.М., Бардадим І.І., Заводовський Д.О.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

За дією на організм алюмінію відносяться до токсичних елементів і викликає ряд захворювань (легеневий алюміноз, діалізна енцефалопатія, алюмінієва остеодистрофія та ін.) Одним з невирішених питань є вплив алюмінію на м'язову систему. Існуючі на сьогодні дані обмежені та мають переважно описовий характер. Тому вивчення впливу алюмінію на механіку м'язового скорочення дозволить розширити наші уявлення про механізми дії цього металу.

Встановлення рівноважного стаціонарного стану скорочення під дією біологічно активних речовин може варіювати в досить широких межах залежно від концентрації реагентів та часу дії і тривалості експерименту. Цей факт ускладнює адекватне інтерпретування отриманих результатів. Одна й та сама речовина може викликати різні зміни в динаміці м'язового скорочення залежно від тривалості впливу. Для реєстрації сили скорочення пучків м'язових волокон використовували тензометричну установку, створену на кафедрі біофізики Київського національного університету імені Тараса Шевченка. В процесі проведення експерименту фіксували силу скорочення, зміну довжини м'язу, температуру омиваючого розчину та параметри стимулюючого сигналу при постійному контролі зовнішнього навантаження. Досліди проводили на поодиноких волокнах м'язу *m.tibialis anterior* жаби *Rana temporaria*. Для оцінки впливу хлориду алюмінію на динамічні параметри скорочення ми використовували розчини  $AlCl_3$  в діапазоні концентрацій  $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  моль/л.

Встановлено нерівномірний вплив хлориду алюмінію на силову відповідь та характер вкорочення м'язових волокон. Зміни довжини м'язових волокон під впливом хлориду алюмінію є більшими, ніж зміни силової відповіді м'язових скорочень у відсотках. В результаті дії на м'язові волокна розчинів хлориду алюмінію сила та зміна довжини м'язових волокон у досліджуваному діапазоні концентрацій достовірно лінійно зменшувались, однак, у випадку  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  моль/л концентрацій хлориду алюмінію спостерігалась нелінійність кривих динамічних показників скорочення. Виходячи з отриманих результатів можна стверджувати про асиметричний вплив хлориду алюмінію в досліджуваних концентраціях ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  моль/л) на зміни силової відповіді і довжини м'язових волокон та інгібуючі властивості даного реагенту в концентраціях що перевищують  $10^{-4}$  моль/л. Зміни силової відповіді та довжини м'язового скорочення при дії хлориду алюмінію дозволяють нам говорити про вибірковий характер його дії на скоротливі елементи. Було показано оборотність процесу інгібування, який відбувається в досить короткі проміжки часу, співрозмірні з тривалістю подразнення. Відмивання м'язових препаратів призводить до повернення показників динамічних параметрів скорочення м'язових волокон до контрольних значень. Тривалість відмивання збільшується пропорційно до збільшення концентрацій хлориду алюмінію. Однак слід зазначити, що залежності змін в динаміці скорочення від тривалості дії реагентів не завжди носили лінійний характер. У деяких випадках відбувалася часова затримка в зміні динамічних параметрів з наступним різким виходом досліджуваних параметрів на новий стаціонарний стан. Показано, що зростання концентрацій хлориду алюмінію збільшує часову затримку у встановленні рівноважного стаціонарного стану скорочення. Максимальні зміни силової відповіді м'язових волокон хлориду алюмінію відбуваються на післятетанічних фазах скорочення, а найменші - на дотетанічних його етапах. При застосуванні розчинів хлориду алюмінію високих концентрацій ( $10^{-2}$  моль/л) м'язові волокна переходили в ізометричний режим роботи зі значним зниженням сили м'язового скорочення.

Таким чином встановлені нами зміни силової відповіді та зміни довжини м'язових волокон при дії хлориду алюмінію вказують на вибірковий характер його дії на скоротливі елементи. Можна припустити, що використання  $AlCl_3$  викликає оборотні реакції в ланцюжку генерації сили актоміозиним компонентом.



## EFFECTS OF ALUMINIUM CHLORIDE ON MUSCLE FIBER CONTRACTION DYNAMIC

*Nozdrenko D.M., Bardadym I.I., Zavodovsky D.O.*

Taras Shevchenko National Kyiv University, Kyiv, Ukraine

Aluminium, relating to its effects on organism, refer to the toxic elements and causes a lot of diseases (pulmonary aluminosis, dialysis encephalopathy, aluminium osteodystrophy, etc.) One from the open questions is influence of aluminium chloride on muscular system. Existing nowadays data are limited and have mainly descriptive character. That's why the study of aluminium chloride effects on muscle contraction mechanics can extend our knowledge about mechanisms of these metal effects.

Establishment of equilibrium stationary contraction state under effects of biologically active agents could vary in wide enough limits depending on reagents concentration, its effective time and duration of experiment. This fact complicates adequate interpretation of the results. The same substance can cause different changes in muscle contraction dynamics depending from duration of influence.

For registration of muscle fiber contraction force we used tensometric device, created in biophysics department of Taras Shevchenko Kiev national university. During experiment we fixed contraction force, muscle length changes, temperature of washing solution and stimulation signal parameters at permanent control of the external loading. Experiments were carried out on the single fibers of frog (*rana temporaria*) anterior muscle (m.tibialis). For valuing of aluminium chloride influencing on the dynamic parameters of contraction we used solutions of  $\text{AlCl}_3$  in the range of concentrations from  $10^{-4}$  to  $10^{-2}$  mole/l.

It was established nonuniform effects of aluminium chloride on force answer and character of muscle fibers shortening. Changes of muscle fibers length under influence of aluminium chloride are larger, than analogous power answer changes of muscular contraction, in percents. In consequence of aluminium chloride solutions effects on muscular fibers, force and length changes of muscle fibers in the explored range of concentrations for certain diminished linearly, however, in the case of concentrations of aluminium chloride from  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  mole/l it was observed nonlinearity of curves of contraction dynamic indexes. Appropriately to the got results it is possible to assert asymmetric influence of aluminium chloride in the explored concentrations ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  mole/l) on changing of force answer, muscle fibers length and inhibitory effects of this reagent in concentrations that exceed  $10^{-4}$  mole/l.

The changes of force answer and muscle contraction length under effects of aluminium chloride allow us to suppose selective character of its influence on contractive elements. It was shown reversibility of inhibitory process, which takes place in the short enough intervals of time, accordingly to excitation duration. Dynamic parameters indexes of muscular fibers contraction return to the control values after washing of muscle preparations. Duration of washing is increased proportionally to increasing of aluminium chloride concentrations. However it should be noted that dependences of changes in contraction dynamics from duration reagents effects is not always have linear character. In some cases there was temporary delay in the change of dynamic parameters with the next sharp output of the explored parameters on the new stationary state.

It is shown that growth of aluminium chloride concentrations increases temporary delay in setting of equilibrium stationary contraction state. Maximal changes of muscle fibers force answer under aluminium chloride take place on posttetanic stages of contraction, and the least - on pretetanic stages. At application of aluminium chloride solutions of high concentrations ( $10^{-2}$  mole/l) muscular fibers passed to the isometric mode with some considerable decline of muscle contraction force.

Thus we determined changes of force answer and muscle fibers length under aluminium chloride effects that point to selective character of  $\text{AlCl}_3$  effects on contractive elements. It's possible to assume that using of  $\text{AlCl}_3$  causes reversible reactions of force generation by actomyosin complex.



## ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ

*Орлова И.Г., Галушко Н.А.*

Ставропольский государственный университет, ЮНЦ РАН, Ставрополь, Россия  
e-mail: biomedchem@stavsou.ru; orlova-19@yandex.ru

Биологически активные вещества (БАВ), к которым относят микроэлементы, гуминовые вещества, регуляторы роста, витамины и многие другие химические соединения, могут оказаться, именно тем фактором, который обеспечит получение высокого урожая и качества зерна. В настоящее время решение такой проблемы очень актуально, так как селекционерами созданы интенсивные сорта с очень высоким потенциалом продуктивности, и знание внутренних механизмов регуляции важнейших физиологических процессов у растений может обеспечить реализацию этого потенциала.

Для регулирования процессов формирования урожая и качества зерна среднерослых сортов озимой пшеницы (85-95 см) Безостая 1, Донская безостая и полукарликового сорта Юна нами применялись БАВ - гумат натрия, МиБАС, Гармония, из фитогормонов – ретардант хлорхолинхлорид (ссс, или препарат тур), из минеральных удобрений – аммиачная селитра и аммофос - в предпосевную культивацию ( $N_{30}P_{30}$ ) и карбамид в качестве подкормки ( $N_{30}$ ) на VIII этапе органогенеза (фаза колошения). Обработку растений БАВ проводили строго по этапам органогенеза, гуматом натрия, препаратами Гармония - на VI этапе органогенеза (фаза выхода в трубку) и МиБАСом - на VII этапе (фаза стеблевания). Опрыскивание посевов пшеницы Безостая 1 и Донская безостая препаратом тур на II, III, IV, V, VI-VII этапах органогенеза в дозе 6 кг д. в. на гектар. Гуматы – группа естественных высокомолекулярных веществ, которые характеризуются высокой физиологической активностью, не токсичны, не канцерогенны, не мутагенны. Гармония – препарат, вырабатываемый из торфа и бурых углей, содержащий биологически активные компоненты гуминового комплекса, микро- и макроэлементы (Ca, Ni, Cu, Mn, Zn и др.), низкомолекулярные органические кислоты (янтарная кислота). МиБАС – 13% раствор природного полимера лигнина, в состав которого входят микроэлементы (медь, цинк, кобальт, железо, молибден и марганец), стимулирует рост и развитие растений. Для оценки воздействия ссс на зерновую продуктивность пшеницы Безостая 1 и Донская безостая использовали метод морфофизиологического анализа. При этом при этом анализировались отдельно колосья главных, боковых побегов и побеги в зависимости от количества междоузлий. Нами изучались основные показатели фотосинтетической деятельности растений, процессы потребления, накопления и перераспределения основных элементов минерального питания, а также технологическое качество зерна.

БАВ увеличивали урожай зерна у Безостой 1 на 2.6-3.7 ц/га, а у Юны на 3.6-4.8 ц/га. Максимальная прибавка зерна получена при обработке растений препаратом Гармония. Среднерослый сорт дополнительно, к контролю дал 3.7 ц/га зерна, а полукарликовый сорт – 4.8 ц/га. Обработка растений озимой пшеницы сорта Юна, способствовала увеличению общей стекловидности на 6-11%, а у Безостой 1 это увеличение не превышало 6%. Количество клейковины повышалось в результате обработки посевов препаратом Гармония. Минеральные удобрения способствовали увеличению количества клейковины у среднерослого сорта на 3%, а у полукарликового - на 5%. Таким образом, совместное применение минеральных удобрений и БАВ обеспечивает получение высокого урожая и качества зерна. Морфофизиологический анализ (по Куперман) позволил произвести учет редукции элементов продуктивности у пшеницы Безостая 1 и Донской безостой при обработке посева препаратом тур. Оценка степени редукции элементов продуктивности колоса дает достоверную информацию о пластичности сорта. Так, у Безостой 1 колос главных побегов в варианте опыта с обработкой растений на разных этапах органогенеза ссс, имел более высокую продуктивность, чем в контрольном варианте без обработки. Все показатели были выше, начиная с длины колоса и заканчивая средней озерненностью колоска. Колос у контрольных растений на главных побегах с шестью междоузлиями имел длину 8.0 см, а при обработке растений ссс совместно с карбамидом - 8.7 см. Количество колосков в колосе увеличивалось с 16.4 до 17.2. Средняя озерненность колоска повышалась с 1.5 до 1.9. Цветки в колосках развивались более синхронно, поэтому процент колосков в колосе, имеющих на XII этапе органогенеза три зерновки повышался с 16.8 до 24.6, а четыре – пять зерновок с 1.0 до 4.2. У сорта Донская безостая также главные побеги доминировали в развитии над боковыми и имели более высокую продуктивность колоса. Длина колоса у главных побегов с шестью междоузлиями составляла 6.8 см, а у боковых - 6.0 см. Применение ретарданта приводило к повышению реальной продуктивности, количество зерен в колосе в среднем увеличивалось от 28 до 38 штук. Это обуславливалось уменьшением редукции цветков к VIII этапу органогенеза, особенно, при совместной обработке растений туром и карбамидом на VII этапе, а также только туром на IV, V этапах. Уменьшалась редукция цветков и завязей на VIII - X этапах органогенеза. Обработка растений ссс на IV этапе органогенеза и далее совместно с подкормкой карбамидом на VI этапе сопровождалась уменьшением редукции зерновок на X - XI этапах органогенеза. Таким образом, влияние ссс на редукцию и синхронность развития элементов продуктивности колоса открывает возможность управления и регуляции репродуктивной способностью злаков.



## **INFLUENCE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND MINERAL FERTILIZERS ON PRODUCTIVITY OF CULTURAL CEREALS**

*Orlova I.G., Galushko N.A.*

The Stavropol state university, UNC the Russian Academy of Science, Stavropol, Russia.  
e-mail: biomedchem@stavsu.ru; orlova-19@yandex.ru

Biologically active compounds (BAC) to which carry microelements, humin substances, growth regulators, vitamins and many other chemical combinations, can appear, that factor which will ensure a high yield and quality of a grain. Now the decision of such problem very actually as selectors build intensive sorts with very high potential of the productivity, and knowledge of internal mechanisms of a regulation of the major physiological processes at plants can provide realization of this potential.

For regulation of processes of formation of a crop and quality of a grain of the semi-dwarf (85-95 cm) sorts of a winter wheat Besostaya 1, Donskaya besostaya and short-stem Jun s wheat us were applied BAC - a humate of sodium, MiBAS, Harmony, from plant hormones - retardant chlorcholinchlorid (ccc, or a drug TUR), from mineral fertilizers - ammoniac saltpeper and an ammophos - in a presowing cultivation ( $N_{30}P_{30}$ ) and a carbamide as top dressing ( $N_{30}$ ) at VIII stage of organogenesis (a phase of a heading). Processing of plants BAC carried out strictly on stages of organogenesis, a humate of sodium, drag Harmony - at VI stage of organogenesis (a phase of a shooting) and MiBAS - at VII stage (a phase of a stem growth). Spraying of crops wheats Besostaya 1 and Donskaya besostaya a drag TUR on II, III, IV, V, VI-VII stages of organogenesis in a dose of 6 kg reacting substance/ga. Humates - group of natural high-molecular substances which are characterized by high physiological activity, are not toxic, not kancerogen, not cloudies. Harmony - a drug, developed from peat and the brown coals, keeping biologically awake components of a humic complex, micro -and macronutrients (Ca, Ni, Cu, Mn, Zn, etc.), low molecular weight organic acids (succinic acid). MiBAS - 13 % a solution of natural polymer of the lignin, which structure includes microelements (copper, zinc, a cobaltous, iron, molybdenum and manganese), stimulates growth and development of plants. For an assessment of influence ccc on grain productivity of wheats Besostaya 1 and Donskaya besostaya used a method of morfophysiological analysis. Thus spikes of main shoots, lateral shoots were thus analysed separately depending on the amounts of internodes on a stem. We studied the basic parameters of photosynthetic activity of plants, processes of consumption, accumulation and redistribution of basic elements of a mineral nutrition, and also technological quality of a grain.

BAC increased a grain yield at Besostaya 1 on 2.6-3.7 c/ga, and at Jun s sort on 3.6-4.8 c/ga. The maximal increase of a grain is received at processing plants by a drug Harmony. Semi-dwarf sort of wheat follow-up, to the control has yielded 3.7 c/ga grains, and short-stem wheat - 4.8 c/ga. Processing of plants of a winter Jun s wheat, promoted augmentation of the general glassiness at 6-11 %, and at Besostaya 1 this augmentation did not exceed 6 %. The quantity of a gluten increased as a result of processing crops by a drug Harmony. Fertilizers promoted augmentation of amount of a gluten at semi-dwarf sorts on 3 %, and at short-stem ones - on 5 %. Thus, collateral application of fertilizers and BAC provides reception of a high yield and quality of a grain. The morfophysiological analysis (on Kuperman) has allowed to manufacture the count of a reduction of elements of productivity of at wheats Besostaya 1 and Donskaya besostaya at processing crop by TUR. The assessment of a degree of a reduction of productivity elements of the spike trustworthy information about a plasticity of sorts. So, at the Besostaya 1 spike of the main shoots in variant of experiment with processing plants at different stages of organogenesis ccc, had higher productivity, than in control variant without processing. All parameters were higher, since length of the spike and finishing the average the quantity of grains in one spikelet. The spike at control plants on the main shoots with six internodes had length of 8.0 sm, and at processing plants ccc together with a carbamide - 8.7 sm. The amount spikelets in the spike increased with 16.4 up to 17.2. On the average the quantity of grains in one spikelet was enlarged with 1.5 up to 1.9. Flowers in the spikelets developed more synchronously, therefore percent spikelets in the spike, having at XII stage of organogenesis three grains increased with 16.8 up to 24.6, and four - five grains with 1.0 up to 4.2. At the wheat Donskaya besostaya also the main shoots dominated in development above lateral and had higher productivity of the spike. The length of the spike at the main shoots with six internodes compounded 6.8 sm, and at lateral ones - 6.0 sm. Application retardant results to increase of real productivity, the average the quantity of grains in the spike increased from 28 up to 38. It was caused by reduction of a reduction flowers to VIII stage of organogenesis, especially, at collateral processing plants by ccc and a carbamide at VII stage, and also only ccc on IV, V stages organogenesis. The reduction flowers and ovaries on VIII - X stages of organogenesis decreased. Processing of plants ccc at IV stage of organogenesis and further together with top dressing by a carbamide at VI stage was accompanied by reduction of a reduction of ovaries on X - XI stages of organogenesis. Thus, influence ccc on a reduction and synchronism of development of elements of the spike productivity opens an opportunity of management and a regulation reproductive ability of cereals.



**ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB И c-MYC И ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eEF1A СОСТАВЛЯЮТ СКВОЗНУЮ КАСКАДНУЮ СИСТЕМУ, НЕГАТИВНО РЕГУЛИРУЕМУЮ ПОЛИАМИНАМИ, БИОСИНТЕЗ КОТОРЫХ ПОДАВЛЯЕТСЯ ПОЛИФЕНОЛАМИ ЗЕЛЕННОГО ЧАЯ (ГИПОТЕЗА)**

Орловский<sup>1</sup> А.А., Залеток<sup>1</sup> С.П., Висловух<sup>2</sup> А.А., Лукаш<sup>2</sup> Т.А., Негруцкий<sup>2</sup> Б.С.

<sup>1</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Введение.** Известно, что фактор транскрипции NF-κB контролирует экспрессию многих генов, белки которых, в свою очередь, регулируют пролиферацию клеток, иммунный ответ, воспаление и, наконец, рост и прогрессию опухолей. NF-κB участвует также в формировании множественной лекарственной резистентности опухолей. NF-κB-зависимый фактор транскрипции c-мус вовлечен в регуляторные функции не столь многочисленные, но сходные по направленности. Наши предыдущие исследования показали следующее. 1) Внутриклеточный дефицит полиаминов (ПА), созданный специфическими ингибиторами биосинтеза и интерконверсии ПА, ведет к торможению опухолевого роста путем стереоспецифического ингибирования экспрессии и функциональной активности NF-κB и подавления экспрессии некоторых NF-κB-зависимых генов, включая c-мус. 2) Полифенолы зеленого чая (ПЗЧ) подавляют синтез и интерконверсию полиаминов, что сопровождается вышеописанными изменениями экспрессии и торможением роста опухолей. Известные литературные данные свидетельствуют об угнетении экспрессии фактора элонгации eEF1A под влиянием ПЗЧ. Все это дает возможность высказать гипотезу, сформулированную в заглавии данной работы. Наше исследование посвящено первичной проверке этой гипотезы.

**Цель:** выявить возможность регуляции экспрессии eEF1A факторами транскрипции NF-κB и c-мус.

**Метод:** компьютерный поиск специфических ДНК-последовательностей для связывания факторов NF-κB (NRE-последовательностей) и c-мус (E-box-последовательностей) в составе нуклеотидных последовательностей промоторов и структурных генов факторов eEF1A1 и eEF1A2, представленных в международных базах данных. В процессе поиска отдельно отмечали стандартные сайты связывания [GGGRNNYYCC (N – любой нуклеотид; R – пурин; Y – пиримидин) для NF-κB и SACRTG (в тех же обозначениях) – для c-мус] и их мутантные варианты, содержащие единственную делецию, вставку или замену.

**Результаты и обсуждение.** Обнаружены принципиальные различия между нуклеотидными последовательностями генов *EEF1A1* и *EEF1A2*, кодирующих различные изоформы фактора элонгации трансляции 1A. Эти результаты представлены в таблице.

Изоформа	NRE-последовательности				E-box-последовательности			
	В промоторе		В структурном гене		В промоторе		В структурном гене	
	Стандарт.	Мутант.	Стандарт.	Мутант.	Стандарт.	Мутант.	Стандарт.	Мутант.
eEF1A1	0	0	0	1	1	3	1	0
eEF1A2	2	5	4	19	2	37	4	0

Важно отметить, что NRE- и E-box-последовательности (в том числе мутантные) нигде не перекрываются между собой. Этот факт – дополнительный аргумент в пользу того, что эти последовательности не случайны, но функциональны.

Все NRE-последовательности в структурных генах eEF1A1 и eEF1A2 локализованы в интронах и, таким образом, могут участвовать в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК.

Эти результаты означают следующее. 1) eEF1A1 полностью лишен контроля со стороны стандартного NF-κB (гетеродимера p50/p65), а возможность его контроля альтернативными формами NF-κB очень сомнительна. 2) Напротив, eEF1A2 может подлежать сильному регулированию как стандартным NF-κB, так и его множественными альтернативными формами. 3) eEF1A1 может управляться различными изоформами c-мус, но это управление однообразно и сравнительно слабо. 4) Напротив, сила и разнообразие вариантов управления eEF1A2 со стороны различных изоформ c-мус могут быть даже больше, чем в случае NF-κB-зависимого управления. Наши результаты хорошо согласуются с литературными данными о том, что eEF1A2, в противоположность eEF1A1, сверхэкспрессирован в опухолях различной локализации является потенциальным онкогеном. Таким образом, нельзя исключить, что NF-κB и c-мус опосредованная регуляция может быть ответственна за сверхэкспрессию eEF1A2 при канцерогенезе.

Таким образом, первый шаг проверки нашей гипотезы можно считать выполненным.



**TRANSCRIPTION FACTORS NF- $\kappa$ B AND C-MYC AND ELONGATION FACTOR EEF1A CONSTITUTE A TRANSPARENT CASCADE SYSTEM BEING DOWN-REGULATED BY GREEN TEA POLYPHENOLS THROUGH INHIBITION OF POLYAMINES BIOSYNTHESIS (A HYPOTHESIS)**

Orlovsky<sup>1</sup> A.A., Zaletok<sup>1</sup> S.P., Vislovukh<sup>2</sup> A.A., Lukash<sup>2</sup> T.A., Negrutskii<sup>2</sup> B.S.

<sup>1</sup> R.E.Kavetsky institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Preamble.** NF- $\kappa$ B transcription factor is a well-known expression controller for multiple genes coding proteins which regulate cell proliferation, immune response, inflammation and, at last, tumor growth and progression. NF- $\kappa$ B is also involved in multidrug tumor resistance. NF- $\kappa$ B-dependent transcription factor c-myc appears to be involved in lesser number of regulatory functions in similar fields. Our previous investigations show the following. 1) Intracellular polyamines (PA) depletion, caused by specific inhibitors of PA biosynthesis and interconversion, retards tumor growth through stereochemically-specific inhibition of NF- $\kappa$ B expression and functional activity and inhibition of expression of certain NF- $\kappa$ B-dependent genes including c-myc. 2) Green tea polyphenols (GTP) inhibit both PA synthesis and interconversion, and the inhibition is accompanied by tumor growth retardation. It is known from literature that GTP inhibits expression of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A). All these enable to make a hypothesis named in the title. Our study deals with the primary verification of this hypothesis.

**The aim:** to investigate the principal possibility of the NF- $\kappa$ B and c-myc to control eEF1A expression.

**Method:** computer search for specifically binding DNA-sequences for NF- $\kappa$ B (NRE-sequences) and c-myc (E-box-sequences) in the nucleotide sequences of eEF1A1 and eEF1A2 promoters and structural genes presented in the international databases. In the course of this search, the standard binding sites [GGGRNNYYCC (N – any nucleotide; R – purine; Y – pyrimidine) for NF- $\kappa$ B and CACRTG for c-myc] and their mutant variants containing a single deletion, insertion or substitution were explored.

**Results and discussion.** Dramatic differences were found in the nucleotide sequences of eEF1A1 and eEF1A2 genes coding different isoforms of translation elongation factor 1A. These results are presented in the table.

Isoform	NRE-sequences				E-box-sequences			
	promotor		structural gene		promotor		structural gene	
	Standard	Mutant	Standard	Mutant	Standard	Mutant	Standard	Mutant
eEF1A1	0	0	0	1	1	3	1	0
eEF1A2	2	5	4	19	2	37	4	0

It is very important that the NRE- and E-box-sequences (including mutant ones) never coincide. This is an additional argument for these sequences are “not casual but causal”.

All NRE-sequences in eEF1A1 and eEF1A2 structural genes are located in the introns and thus may be involved in regulation of alternative splicing.

We interpret the results as follows. 1) eEF1A1 is completely devoid of standard NF- $\kappa$ B (p50/p65 heterodimere) control and probably could not be controlled by the alternative forms of NF- $\kappa$ B as well. 2) On the contrary, eEF1A2 may be strongly controlled by standard NF- $\kappa$ B as well as by a number of alternative forms of NF- $\kappa$ B, and a large number of modes of this control may exist. 3) eEF1A1 may be controlled by different isoforms of c-myc but this control seems to be monomodal and relatively weak. 4) In contrast, the eEF1A2 control by different isoforms of c-myc could be tight and might be even stronger than NF- $\kappa$ B-mediated regulation. Our results correlate with literature data that eEF1A2 rather than eEF1A1 is overexpressed in human carcinomas of different localization. We could not exclude that NF- $\kappa$ B and c-myc mediated regulation is involved in increased expression of eEF1A2 during cancerogenesis.



## ІЗОЛЯТ СОЄВОГО БІЛКА, МОЖЛИВО, МІСТИТЬ БЛОКАТОР ТВАРИННИХ ЕСТРОГЕНІВ ТА СОЄВИХ ФІТОЕСТРОГЕНІВ

Орловський<sup>1</sup> О.А., Кленов<sup>1</sup> О.О., Малицька<sup>1</sup> І.В., Самойленко<sup>1</sup> О.А., Терлецька<sup>2</sup> Я.Т., Жукотський<sup>2</sup> Е.К.,  
Гоголь<sup>1</sup> С.В., Шаркова<sup>2</sup> Н.О., Залеток<sup>1</sup> С.П., Чехун<sup>1</sup> В.Ф.

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С.Кавецького НАН України, Київ, Україна  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

<sup>2</sup> Інститут технічної теплофізики НАН України, Київ, Україна

**Вступ.** Літературні дані щодо протипухлинного ефекту соєвих продуктів водночас дуже обнадійливі й дуже суперечливі. Прийнято вважати, що головними протипухлинними чинниками сої є ізофлавонони, що мають властивості фітоестрогенів, тому ефект соєвих продуктів проявляється головними чином щодо естрогенозалежних пухлин. Останнє підтверджено й нашими власними попередніми дослідженнями на 5 штамах експериментальних пухлин з різним ступенем залежності їх росту від естрогенів. Водночас, в досліді різних авторів залежність протипухлинного ефекту ізоляту соєвого білка від вмісту в ньому ізофлавононів виявилася прямою, зворотною або відсутньою, залежно від досліджуваної пухлинної моделі. Крім того, різниця між окремими групами тварин в цих роботах здебільшого була невеликою, часто статистично не значущою ( $P > 0,05$ ).

**Мета.** Виявити залежність протипухлинного ефекту ізоляту соєвого білка від кількісного рівня його споживання тваринами-пухлиноносіями та від вмісту соєвих ізофлавононів в ньому.

**Методи.** Досліди проводили на статеві зрілих нелінійних щурах-самицях з перещепленою підшкірно карциносаркомою молочної залози Уокер W-256 і статеві зрілих мишах-самицях C57Bl/6 та F1(C57Bl/6×DBA2) з перещепленою підшкірно карциномою молочної залози Ca-755. Тварин годували (з моменту перещеплення пухлин до забою) сумішшю стандартного комбікорму та ізоляту соєвого білка, що містив 90% загального білка. В досліді застосовували ізолят соєвого білка "Supro 500E" виробництва компанії "Solae Belgium N.V.", Бельгія, та комерційний препарат соєвих ізофлавононів "Soy Isoflavones Solgen 40" виробництва компанії "Solbar plant extracts LTD", Ізраїль. Використовували: 1) стандартний білковий ізолят (0,1% соєвих ізофлавононів); 2) ізолят, практично звільнений від ізофлавононів за допомогою етанольної або водної екстракції; 3) ізоляти, збагачені комерційним препаратом соєвих ізофлавононів до 1%, 2% або 4%. Протипухлинний ефект оцінювали за середньою масою пухлин на момент забою або за об'ємом пухлин в динаміці їх росту.

**Результати.** Збільшення частки соєвого білка (у вигляді стандартного ізоляту, що містить 90% загального білка та 0,1% ізофлавононів) в межах 0 – 40% від загального вмісту білка в раціоні щурів з карциносаркомою Уокер W-256 призводило до посилення гальмівної дії на ріст пухлин. Хоча різниця між окремими групами тварин виявилася статистично не достовірною за t-критерієм Ст'юдента, достовірність досліді в цілому за точним методом Фішера складає 95%. За постійної (25%) частки соєвого білка в загальному білку кормової суміші, найбільший гальмівний ефект на ріст карциносаркоми Уокер W-256 у щурів та карциноми Ca755 у мишей спостерігався при відсутності ізофлавононів в ізоляті соєвого білка. Присутність ізофлавононів (в межах 0,1% – 4,0% вагових) в ізоляті соєвого білка призводила до зменшення або повного скасування гальмівного ефекту. У цих досліді також здебільшого не спостерігалася достовірної різниці між окремими групами тварин за t-критерієм Ст'юдента, однак достовірність серії досліді в цілому, обчислена за точним методом Фішера, складає 98,6%. Висловлено гіпотезу, згідно з якою у складі досліджуваного соєвого білкового ізоляту присутні одна або кілька речовин, що мають властивості блокатів як тваринних естрогенів, так і фітоестрогенів сої. Результуючий протипухлинний ефект конкретного соєвого продукту є «рівнодіючою» ефектів фітоестрогенів сої та соєвого блокатора естрогенів.



**SOYBEAN PROTEIN ISOLATE MAY CONTAIN A BLOCKER OF BOTH ANIMAL ESTROGENS  
AND SOYBEAN PHYTO-ESTROGENS**

*Orlovsky<sup>1</sup> O.A., Klenov<sup>1</sup> O.O., Malitska<sup>1</sup> I.V., Samoilenko<sup>1</sup> O.A., Terletska<sup>2</sup> Ya.T., Joucotsky<sup>2</sup> E.K., Gogol<sup>1</sup> S.V.,  
Sharkova<sup>2</sup> N.O., Zaletok<sup>1</sup> S.P., Chekhun<sup>1</sup> V.F.*

<sup>1</sup> R.E.Kavetsky institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

<sup>2</sup> Institut of Engineering Thermophysics of NAS of Ukraine, Kyiv

**Preamble.** Literary data on anticancer effect of soybean foods are very promising and at the same time very controversial. As is the convention, the main anticancer soybean agents are the isoflavones having the properties of phyto-estrogens and because of this anticancer effect of soybean foods is most manifest as to the estrogen-dependent tumors. The last was especially confirmed in our own previous investigations have been performed on 5 strains of experimental tumors with different range of their estrogen-dependence. At the same time, different authors have reported direct, inverse or absent dependence of anticancer effect of soybean protein isolate on isoflavones content in it, dependently on the tumor model have been studied. Also, difference between individual groups of animals in these works was often small and not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

**The aim.** To find how anticancer effect of soybean protein isolate depends on range of the isolate consumption by the tumor-bearing animals and on the isoflavones content in the isolate.

**Methods.** Experiments were performed on the mature non-inbred female rats with subcutaneously grafted Walker W-256 mammary carcinosarcoma and on mature C57Bl/6 and F1(C57Bl/6×DBA2) female mice with subcutaneously grafted Ca-755 mammary carcinoma. The animals were fed (from the moment of tumor grafting up to sacrifice) with the mix of standard mash and soybean protein isolate containing 90% of total protein. A soybean protein isolate "Supro 500E" been produced by "Solae Belgium N.V.", Belgium, and a commercial soybean isoflavones preparation "Soy Isoflavones Solgen 40" been produced by "Solbar plant extracts LTD", Israel, were tested in our experiments. There were used: 1) a standard protein isolate (0.1% of soybean isoflavones); 2) an isolate have been practically released from the isoflavones by ethyl alcohol or water extraction; 3) the isolates have been enriched with a commercial soybean isoflavones up to 1%, 2% or 4%. Anticancer effect was evaluated by average tumor mass at the day of sacrifice or by tumor volume in growth dynamics.

**Results.** If part of soybean protein (been given as a standard isolate containing 90% of total protein and 0.1% of isoflavones) in total forage protein was magnified in the interval of 0 – 40%, this led to increasing growth retardation of rat Walker W-256 carcinosarcoma. Although difference between individual groups of animals been calculated via the Student's t-criterion was not statistically significant, statistical significance of the whole experiment been calculated via the exact Fisher's method was 95%. If part of soybean protein in total forage protein was constant (25%), the maximum growth retardation of rat Walker W-256 carcinosarcoma and mouse Ca755 carcinoma was observed under isoflavones-free isolate of soybean protein. Presence of the isoflavones (0,1% – 4,0% weight) in the soybean protein isolate diminished or completely abolished growth retardation. In these experiments, similarly to the previously described, difference between individual groups of animals been calculated via the Student's t-criterion was most often not statistically significant, but statistical significance of the experimental series in whole been calculated via the exact Fisher's method was 98.6%. У цих дослідках також здебільшого не спостерігалось достовірної різниці між окремими групами тварин за t-критерієм Ст'юдента, однак достовірність серії дослідків в цілому, обчислена за точним методом Фішера, складає 98,6%. It is supposed that soybean protein isolate have been tested includes one or more substances having a property to block animal estrogens as well as soybean phyto-estrogens. Resulting anti-tumor effect of a concrete soybean product appears a resultant of soybean phyto-estrogens effect and effect of a soybean estrogen-blocker.





## НИСХОДЯЩИЕ ПУТИ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ НАЧИНАЮТСЯ НА КЛЕТочНОЙ МЕМБРАНЕ ИЛИ В ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОМ МАТРИКСЕ?

Орловский А.А., Козак В.В., Яниш Ю.В.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины,  
Киев, Украина  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Введение.** Практически во всех методиках, которые используются для испытания новых лекарственных препаратов и других биологически активных веществ в реакциях против суспендированных клеток-мишеней, эти клетки предварительно отмывают центрифугированием от их естественного экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). Такой подход основывается на традиционном воззрении, согласно которому именно специфические мембранные рецепторы являются первым звеном нисходящих сигнальных путей. Однако это последнее утверждение весьма сомнительно. В самом деле: 1) хорошо известно, что ЭЦМ высоко структурирован на супрамолекулярном уровне и потому способен передавать стереохимическую информацию; 2) благодаря явлению шеддинга, ЭЦМ содержит те же рецепторы, что и плазмалемма, и эти рецепторы, вообще говоря, сохраняют свою нативную конформацию, поскольку sluщиваются не как отдельные молекулы, а в составе целостных липопротеидных доменов; 3) в дополнение к специфическим рецепторам, ЭЦМ содержит множество компонентов, способных формировать низко-специфичные или неспецифические (но также стереохимически обусловленные) связи с веществами различных классов.

**Цель:** Продемонстрировать роль ЭЦМ в сигнальной трансдукции и разработать усовершенствованные рекомендации для испытания биологически активных веществ в условиях *in vitro*.

**Экспериментальные задачи:** 1) исследовать зависимость неиммунного лизиса клеток злокачественных опухолей интактной плазмой или сывороткой крови (канцеролиза, КП) от некоторых модуляторов сигнальной трансдукции; 2) сравнить канцеролитическую активность одной и той же сыворотки или плазмы по отношению к опухолевым клеткам одного и того же штамма, интактным, или отмытым от ЭЦМ, или вновь помещенным в свой собственный ЭЦМ.

**Материалы и методы.** Как известно, индекс реакции КП (КЛИ) представляет собой результирующую величину двух процессов: цитолиза как такового и клеточного деления. Если преобладает цитолиз, КЛИ положителен, если же преобладает деление – отрицателен. Отрицательный КЛИ часто определяется у пациентов и животных со злокачественными опухолями и в некоторых случаях при других тяжелых заболеваниях. Резко положительный КЛИ характерен для здоровых людей и животных. В качестве мишеней реакции КП использовали асцитные клетки саркомы S-37 и карциномы Эрлиха мышей. Для решения задачи 1 применяли специфические реагенты, ингибирующие Протеинкиназу С (PKC) непосредственно или же опосредованно (через активацию PKA). Для решения задачи 2, в реакции КП тестировали асцитные клетки в интактном состоянии; или отмытые от ЭЦМ с помощью 1, 2, 3 или 5 центрифугирований (1000 g) в изотоническом растворе NaCl; или вновь помещенные в предварительно удаленный ЭЦМ.

**Результаты.** В наших экспериментах была показана сильная зависимость КП от нисходящих путей сигнальной трансдукции, причем клетки гибли преимущественно в результате аутофагальной дегенерации. Образцы сыворотки и плазмы, использованные в наших тестах, имели высокий (>30%) положительный КЛИ по отношению к интактным асцитным клеткам. Однако КЛИ становился отрицательным уже после первого центрифугирования, затем его отрицательность нарастала вплоть до 3-го центрифугирования. Когда асцитные клетки, отмытые от ЭЦМ, вновь помещали в него, КЛИ вновь становился положительным, но не достигал контрольного уровня. Последнее может быть объяснено частичной деструкцией отмытого ЭЦМ.

**Выводы.** 1) Наши результаты дают веское основание полагать, что нисходящие пути сигнальной трансдукции могут начинаться не только с клеточной мембраны, но и с супрамолекулярных комплексов, расположенных в ЭЦМ. 2) Насколько это возможно, суспендированные клетки-мишени в тестах *in vitro* должны быть сохранены в своем естественном ЭЦМ. Несоблюдение этого условия может привести к искажению биологического смысла результатов испытаний вплоть до его инверсии.



## **DOES DOWNSTREAM CELL SIGNALING START FROM A CELL MEMBRANE OR FROM EXTRACELLULAR MATRIX?**

*Orlovsky A.A., Kozak V.V., Yanish Yu.V.*

R.E. Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Preamble.** In practically all techniques being applied to different trials of new drugs and other biologically active substances against suspended target cells, these cells are preliminary washed of their natural extracellular matrix (ECM) by centrifugation. This approach is based on the traditional view accordingly to which specific membrane receptors are really the first links of downstream signaling pathways. But the last assertion is very doubtful. Indeed: 1) ECM is well-known to be highly structured on a supramolecular level and thus is able to transmit stereochemical information; 2) ECM contains the same receptors as a plasmalemma, because of the shedding phenomena and these receptors, in general, remain their native conformation being removed not as isolated molecules but being included in holistic lipoprotein domains; 3) in addition to the specific receptors, ECM contains a lot of components being able to form low-specific or nonspecific (but also stereochemically provided) bonds with different kinds of substances.

**The aim:** To demonstrate a role of ECM in signal transduction and to elaborate advanced recommendations for *in vitro* trials of biologically active substances.

**The experimental tasks:** 1) to study how non-immune lysis of cancer cells in an intact blood serum or plasma (cancerolysis, CL) depends on certain modulators of signal transduction; 2) to compare cancerolytic activity of the same serum or plasma as to the cancer cells of the same strain being intact, or removed from ECM, or reconstituted in their own ECM.

**Materials and methods.** As it is known, CL reaction index (CLI) is a summary result of 2 processes: cytolysis itself and cell division. If cytolysis prevails, CLI is positive, if cell division prevails – negative. Negative CLI is often observed in tumor-bearing patients and animals and in some cases of other serious diseases. High positive CLI is characteristic for healthy humans and animals. Ascites cells of mouse S-37 sarcoma and Ehrlich's carcinoma were used as targets in CL reaction. Specific reagents inhibiting Protein-kinase C (PKC) directly or mediately (through PKA activation) were used for the task 1. For the task 2, the ascites cells were tested in the CL reaction in intact state; or being removed from ECM by 1, 2, 3 or 5 centrifugations (1000 g) in isotonic NaCl solution; or reconstituted in previously removed ECM.

**Results.** In our experiments, CL was shown to be strongly dependent on cell downstream signaling, and the main mode of cells death in the CL reaction was autophagal degeneration. The samples of serum and plasma used in our tests had high (>30%) positive CLI as to intact ascites cells. But CLI became negative even after the 1-st centrifugation, then its negativity increased up to the 3-rd centrifugation. When the ascites cells, previously removed from ECM, were reconstituted in this, CLI became positive again but did not attain control level. The last may be explained with partial destruction of the ECM have been removed.

**Conclusion. 1)** Our results make a strong basis to suppose that downstream cell signaling can start not only from a cell membrane but also from supramolecular complexes located in ECM.

**2)** If it is possible, suspended target cells in the *in vitro* tests must be retained in their natural ECM. If this condition would be not kept, biological sense of the trial results may be distorted up to their inversion.



### НОВІ АНТИГРИПОЗНІ ПРЕПАРАТИ ГРУПИ АКРИДОНІВ

*Пальчиовська<sup>1</sup> Л.Г., Рибалко<sup>2</sup> С.Л., Жаркова<sup>2</sup> Л.Д., Алексеева<sup>1</sup> І.В., Костіна<sup>1</sup> В.Г., Швед<sup>1</sup> А.Д., Федорченко<sup>2</sup> Д.Б., Завелевич<sup>2</sup> М.П.*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна  
e-mail: l.palchykovska@imbg.org.ua

<sup>2</sup>ДУ „Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України”, Київ, Україна

Широке використання похідних акридину в медицині почалося з відкриття протималарійних властивостей акрихіну та антибактеріальних властивостей етакридину лактату. Та біологічна активність препаратів групи акридину виявилася значно ширшою. Їм властиві в різній мірі - антибактеріальна, антипаразитарна, протівірусна та протипухлинна дія.

До представників цієї групи сполук належить циклоферон та неовір, які використовують як протигрипозні засоби. Механізми їхньої дії полягають у індукції синтезу альфа- і бета-інтерферону (ІФН) макрофагами, В-лімфоцитами і нейтрофілами. Під дією ІФН активується фагоцитоз, природні кілерні клітини, цитотоксичні Т-лімфоцити та коригується імунний статус при імунодефіцитних станах різного походження. Крім того похідні акридинів можуть втручатися і у інші етапи вірусної репродукції. Вони накопичуються в ядрах клітин та клітинних органоїдах, взаємодіють з ДНК та РНК, інтеркалюючи між парами основ, пригнічуючи функціонування ферментів біосинтезу нуклеїнових кислот (ДНК- та РНК-полімерази, топоізомерази, гелікази) . Висловлено припущення про здатність акридинів адсорбуватися на рецепторах клітин і таким чином впливати на процеси взаємодії вірусу і клітини.

Відомо, що фермент нейрамінідаза руйнує клітинні рецептори до вірусу грипу, допомагаючи вірусним часткам проникати через секрети слизових оболонок, багатих сіаловою кислотою, для досягнення віріонами клітин-мішеней епітелію дихальних шляхів.

На тепер визнаними інгібіторами нейрамінідази є оселтамівір (ТАМІФЛЮ) та занамівір (4-гуанідин-2,3-дегідрон-ацетилнейрамінова кислота), які застосовуються для лікування грипу. Проте вони дещо токсичні і досить швидко формують резистентні штами вірусу.

Представлена робота мала на меті розробити антигрипозні препарати, які б пригнічували нейрамінідазу активність вірусу, на основі акридонів, до родини яких належать і циклоферон та неовір.

Авторами було розроблено нову серію похідних акридону – карбоксамідів акридон-4- карбонової кислоти (АКР). В результаті їх досліджень були отримані дані, що вказують на абсолютну інгібіцію нейрамінідазної активності вірусів грипу А/Гонконг/1968/Н3N2, А/Вікторія/1975/Н3N2 та А/FM/Н1N1 препаратами АКР-2, 5, 11. Крім того показано, що препарати АКР-2, 5, 11 інгібують клітинну нейрамінідазу нехолерного вібріона та *Astrobacter ureafaciens*.

При вивченні антигрипозної дії синтезованих речовин АКР-1, 2, 3, 5, 6, 11 встановлено, що вони є ефективними антигрипозними сполуками, індекс селективності ( IS) яких дорівнює 250. Досліджені препарати АКР в дозі 1 мкг/мл зменшують репродукцію вірусу грипу при профілактичній схемі введення на 2 lg ID<sub>50</sub>, а при лікувальній схемі введення – на 3 lg ID<sub>50</sub>.

Отже, в результаті проведених досліджень по виявленню терапевтичних властивостей препаратів АКР-1, 2, 3, 5, 6, 11, а саме: мінімально-активної концентрації, максимально-переносимої концентрації, хіміотерапевтичного індексу, мутагенності та ефективності у модельованих умовах було показано, що ефективними та придатними до подальших досліджень є препарати АКР-2, 5 та 11, які при однакових характеристиках по МПК, МАК, ХТІ та відсутності мутагенного впливу на клітину, показали ефективними інгібіторами вірусної активності в системах *in vitro* та *in vivo*, тоді як препарати АКР-1, 3, 6 показали низьку ефективність в захисті та боротьбі з вірусною інфекцією.



### ACRIDONES AS NOVEL ANTI-INFLUENZA SUBSTANCES

*Palchykovska<sup>1</sup> L.I., Rybalko<sup>2</sup> S.L., Zharkova<sup>2</sup>, Alexeeva<sup>1</sup> I.V., Kostina<sup>1</sup> V.G., Shved<sup>1</sup> A.D.,  
Fedorchenko<sup>2</sup> D.B., Zavelevych<sup>2</sup> M.P.*

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian National Academy of Science, Kyiv, Ukraine  
e-mail: l.palchykovska@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Public Institution "L.V. Hromashevskiy Institute of epidemiology and infectious diseases  
of the AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

Broad employment of acridine derivatives in medicine was initiated since the discovery of antimalarial properties of acrichine and antibacterial characteristics of etacridine lactate. But biological activities shown by acridine group proved to be much more widespread. They exhibit antibacterial, antiparasitic, antiviral and antitumor activities in varying extent.

Members of this compounds' group include Cycloferon and Neovir which are used as anti-influenzal means. Mechanism underlying their effect involves induction of alpha- and beta-interferon (IFN) by macrophages, B-lymphocytes and neutrophils. Under the effect of IFN there are activated phagocytosis, natural killer cells and corrected the immune status upon the immunodeficiency states of various origin. In addition, acridone derivatives may interfere in other steps of viral reproduction. These are accumulated in cell nuclei and cell organoids, interplay with DNA and RNA to intercalate between base pairs, suppress functioning of enzymes involved in biosynthesis of nucleic acids (DNA- and RNA-polymerases, topoisomerases, and gelicases). It was supposed that acridones are able to adsorb on cell receptors and in this way affect the processes of cell-virus interaction.

Enzyme neuraminidase, known by its capacity to disrupt (destroy) cell receptors to influenza virus was found to promote viral particles to penetrate through mucous discharge, enriched by sialic acid, thus facilitating virus arrival to respiratory tract epithelium cell-targets.

Currently recognized inhibitors of neuraminidase are Oseltamivir (TAMIFLU) and Zanamivir (4-guanidine-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminova acid), which are used for treatment of influenza. However, these are somewhat toxic and may rather quickly form resistant strains of virus.

The aim of the presented work was to develop anti-influenzal preparations, which would inhibit neuraminidase viral activity. The latter is based on acridones which involve both Cycloferon and Neovir. Authors elaborated further series of acridone derivatives – carboxamides of acridon-4 carbonic acid (AKP). As a result of their studies there were generated data (obtained the results) indicating complete (total) inhibition (suppression) of neuraminidase activity for such influenza viruses as A/ Goncong /1968/H3 N 2, A/ Victoria /1975/H3 N 2 and A/ F M/H1 N 1 by AKP-2, 5, 11 preparations . In addition, AKP-2, 5, 11 preparations were shown to inhibit cell neuraminidase of both non-choleric vibrio and *A strob ac t er u rea faci e ns* . Evaluation of anti-influenzal effect of synthesized AKP-1, 2, 3, 5, 6 and 11 compounds , revealed that these present effective anti-influenzal substances, whose selectivity index (SI) equals 250. AKP preparations under study being administered at a dose of 1 мкг/мл upon the prophylactic schedule were found to reduce influenza virus reproduction by 2 lg ID 50 , while therapeutic schedule of administration resulted in 3 lg ID 50 decrease.

Thus, investigation into the therapeutic properties of AKP-1, 2, 3, 5, 6, 11 preparations, namely, minimally active level, maximally-tolerable level, chemo-therapeutic index, mutagenicity and efficacy in modeled background demonstrated that effective and suitable for further studies may be AKP-2, 5 and 11 preparations which upon comparable characteristics by MAL, MTL, CTI and lack (absence) of mutagenic effect on cell exhibited (showed) effective inhibition (suppression) of viral activity both in vivo and in vitro, whereas AKP-1, 3, 6 preparations displayed low efficacy in protection and control of viral infection.



## ЭФФЕКТИВНАЯ КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Пархоменко Ю.М., Пилипчук С.Ю., Протасова З.С., Чеховская Л.И., Степаненко С.П., Донченко Г.В.

Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

На основании результатов фундаментальных исследований разработана композиция биологически активных соединений, предназначенная для повышения устойчивости живого организма к неблагоприятным факторам окружающей среды. Композиция подобрана по принципу синергического действия нескольких биологически активных соединений (витамины В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, Е, метионин, соль цинка) на лимитирующие звенья клеточного метаболизма. Эта композиция легла в основу разработанного нами комплексного витаминного препарата, получившего название «Метовитан». Направленная активация препаратом процессов транссульфирования и трансметилирования способствует повышению синтеза глутатиона – природного пептида, который является важным компонентом биохимической системы антиоксидантной защиты организма и принимает участие в реакциях детоксикации чужеродных соединений, липо- и гидро-перекисей.

Изучена способность препарата нормализовать клеточный метаболизм в тканях крыс с моделью хронического алкоголизма и после его отмены (модель абстиненции). В качестве биохимических критериев для оценки эффективности препарата в нормализации метаболических нарушений, вызванных алкоголем, были отобраны такие показатели как уровень восстановленного глутатиона в мозге и печени, содержание гомоцистеина, фолиевой кислоты и витамина В<sub>12</sub> в крови, коэнзима Q в сердечной мышце, содержание отдельных витаминов и коферментов в ткани печени (витаминов В<sub>1</sub>, Е, В<sub>3</sub>, NAD, тиаминдифосфата), скорость образования малонового диальдегида гомогенатами мозга и печени крыс, активность ряда ферментов, в частности алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы крови, ацетилхолинэстеразы (АХЕ) в изолированных нервных окончаниях мозга крыс. В качестве интегрального показателя, отражающего интенсивность обмена белков в тканях, было использовано отношение РНК/ДНК. Особое внимание уделялось исследованию влияния этанола на показатели обмена витамина В<sub>1</sub> (тиамина) в ткани мозга, поскольку нейродегенеративные изменения, которые наблюдаются при болезни Вернике-Корсакова (последствие хронического алкоголизма) связывают именно с нарушениями в обмене и функционировании этого витамина под влиянием алкоголя. В связи с вышесказанным, в ткани мозга и печени подопытных животных определяли содержание тиамина, тиаминдифосфата (ТДФ), активность ТДФ-зависимых ферментов. Большая часть этих показателей значительно снижались в тканях животных, которые длительное время потребляли алкоголь.

Полученные результаты свидетельствовали, прежде всего, об отрицательном влиянии хронического поступления алкоголя в организм на метаболизм серосодержащих соединений и процессы транссульфирования. Результаты исследования также показали, что часть метаболических изменений, вызванных долгосрочным потреблением алкоголя, может быть вызвана прямым влиянием этанола или его метаболитов на те или иные ферментные белки, и их функция может быть быстро нормализована после отмены алкоголя (содержание NAD, активность оксокетоглутаратдегидрогеназного комплекса и некоторые другие). Но такие показатели как содержание глутатиона, гомоцистеина, фолиевой кислоты, коэнзима Q, отношение RNA/DNA и некоторые другие не нормализовались даже через 7 дней после отмены алкоголя, если препарат Метовитан не вводился животным в это время.

Препарат вводился ежедневно последние 7 дней на фоне употребления алкоголя в случае модели хронического алкоголизма, или на протяжении 3 и 7 дней после отмены приема алкоголя в случае модели абстиненции. Анализ полученных данных показал, что в первом случае введение препарата способствовало частичной или полной коррекции большинства метаболических нарушений, однако его позитивное действие было более выраженным на модели абстиненции. В последнем случае препарат способствовал быстрой нормализации обмена витамина В<sub>1</sub> в мозге и печени, повышению содержания восстановленного глутатиона в этих органах, содержания фолиевой кислоты в крови, коэнзима Q в сердечной мышце. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что наиболее целесообразным может быть использование препарата в период реабилитации больных с алкогольной зависимостью. Они также свидетельствуют о том, что препарат может быть эффективным гепатопротектором. Это предположение было подтверждено на модели токсического гепатита, а также фактом снижения почти в 2 раза величины LD<sub>50</sub> для парацетамола.

По принципу вышеупомянутой композиции был также разработан препарат Кардиовит - комплексный витаминный препарат, предназначенный для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, эффективность действия которого показана на моделях гипоксической гипоксии и миокардита с помощью биохимических и гистохимических методов. Его основу составляет научно-обоснованная композиция биологически активных веществ. Основная идея разработки - активация эндогенного синтеза биологически активной формы витамина В<sub>1</sub> - тиаминдифосфата (кокарбоксылазы) с целью активации тканевого обмена, и стабилизации функционирования сердечной мышцы. В отличие от инъекционного препарата «Кокарбоксылаза», основу которого составляет ТДФ, Кардиовит проявляет выраженное регулирующее действие на метаболические процессы в сердечной мышце при введении его в организм *per os* в виде таблеток или капсул.



**EFFECTIVE CORRECTION OF METABOLIC IMBALANCE WITH THE HELP OF A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

*Parkhomenko Iu. M., Pylypchuk S.Iu., Protasova Z.S., Chehivskaya L.I., Stepanenko S.P., Donchenko G.V.*

A.V. Palladin Institute of Biochemistry of Ukraine NAS, Kiev, Ukraine  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

The composition of biologically active substances intended for increase of stability of an alive organism to unfavorable factors had been developed on the basis of results of fundamental investigation. The composition was selected by a principle of synergic actions of several biologically active compounds (vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, E, methionine) on limitative reactions of a cellular metabolism. This combination has made a basis of the vitaminous complex that has received name "Metovitan". The directional activation of reactions of transsulfonation and transmethylation by Metovitan contribute to increase of synthesis of glutathione - natural peptide which is the important component of biochemical system of antioxidant protection and takes part in reactions of detoxication of foreign substances, lipo- and hydro-peroxides.

Ability of the biologically active supplementation to normalize a cellular metabolism in tissues of rats with models of chronic alcoholism and its cancellation (model abstinence) has been investigated. As biochemical criteria for an estimation of efficiency of the complex in normalization of the metabolic derangements caused by alcohol, such parameters have been analysed: a level of reduced glutathione in a brain and a liver, the contents of homocysteine, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in blood, coenzyme Q in cardiac muscle, the contents of separate vitamins and coenzymes in a liver (in particular, vitamins B<sub>1</sub>, E, B<sub>3</sub>, NAD, thiaminediphosphate), formation of malonic dialdehyde by homogenates of a brain and a liver, activity of some enzymes, such as, alcoholdehydrogenase and aldehydedehydrogenase in blood, acetylcholine esterase in the isolated nervous terminales of rat brain. Ratio RNA/DNA has been used as the integrated parameter reflecting intensity of an exchange of proteins in tissues. The special attention has been devoted to study of influence of ethanol consumption on parameters of vitamin B<sub>1</sub> (thiamine) metabolism in brain tissue, because the neurodegenerative changes, which take place at disease Wernike-Korsakova (may be observed at chronic alcoholism) are supposed to be consequence of the damages in an exchange and functioning of this vitamin in the conditions of chronic alcohol consumption. Therefore the contents of thiamine, thiaminediphosphate (ThDP) and its oxidized form, activity of thiaminekinase and ThDP-dependent enzymes were determined in a tissue of a brain of experimental animals

The most part of these parameters were changed drastically in tissues of animals which long time consumed alcohol. The data obtained demonstrate first of all the negative influence of alcohol on metabolism of sulfur-containing substances (thiamine also belongs to this category) and processes of transmethylation. The results of our investigation have also shown that the part of metabolic changes caused by long-term usage of alcohol, can be caused by direct influence of ethanol or its metabolites on those or other enzymatic proteins, and their functions can quickly be normalized after the abolition of alcohol (NAD contents, a-ketoglutarate dehydrogenase activity and some others). But such parameters as the contents of glutathione, homocysteine, folic acid, coenzyme Q, RNA/DNA relation were not normalized even in 7 days after cancellation of alcohol if preparation Metovitan was not entered by an animal at this time.

The preparation was entered by an animal *per os* every day during 7 final days on a background of the use of alcohol in case of model of chronic alcoholism or during 3 and 7 days after a cancellation of consumption of alcohol in case of model of abstinence. The analysis of the received data has shown, that in the first case introduction of the preparation promoted correction (partial or full) of the majority of the metabolic disturbances caused by the use of alcohol, however his positive action was more expressed on model of abstinence. In the latter case the preparation considerably accelerated normalization of metabolism of vitamin B<sub>1</sub> in a brain and a liver, contributed to the normalization of the content of reduced glutathione in these tissues, contents of a folic acid in blood, coenzyme Q in a cardiac muscle. Results of the research testify that the most expedient can be use of the preparation during rehabilitation of patients with alcoholic dependence. They also testify that the preparation Metovitan can be effective hepatoprotector. This assumption has been confirmed on a model of toxic hepatitis, and also by the fact of reduction almost in 2 times of LD<sub>50</sub> size for paracetamol

The other composition (Kardiovit) has been developed with help of using of above mentioned principle. The preparation is intended for preventive maintenance and treatment of cardiovascular diseases and its effectiveness has been shown on models of hypoxic hypoxia and myocarditis with the help of biochemical and histochemical methods. The scientifically-grounded composition of biologically active substances makes its basis. The main idea of the composition consists in activation of the endogenic synthesis of biologically active form of vitamin B<sub>1</sub> - ThDP ("cocarboxylase") with the purpose of activation of cellular metabolism and stabilization of the function of cardiac muscle. It is supposed, that Kardiovit can be effective replacement of a medicine "Cocarboxylase" at its introduction in an organism *per os* as tablets or capsules.



## ЗМІНИ ЛІПІДНОГО СКЛАДУ КЛІТИН МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ ТА Д-ГІПОВІТАМІНОЗУ

Пасічна Е. П., Донченко Г. В., Морозова Р. П., Алуховська Л. І.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна  
e-mail: ellap@biochem.kiev.ua

Серед захворювань нервової системи для багатьох країн Європи і США розсіяний склероз (РС) є найбільш розповсюдженим нейродегенеративним захворюванням, яке характеризується процесами загибелі нервових клітин і демієлінізації центральної і периферійної нервової системи. Незважаючи на інтенсивні дослідження та активні пошуки нових стратегій лікування в усьому світі, залишається багато питань щодо механізмів його виникнення та розвитку. Відомо, що недостатність в організмі вітаміну Д є одним із важливих екзогенних факторів ризику захворюваності людей. У хворих на РС часто спостерігаються аномалії рецепторів цього вітаміну, а також знижений рівень у крові його активних метаболітів. Існують також численні дані про те, що в умовах експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), що є моделлю РС, дефіцит вітаміну Д<sub>3</sub> посилює аутоімунне пошкодження нервової системи. У досліджах *in vitro* вітамін Д<sub>3</sub> ефективно запобігає апоптозу клітин різного типу. Механізми цієї загибелі клітин опосередковуються метаболітами фосфоліпідів (ФЛ), зокрема сфінгомієліну (СМ), що разом із холестеролом (Х) утворюють мембранні платформи (rafts), а вітамін Д<sub>3</sub>, зв'язуючись з мембранними рецепторами, які знайдено в клітинах мозку, має здатність впливати на активність деяких фосфоліпаз в клітині. Тому метою даної роботи було вивчення ліпідного складу, співвідношення та швидкості обміну головних мембранних ліпідів фракції головного мозку щурів, збагачених на гліальні клітини та нейрони, а також збагаченої на мієлін білої речовини мозку за умов різних стадій розвитку ЕАЕ, а також Д<sub>3</sub>-гіповітамінозного стану та його корекції за допомогою вітаміну Д<sub>3</sub> у поєднанні з вітаміном Е.

Для моделі ЕАЕ використовували щурів-самців масою 150-200 г лінії Wistar. Тварин імунізували за допомогою суміші з очищеного гомологічного мієліну і повного ад'юванта Фрейнда. Дослідження проводили на 11-у, 21-у і 27-у добу після імунізації тварин, що відповідає різним стадіям розвитку захворювання — латентному періоду, періоду клінічних симптомів та термінальній стадії або періоду ремісії. Для створення моделі Д-гіповітамінозу щурів масою 40 – 45 г цієї ж лінії протягом 30-ти днів витримували на спеціальному раціоні без вітаміну Д зі зниженою кількістю кальцію і фосфату, при цьому одній групі щурів до раціону додавали по 40 МЕ вітаміну Д<sub>3</sub> кожній тварині один раз на добу, другій і третій — до вітаміну Д<sub>3</sub> додавали вітамін Е у дозах 0,6 МЕ і 6 МЕ відповідно. Клітинні фракції нейронів і нейроглії (олігодендроцити) отримували методом Селлінджера. Ліпіди екстрагували за методом Фолча, вміст індивідуальних фосфоліпідів визначали за неорганічним фосфатом після розділення методом Васьковського, холестеролу — за реакцією ЕМА. Для вивчення обміну ліпідів визначали включення <sup>14</sup>С-ацетату в ліпіди клітин.

Було виявлено, що гліальні клітини кори головного мозку є більш чутливими до ураження в умовах аутоімунної деструкції мієліну і першими залучаються до патологічного процесу. Вже на ранній стадії розвитку ЕАЕ в них відбувається підвищення вмісту Х по відношенню до ФЛ із збільшенням вмісту та прискоренням синтезу більшості фосфоліпідів, особливо СМ, і зниженням співвідношення Х:СМ. Аналогічні зміни у даному періоді розвитку ЕАЕ відбуваються й у білій речовині мозку. На стадії початкових неврологічних розладів у нейроглії і в білій речовині спостерігається зниження відносного вмісту фосфатидилінозитолу і СМ, обмін якого залишається прискореним, при цьому суттєво підвищується молярне співвідношення Х:СМ і вміст фосфатидилсерину (ФС). При цьому вміст інших фосфоліпідів не зазнає достовірних змін. Це може свідчити про активацію у глії СМ-ового циклу з накопиченням цитотоксичних метаболітів і залучення біоефекторних фосфоліпідів у механізми демієлінізації. До того ж порушені співвідношення Х:ФЛ та Х:СМ у мембранах гліальних клітин та мієліну можуть призводити до зміни густини їхнього ліпідного шару і утворення менш стабільної структури, впливаючи на функції мембранних білків, що також може мати значення в патогенезі захворювання. Що стосується фракції нейронів, то в них на ранній стадії ЕАЕ відбувається зниження вмісту ФС та Х:ФЛ, підвищення якого та Х:СМ відбувається на термінальній стадії розвитку захворювання.

За умов Д-гіповітамінозу в клітинах глії та білій речовині мозку, як виявилось, відбуваються аналогічні до початкових стадій ЕАЕ зміни вмісту Х, СМ, ФС та співвідношень Х:ФЛ та Х:СМ, а в нейронах, подібно до ЕАЕ, знижується вміст ФС і співвідношення Х:ФЛ. Застосування вітаміну Д<sub>3</sub> усувало виявлені порушення у ліпідному складі клітин мозку. При цьому при застосуванні разом із вітаміном Д<sub>3</sub> вітаміну Е у дозі 0,6 МЕ відбувалася не тільки нормалізація Х:ФЛ у нейронах та Х:СМ у гліальних клітинах, а й суттєве підвищення рівня фосфоліпідів в клітинах, аж до повної нормалізації по відношенню до інтактних тварин. Застосування вітаміну Е у дозі 6 МЕ у поєднанні з Д<sub>3</sub> позначилося більшим підвищенням рівня фосфоліпідів у нейронах і кращим відновленням співвідношення Х:ФЛ у гліальних клітинах.

Отримані дані дозволяють припустити, що недостатність в організмі вітаміну Д<sub>3</sub> впливає на метаболізм і вміст деяких ліпідних компонентів у нервових клітинах, що може підвищувати їх чутливість до ураження. Очевидно, що позитивний вплив вітамінів Д<sub>3</sub> та Е за умов аутоімунних демієлінізаційних станів можна пояснити, поряд із нормалізацією рівня прозапальних цитокінів в організмі, стабілізацією мембранних структур і сигнальних механізмів клітин центральної нервової системи.



**THE CHANGES OF LIPID CONTENT OF RAT BRAIN CELLS UNDER CONDITION OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND D-DEFICIENCY**

*Pasichna E. P., Donchenko G. V., Morozova R. P., Apukhovska L. I.*

Palladin Institute of biochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: ellap@biochem.kiev.ua

Multiple sclerosis (MS) is one of the most widespread neurodegenerative diseases in many European countries and the USA. This disease is characterized by the death of nervous cells and demyelination of the central and peripheral nervous system. In spite of the numerous investigations and active searches of new strategies for its treatment in the world there are many problems concerning the mechanisms of the origin and development of this disease. It is well known that vitamin D deficiency is one of the important exogenous risk factors of morbidity of people. MS patients often have abnormal receptors of this vitamin and the decreased level of vitamin D active metabolites in blood. It was also shown that vitamin D deficiency enhanced autoimmune damage of the nervous system under conditions of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), which is the model of MS. Vitamin D<sub>3</sub> effectively prevents the apoptosis of different cells in vitro. The apoptosis mechanisms are mediated by phospholipid (PL) metabolites, particularly sphingomyelin (SM), that in common with cholesterol (Ch) are able to create membrane rafts, meanwhile vitamin D<sub>3</sub>, binding with membrane receptors, which are found in brain cells, makes influence on the activities of some phospholipases. Therefore the aim of this investigation was to study the lipid content, the ratio and the rate of exchange of main membrane lipids from the fractions of rat brain, which were enriched on glial cells and neurons and the enriched on myelin white matter of brain at the different stages of development of EAE and at D<sub>3</sub> deficiency and its correction by the vitamin D<sub>3</sub> in combination with the vitamin E.

We used Wistar rats males, weight 150-200 g for the EAE model. The immunizations was carried out by the mixture of purified homologous myelin and complete Freund's adjuvant. The investigations were done at 11th, 21st and 27th days after animal immunization, that was in accordance with the different stages of the disease development — latent period, clinical symptom period and terminal period or remission. To make a model of D-deficiency the rats (40 – 45 g weight each animal) were fed by special food without vitamin D with the decreased amount of calcium and phosphate during 30 days. One group of rats obtained 40 IU of vitamin D<sub>3</sub> for each animal per day, animal from the second and third group obtained vitamin D<sub>3</sub> plus vitamin E in doses 0, 6 IU and 6 IU correspondingly. Cellular fractions of neurons and neuroglia were obtained by Sellinger method. Lipids were extracted by Folch method, individual phospholipids content was determined according to inorganic phosphate after TLS separation by Vaskovski method, cholesterol was determined according EMA reaction. To study of lipid turnover we determined of <sup>14</sup>C-acetate inclusion in cellular lipids.

It was shown that glial cells of brain cortex were more sensitive to damage under conditions of autoimmune myelin destruction, they were first ones that were involved in pathological process. At the first stage of EAE this cells were characterized by the increased content of Ch in relation to PL with the increased content and synthesis of the most phospholipids, especially SM, and by decreased ratio Ch:SM. The similar changes were observed for white matters of brain in the same stage of EAE. At the stage of the initial neurological disorders it was noticed the decrease of the relative content of phosphatidilinositol and SM in neuroglia and white matter of brain. At the same time the molar ratio Ch:SM and content of phosphatidylserine (PS) were essentially increased. The content of the other phospholipids was not changed significantly. It could be explained by activation of SM-cycle in glia with the accumulation of cytotoxic metabolites and participation of bioeffector phospholipids demyelination mechanisms. Besides, the changes in ratio Ch:PL and Ch:SM in the membranes of glia and myelin could lead to the change of lipid layer density and to the formation of less stable structure. It could make influence on the function of membrane proteins and could be important feature for the disease pathogenesis. At the first stage of EAE in the neuron fraction the content of PS and the ratio Ch:PL were decreased. The increase of the last one and Ch:SM were noticed at the final stage of the disease development.

As it was shown under conditions of D- deficiency there were similar changes of the ratio Ch:PL and Ch:SM and the content of Ch, SM, PS in glial cells and white matter of brain, meanwhile in neurons it was noticed the decrease of both PS level and ratio Ch:PL, that was similar with EAE. Application of vitamin D<sub>3</sub> leads to renovation of the normal lipid content in brain. When vitamin E in dosage of 0, 6 IU was used in common with vitamin D<sub>3</sub> observe the normal ratio Ch:PL in neurons and Ch:SM in glial cells and essential increase of phospholipids content in the cells till normal level. When vitamin E was used in dosage of 6 IU in common with vitamin D<sub>3</sub> we could notice the increased level of phospholipids in neurons and the better renovation of Ch:PL ratio in glial cells.

The obtained data let us suggest that vitamin D<sub>3</sub> deficiency make influence on the metabolism and content of lipid components in nervous cells that could increase their sensitivity toward damage. Obviously, the positive influence of D<sub>3</sub> and E vitamins under condition of autoimmune demyelination could be explained by the stabilization of both membrane structure and signal mechanisms of the central nervous system.





## ЭНТОМОТОКСИНЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* И ИХ РОЛЬ В БИОКОНТРОЛЕ ЧИСЛЕННОСТИ НАСЕКОМЫХ

Патыка<sup>1</sup> В.Ф., Патыка<sup>2</sup> Т.И., Кандыбын<sup>2</sup> Н.В.

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup> Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия  
e-mail: vpatyka@mail.ru;<sup>1</sup> patykatatyana@mail.ru<sup>2</sup>

Спорообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) являются наиболее распространенными агентами биологического (микробиологического) контроля численности насекомых. Как известно, производимые биопрепараты на основе *Bt* содержат в себе в качестве действующих веществ споры, кристаллический эндотоксин и часть из них – термостабильный экзотоксин, а также ряд других, менее значимых метаболитов. Действие указанных компонентов и обуславливает в основном энтомоцидный эффект. Штаммы некоторых разновидностей *Bt* в процессе роста и развития образуют и выделяют в питательную среду ряд метаболитов, обладающих весьма высокой инсектицидной активностью. Например, спектр действия термостабильного экзотоксина значительно шире, нежели спектр спорокристаллического комплекса. В плане патологического эффекта действия на насекомых важно, что экзотоксин может действовать не только при заражении перорально, но и контактно, то есть через покровы насекомых, а в комбинации со спорокристаллическим комплексом он является синергистом. Это, в свою очередь, расширяет сферу применения экзотоксинсодержащих препаратов *Bt*. Их используют для снижения численности чешуекрылых насекомых, а также представителей отрядов *Coleoptera*, *Diptera*. Таким образом, наличие в препаратах *Bt* трех основных энтомоцидных компонентов (спор,  $\delta$ -эндотоксина и  $\beta$ -экзотоксина) не только усиливает энтомоцидный эффект, но, что очень важно, расширяет спектр их действия. Но, напомним, что разновидности *Bt* значительно варьируют по составу энтомоцидных компонентов, локализованных главным образом в кристаллах.

Разносторонние эффекты *Bt* и ее энтомотоксинов, как составных частей препаратов, складываются из разных параметров, обусловленных взаимоотношением патогена и его хозяина (целым спектром прямых и последовательных воздействий патогена на своего хозяина). Так, из серии опытов, выполненных с яйцекладками различных видов насекомых и клещей, установлено, что экзотоксин обладает овицидным действием (гибель эмбрионов). Яйца непарного шелкопряда при этом погибали на 20-100%, пчелиной огневки – 27,8%, озимой совки – 49,9%, комнатной мухи – 50%, иксодовых клещей – 70%, колорадского жука – 100%, в зависимости от концентрации экзотоксина. Выявлено, что для каждого вида существуют определенные периоды, когда яйцо более чувствительно или более резистентно к воздействию экзотоксина.

Пораженные экзотоксином насекомые в значительной мере утрачивают вредоносность и способность к размножению. При этом важно, что снижение их вредоносности может сказываться еще до заметного снижения уровня численности популяции насекомого.

Лабораторно-полевыми исследованиями установлено, что 0,5-1,0% концентрация биопрепарата на основе *BtH<sub>1</sub>*, содержащего смесь спор, токсинов и сопутствующих метаболитов, примененного против яиц колорадского жука, патогенна для личинок и вызывает их гибель (88,8-99,4%). Отмечается и гибель 8,1-13,8% яиц. Таким образом, действие комплексного препарата *Bt* при обработке яиц насекомого-вредителя проявляется путем инфицирования личинок во время прогрызания хориона при вылуплении из зараженных яиц или при поедании зараженного корма сразу после вылупления.

Для подавления численности и эффективного контроля вредоносных насекомых используются преимущественно биопрепараты *Bt*, с высоким содержанием активированного  $\delta$ -эндотоксина (как основного действующего фактора. Например, датский препарат новодор, российский препарат колорадо /ГНИИ Генетика/, биоагентом которых является *Bt ssp. tenebrionis*) или экзотоксинсодержащие препараты, например, битоксибациллин, бацикол /Россия, ГНУ ВНИИСХМ/, биоагентами которых являются *Bt ssp. thuringiensis*, *Bt ssp. darmstadiensis* соответственно и другие. Накоплен богатый фактический материал по лабораторным, полевым и производственным испытаниям специфического инсектицидного действия этих препаратов относительно личинок жуков-листоедов и жуков некоторых других семейств в разных регионах России, Украины, Беларуси.

Овицидные, антифидантные, ларвицидные, тератогенные и другие свойства энтомотоксинов *Bt*, вызывая соответствующие эффекты у насекомых тем самым не только усиливают действие препаратов, содержащих токсины, но и удлиняют сроки этого действия, вплоть до дочерних поколений.

Следовательно, суммарный эффект действия энтомотоксинов и сопутствующих метаболитов намного выше первичного (летального), так как он формируется из последующих воздействий на популяционном уровне. Комбинация разных протоксинов *Bt* может существенно влиять на активность их взаимодействия в организме насекомого, предотвращая непродуктивное связывание или наоборот, проявляя синергизм действия. Поэтому изучение роли энтомотоксинов разной природы в патогенезе видового состава восприимчивых насекомых перспективно в плане понимания определенных механизмов действия биоагентов препаратов и совершенствования технологий их эффективного использования (разработке оптимальных условий производства биоинсектицидов, осуществлению целенаправленного скрининга продуктивных штаммов микроорганизмов и др.).



**ENTOMOTOXINS *BACILLUS THURINGIENSIS* AND THEIR ROLE  
IN THE BIOCONTROL OF NUMBER OF INSECTS**

*Patyka*<sup>1</sup> V.F., *Patyka*<sup>2</sup> T.I., *Kandybin*<sup>2</sup> N.V.

<sup>1</sup>Institute of microbiology and virology of D.K.Zabolotnogo NAN Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>The state scientific institute the All -Russia research institute of agricultural microbiology of RAAS, St. Petersburg, Pushkin, Russia  
e-mail: vpatyka@mail.ru;<sup>1</sup> patykatyana@mail.ru <sup>2</sup>

Spore-forming bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are the most widespread agents of the biological (microbiological) control of number of insects. As is known, made biological products on the basis of *Bt* comprise as operating substances disputes, crystal endotoxin and a part from them - thermostable exotoxin, and also a number of others, less significant metabolites. Action of the specified components also causes basically entomocycle effect. Strains some versions *Bt* in the course of growth and development form and allocate in a nutrient medium a number metabolites, possessing rather high insecticidal activity. For example, the spectrum of action thermostable exotoxin is much wider, rather than a spectrum of a sporo-crystal complex. In respect of pathological effect of action on insects important, that exotoxin can operate not only at infection per os, but also contact, that is through covers of insects, and in a combination with sporo-crystal complex it is synergist. It, in turn, expands application sphere preparations with exotoxin *Bt*. Them use for number decrease lepidopterous insects, and also representatives of groups *Coleoptera*, *Diptera*. Thus, presence in preparations *Bt* of three basic entomocycle components (dispute,  $\delta$ -endotoxin and  $\beta$ -exotoxin) not only strengthens entomocycle effect, but, that is very important, expands a spectrum of their action. But, we will remind, that versions *Bt* considerably vary on structure entomocycle the components localised mainly in crystals.

Versatile effects *Bt* and it entomotoxins as components of preparations, develop of the different parametres caused by mutual relation pathogen and its owner (the whole spectrum of direct and consecutive influences pathogen on the owner). So, from a series of the experiences executed with ovipositions of various kinds of insects and ticks, it is established, that exotoxin ovidical action (destruction of embryos). Eggs of an unpaired silkworm thus perished on 20-100 %, bee pyralid - 27,8 %, winter scoops - 49,9 %, a room fly - 50 %, ticks (*Ixodidae*) - 70 %, Colorado beetle - 100 %, depending on concentration exotoxin. It is revealed, that for each kind there are certain periods, when egg more sensitively or more resistance to influence exotoxin.

Amazed exotoxin insects appreciably lose injuriousness and ability to reproduction. It is thus important, that decrease in their injuriousness can affect even before appreciable decrease in level of number of population of an insect.

Laboratory-field researches establish, that 0,5-1,0 % concentration of a biological product on the basis of *BtH<sub>1</sub>*, containing a mix dispute, toxins and accompanying metabolites, applied against eggs Colorado beetle a bug, pathogenic for larvae and causes their destruction (88,8-99,4 %). The destruction of 8,1-13,8 % of eggs is marked also. Thus, action of complex preparation *Bt* at processing of eggs of an insect-wrecker is shown by infection larvae during time gnaw through chorion at eclosion from the infected eggs or at eating of the infected forage right after eclosion.

For suppression of number and an effective control of harmful insects biological products *Bt*, with the high maintenance activated  $\delta$ -endotoxin (as basic operating factor are used mainly. For example, the Danish preparation Novodor, the Russian preparation Colorado /Institute of genetics/ which bioagent is *Bt ssp. tenebrionis*) or exotoxin preparations, for example, Bitoxibacillin, Bacikol /All -Russia research institute of agricultural microbiology/ which bioagents are *Bt ssp. thuringiensis*, *Bt ssp. darmstadiensis* accordingly and others. The rich actual material on laboratory, field and industrial tests specific insecticidal activity of these preparations concerning larvae of leaf-cutting beetle and bugs of some other families in different regions of Russia, Ukraine, Belarus is saved up.

Ovicidal, larvicidal, teratogenic and other properties entomotoxines *Bt*, causing corresponding effects at insects thereby not only strengthen action of the preparations containing toxins, but also extend terms of this action, up to affiliated generations.

Thus, total effect of action entomotoxines and accompanying metabolites much more above primary (lethal) as it is formed of the subsequent influences on population level. The combination different protoxins *Bt* can essentially influence activity of their interaction in an organism of an insect, preventing unproductive linkage or on the contrary, showing synergism actions. Therefore role studying entomotoxins the different nature in pathogenesis specific structure of susceptible insects is perspective in respect of understanding of certain mechanisms of action of bioagents of preparations and perfection of technologies of their effective utilisation (working out of optimum conditions of manufacture bioinsecticides, to realisation of purposeful screening productive strains microorganisms, etc.).



### **6-АЗАЦИТИДИН КСИЛОФУРАНОЗИД ПРИГНІЧУЄ ПРОДУКЦІЮ ОКСИДУ АЗОТУ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ MCF-7**

*Перепелиціна О.М.\* , Шевченко Є.А.\*\* , Скопенко О.В.\*\* , Гарманчук Л.В.\*\* , Алексєєва І.В.\*\*\* ,  
Пальчиковська Л.Г.\*\*\* , Сидоренко М.В.\**

\* Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Київ, Україна

\*\*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

\*\*\*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

e-mail: olenaquail@rambler.ru; Liudmylagarmanchuk@rambler.ru

Прогресія пухлинного росту може йти декількома шляхами, один з найважливіших - прогресія в напрямку інвазії та метастазування. В інвазії пухлинних клітин задіяні безліч сполук. Серед них слід виділити оксид азоту (NO) - один із важливих чинників, що відіграє значну роль в індукції канцерогенезу, промоції пухлинного росту та неоангіогенезі.

Мета даного дослідження стосувалася пошуку інгібіторів продукції оксиду азоту пухлинними клітинами MCF-7 (рак молочної залози). Серед хімічних агентів з протипухлинною дією відома низка представників класу нуклеозидів, у тому числі - цитозин-арабінозид, 5-азацитидин і його біоізостер – 6-азацитидин (6-азаС). Спираючись на існуючі дані щодо значного антилейкозного ефекту арабінозидів та ксилофуранозидів цитозину і аденіну наші дослідження було спрямовано на визначення протипухлинних властивостей таких же глікозидних аналогів 6-азацитидину, враховуючи низьку токсичність цього препарату. Ксилофуранозид 6-азацитозину виявив суттєвий цитотоксичний ефект по відношенню до клітин MCF-7, який підсилювався за умов активації ЕФР-Р.

Наступним етапом дослідження протипухлинних властивостей цього нуклеозиду було визначення його впливу на продукцію оксиду азоту - індуктора канцерогенезу - в клітинах MCF-7. Для цього використовували стандартну процедуру по визначенню продукції NO спектрофотометричним аналізом на мультисканері LabSystems Multiskan з використанням реактива Грісса (Griess, Sigma).

Визначено, що за стандартних умов культивування конститутивний рівень продукції NO клітинами MCF-7 складає  $7,8 \cdot 10^{-6}$  М -  $4,8 \cdot 10^{-5}$  М в розрахунку на  $1 \cdot 10^6$  клітин. При культивуванні клітин MCF-7 в середовищі з низьким вмістом (1%) або при відсутності ембріональної телячої сироватки (ETC) спостерігається підсилення продукції NO. При інкубації клітин з ксилофуранозидом в діапазоні концентрацій, що дорівнюють  $IC_{50}/5$  та  $IC_{50}/10$  для цього агенту по відношенню до клітин MCF-7, достовірно зафіксовано значне зниження рівня продукції NO (в 3,5 - 5 разів,  $p < 0,05$ ) в порівнянні з відповідним контролем. Також показано, що в цих концентраціях ксилофуранозид 6-азацитозину призводить до підвищення рівня апоптозу в клітинах MCF-7.

Таким чином, за результатами представленого дослідження механізм цитотоксичної дії ксилофуранозиду може визначатися через його опосередкований вплив на регуляцію експресії NO-синтази та рівня продукції NO в пухлинних клітинах лінії MCF-7.



**6-AZACYTIDINE XYLOFURANOZIDE SUPPRESSION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION  
BY MCF-7 TUMOR CELLS**

*Perepelitsyna E. M.*\*, *Shevchenko E. A.*\*\*, *Scopenko O. V.*\*\*, *Garmanchuk L. V.*\*\*, *Alexeeva I. V.*\*\*\*,  
*Palchykovska L. G.*\*\*\*, *Sydorenko M. V.*\*

\* Biotechnical problems of diagnostic Dep., Institute cryobiology and criomedicine NAS Ukraine, Kiev, Ukraine

\*\* Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kiev, Ukraine

\*\*\*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: olenaquail@rambler.ru; Liudmylagarmanchuk@rambler.ru

Tumor growth progression may be realized through several ways with one of the most important is the progression via invasion and metastasis. Tumor cells invasion involves multiple of compounds. Among them nitric oxide should be considered as one of the critical agents playing a significant role in induction of malignancy, promotion of tumor growth and neoangiogenesis.

Study was undertaken in an effort to search for inhibitors of nitric oxide production by MCF-7 tumor cells (cancer of mammary gland). Among the chemical agents showing anti-tumor effect there is a series of class nucleoside members including cytosine-arabioside, 5-azacytidine and its bioisoster – 6 azacytidine (6 azaC). Based on the data available as regards considerable anti-leucosis effect of cytosine and adenine arabiosides and xylofuranozides our investigation was aimed at determining anti-tumor properties of the same 6 azacytidine glycoside analogues considering low toxicity of this preparation. 6-azacytidine xylofuranozide related in essential cytotoxic effect relative to MCF-7 cells, which is promoted in conditions of EFR-R activation.

As the next step in studies of this nucleoside anti-tumor property it was suggested on estimation of its effect on nitric oxide (cancerogenesis inductor) production by MCF-7 cells. This was determined under standard procedure on detection of NO production by means of spectrophotometric analysis (multihole scanner Labsystems Mutiscan) using Griess reagent (Griess, Sigma).

Constitutive level of NO production by MCF-7 cells under standard conditions of cultivation was found to make up  $7.8 \times 10^{-6}$  M –  $4.8 \times 10^{-5}$  M as calculated per  $1 \times 10^6$  cells. During MCF-7 cell cultivation in the medium with low level of FBS (1%) or its absence there is increased NO production. MCF-7 cells incubation with xylofuranozide within the range of concentrations between  $IC_{50}/5$  and  $IC_{50}/10$  revealed statistically significant reduction of NO production (3.5 – 5 times,  $p < 0.05$ ) as compared with the relative control. In addition, these levels of 6-azacytidine xylofuranozide were shown to result in increased apoptosis.

Thus, by the results of presented investigation the mechanism of cytotoxic effect of xylofuranozide may be determined through its indirect effect on regulation of NOS expression and level of NO production in tumor cells of MCF-7 line.



**УНИКАЛЬНОЕ СОЧЕТАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
(НООТРОПНАЯ, АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ, АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ)  
5-АМИНО-ЭКЗО-3-АЗАТРИЦИКЛО[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]ДЕКАН-4-ОНА**

Петров Д.В.,<sup>1</sup> Зарудий Ф.А.,<sup>1</sup> Басченко Н.Ж.,<sup>1</sup> Докичев В.А.,<sup>1</sup> Томилов<sup>2</sup> Ю.В., Нефедов<sup>2</sup> О.М.

<sup>1</sup>УРАН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия  
e-mail: dokichev@anrb.ru

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва, Россия  
e-mail: tom@ioc.ac.ru

В клинических условиях довольно часто встречаются ситуации, связанные с нарушением ритма сердечных сокращений, в происхождении которых принимают нарушения микроциркуляции сосудов головного мозга (инсульт), приводящие к возникновению нарушений памяти, мышления и деятельности коры головного мозга. В связи с этим синтез и изыскание лекарственных средств, обладающих комбинацией фармакологической активностью (антиаритмической, ноотропной, антиагрегационной) является важной и актуальной задачей. В ряду синтезированных азотистых гетероциклов найдено соединение – 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он – обладающее широким спектром действия (патент РФ № 2281938). Проведенные фармакологические исследования показали, что данное соединение обладает антиаритмической активностью на моделях, воспроизводящих различные нарушения ритма сердца, включая наиболее опасную для жизни – фибрилляцию. По ряду фармакологических свойств 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он относится к ноотропным средствам, превосходя известные в настоящее время препараты; кроме того оно проявляет также противовоспалительную и анальгетическую активность.

Антиаритмическую активность 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она изучали на моделях аритмии, вызванных химическими веществами (аконитином, хлоридом кальция, хлоридом бария и строфантинном). В условиях введения аконитина 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он проявил антиаритмическое действие, значительно облегчая течение и характер аритмии, что выражалось в уменьшении возникновения желудочковой тахикардии и снижении частоты экстрасистол по сравнению с контролем. На хлоридбариевой модели аритмии способствовал переходу эктопических сокращений сердца на нормальный синусовый ритм и устранял такие симптомы проявления хлоридбариевой интоксикации, как спастическое сокращение мышц, миофибрилляция и непровольное мочеиспускание.

5-Амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он проявил специфическую ноотропную активность, положительно влияя на механизм формирования системы воспроизведения информации на модели условного рефлекса пассивного избегания. На модели нормобарической гипоксии с гилеркапнией оказывал противогипоксические эффекты, сходные с действием эталонных препаратов (фенотропил, пирацетам).

Изучение антиагрегационных свойств 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она с использованием индуктора агрегации АДФ методом Борна показало, что его введение животным (*in vivo*) и плазму крови крыс (*in vitro*) приводит к снижению максимальной амплитуды агрегации по сравнению с контролем на 50% и 25% соответственно. Во всех изученных дозах 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он улучшал реологические свойства крови, увеличивая время образования тромба, замедляя образование тромбина.

С целью поиска генов, дифференциально экспрессирующихся в клетках сердца крыс в ответ на однократное введение 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она, с помощью cDNA Expression Rat Array (BD Biosciences) проведен сравнительный анализ изменения экспрессионного статуса 588 генов одновременно. Анализ результатов гибридизаций позволил выявить ряд генов, меняющих транскрипционную активность, которые относятся к следующим функциональным группам: онкогены, опухолевые супрессоры, регуляторы клеточного цикла, стрессовые белки, модуляторы, эффекторы межклеточного сигналинга, гены белков ионных каналов, гены белков клеточного взаимодействия, метаболизма.

Острая токсичность (LD<sub>50</sub>) 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она составляет 680 мг/кг. Результаты изучения субхронической токсичности выявили его низкую кумулятивную активность. Длительное введение 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она в дозе 1/10 от LD<sub>50</sub> не снижало детоксицирующую функцию печени, не угнетало центральную нервную систему, не вызывало гибели животных и изменений в их поведении и массе. Показатели состава крови и ее биохимические параметры не выходили за пределы колебаний физиологической нормы.



**UNIQUE COMBINATION OF PHARMACOLOGICAL PROPERTIES (NOOTROPIC, ANTIAGGREGATION, ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY) OF 5-AMINO-EXO-3-AZATHREECYCLO[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]DECAN-4-ONE**

*Petrov<sup>a</sup> D. V., Zarudii<sup>a</sup> F. S., Baschenko<sup>a</sup> N. Zh., Dokichev<sup>a</sup> V. A.,  
Tomilov<sup>b</sup> Yu. V., Nefedov O. M..<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>Institution of the RAS Institute of Organic Chemistry of Ufa Scientific Centre of the RAS, Ufa, Russia  
e-mail: dokichev@anrb.ru

<sup>b</sup>N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia  
e-mail: tom@ioc.ac.ru

Under clinic conditions situations appear very often connected with the disturbance of cardiac rhythms caused by the disturbances of microcirculation of brain vessels (insult) which lead to the disturbances of memory, thinking and cerebral cortex activity. In connection with these facts, the synthesis and search for novel medicinal preparation possessing a combined pharmacological activity (antiarrhythmic, nootropic, antiaggregation) is an important and actual problem. Among nitrogen heterocycles synthesized the compound 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one was revealed, which possess a wide spectrum of the activity (Pat. RF № 2281938). The pharmacological studies showed that the compound possesses an antiarrhythmic activity on the models with various disturbances of cardiac rhythm including fibrillation being the most dangerous for life. In some pharmacological properties 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one relates to nootropic preparations and exceeds preparations known at present. Besides, it shows also an anti-inflammatory and analgetic activity.

An antiarrhythmic activity of 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one was studied on arrhythmia models induced with chemical compounds (aconitine, calcium chloride, barium chloride and strophanthin). After the injection aconitine 5-amino-*exo*-3-azathreecyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one showed an antiarrhythmic effect relieving considerably the course and character of arrhythmia: the probability of the appearance of ventricular tachycardia is decreased and extrasystole rate is reduced in comparison with control. On the arrhythmia model induced with barium chloride the compound promoted the transition of ectopic systole to the normal sinus rhythm, and eliminates such symptoms of the barium chloride intoxication as spastic muscular contraction, myofibrillation or enuresis.

5-Amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one showed a specific nootropic activity effecting positively the formation mechanism of the system of the information recollection on the model of the conditioned avoidance. On the model of normobaric hypoxia with hypercapnia the compound proved antihypoxia effects like the effects of standard preparations (phenotropil, piracetam).

The investigation of antiaggregation properties of 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one using an aggregation inductor ADF according to a Born method showed, that its injection to animals (*in vivo*) and into blood plasma of rats (*in vitro*) decreases maximum aggregation amplitude by 50% and 25%, respectively, in comparison with control. All the doses studied the compound improved rheologic blood properties and increased the time of the thrombogenesis, retarding the thrombinegenesis.

To search for genes expressing differentially in heart cells of rats in response to one-fold injection of 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one using cDNA Expression Rat Array (BD Biosciences) a comparative analysis of the change of the expression status of 588 genes simultaneously was carried out. The results allowed to reveal a series of genes changing their transcription activity, which relate to following functional groups: onkogenes, tumor suppressors, regulators of cells' cycle, stress proteins, modulators, effector of intercellular signaling, genes of proteins of ion canals, genes of proteins of cell interaction, and metabolism.

An acute toxicity (LD<sub>50</sub>) of 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one is 680 mg/kg. The results obtained during the investigation of subchronical toxicity showed its low cumulative activity. The introduction of 5-amino-*exo*-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one in dose 1/10 from LD<sub>50</sub> over a long period of time did not decrease the detoxication liver function, did not oppress central nervous system, did not lead to animals' death and changes in their behavior and mass. The blood indexes and the biochemical parameters did not exceed the limits of the variation of physiological standards.



## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И КВЕРЦЕТИНА НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ ТОКСИНАМИ

*Петрова Г. В., Донченко Г. В.*

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua

Митохондрия является основной субклеточной органеллой, обеспечивающей инициацию и развитие апоптоза. Среди биохимических событий в митохондриях, которые определяют гибель клетки, одним из основных является их оксидативное повреждение. Существуют многочисленные публикации относительно синергизма антиапоптотического действия  $\alpha$ -токоферола и флавоноида кверцетина, который связывают, в основном, с антиоксидантными свойствами данных молекул. Однако роль данных соединений в гибели клеток, индуцированной нарушением энергетического обмена в митохондриях, мало изучена. Цель работы - сравнительное исследование влияния  $\alpha$ -токоферола и кверцетина на выживаемость тимоцитов крысы при индукции их гибели ингибиторами переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий – 3-нитропропионовой кислоты (комплекс II), антимицина А (комплекс III) и олигомицина (комплекс V).

Жизнеспособность тимоцитов крыс определяли с использованием 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолий бромида (МТТ-тест). Содержание активных форм кислорода – по уровню флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресциндацетата.

**Результаты.**  $\alpha$ -Токоферол полностью предотвращал гибель тимоцитов крыс, вызываемую антимицином А и олигомицином, кверцетин же проявлял дополнительный цитотоксический эффект, снижая выживаемость клеток более чем в 2 раза по сравнению с действием токсинов. Индукция апоптоза антимицином А сопровождалась двукратным повышением внутриклеточного содержания активных форм кислорода, в то время как олигомицин не влиял на их продукцию клеткой. Кверцетин и  $\alpha$ -токоферол эффективно предотвращали образование активных форм кислорода, причем антиоксидантная активность кверцетина значительно превышала таковую для  $\alpha$ -токоферола. Это указывает на то, что антиоксидантное действие не является основным и единым механизмом ингибирования  $\alpha$ -токоферолом гибели клеток. При индукции гибели тимоцитов 3- нитропропионовой кислотой, чья токсичность обусловлена необратимым ингибированием сукцинатдегидрогеназы, также наблюдалась повышенная продукция активных форм кислорода и снижение их образования под действием исследуемых соединений. Однако при этом кверцетин практически полностью восстанавливал жизнеспособность клеток, в то время как цитопротекторное действие  $\alpha$ -токоферола оказалась значительно ниже по сравнению с таковым на фоне действия олигомицина и антимицина А. Можно допустить, что предотвращение  $\alpha$ -токоферолом апоптоза тимоцитов крысы, индуцированного непосредственным нарушением функционирования митохондрий, определяется не столько его антиоксидантной активностью, сколько интеграцией в мембраны митохондрий и стабилизацией их физико-химических параметров, что не свойственно кверцетину, не имеющему боковой изопреноидной цепи.

**Выводы.** 1. Кверцетин эффективно предотвращает гибель клеток, индуцированную блокаторами комплекса II митохондрий, однако обнаруживает дополнительный цитотоксический эффект к действию блокаторов комплексов III и V.

2.  $\alpha$ -Токоферол полностью устраняет цитотоксическое действие блокаторов комплексов III и V, и значительно менее эффективен относительно ингибитора комплекса II.

3. Цитопротекторное действие  $\alpha$ -токоферола и кверцетина не синергично и не коррелирует с их антиоксидантными свойствами.

4. В отличие от  $\alpha$ -токоферола, не оказывающего негативного воздействия на функционирование митохондрий, кверцетин проявляет как положительный, так и отрицательный эффект в зависимости от места блокады дыхательной цепи.



**EFFECTS OF A-TOCOPHEROL AND QUERCETIN ON RAT THYMOCYTES APOPTOSIS INDUCED BY MITOCHONDRIAL INHIBITORS**

*Petrova G.V., Donchenko G.V.*

A.V.Palladin Institute of biochemistry of NAN Ukraine, Kiev, Ukraine  
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua

Mitochondria are the main subcellular organelles supplying initiation and development of apoptosis. Among the biochemical events in mitochondria which determine the destruction of the cells, one of this is their oxidative damage. There are numerous publications about synergic anti-apoptotic actions of  $\alpha$ -tocopherol and flavonoid quercetin which connect, in the core, by their antioxidative properties. However the role of the given substances in the destruction of cells induced by disturbance of bioenergetics processes in mitochondria is little studied. The activity purpose - comparative research of influence of  $\alpha$ -tocopherol and quercetin on survival of rat thymocytes at an induction of their destruction by inhibitors of mitochondrial electron transport chain – 3-nitropropionic acid (a complex II), antimycin A (a complex III) and oligomycin (a complex V).

Cell death was determined with use of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT-test). The intracellular content of reactive oxygen species was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate.

**Results.**  $\alpha$ -Tocopherol completely prevented the rat's thymocytes destruction called by antimycin A and oligomycin but quercetin showed additional cytotoxic effect, reducing survival of cells more than in 2 times in comparison with action of toxins. The antimycin A-induced apoptosis was accompanied by double increase of the intracellular contents of reactive oxygen species while oligomycin did not influence on their production by cells. Quercetin and  $\alpha$ -tocopherol effectively prevented formation of reactive oxygen species, and antioxidant activity of quercetin considerably exceeded that  $\alpha$ -tocopherol. It indicates that antioxidative action is not the main and unified mechanism of  $\alpha$ -tocopherol inhibition of cells destruction. At a thymocytes apoptosis induction by 3-nitropropionic acid whose toxicity is caused by irreversible inhibition of succinat dehydrogenase, increased production of reactive oxygen species and decrease in their formation under the influence of investigated substances also was observed. However quercetin practically completely prevented of cells death while cytoprotective action of  $\alpha$ -tocopherol has appeared much lower in comparison with that against action of oligomycin and antimycin A. These results suggest that prevention of apoptosis induced by direct mitochondrial disturbance by  $\alpha$ -tocopherol is not determined its antioxidant activity, but integration into mitochondrial membranes and change of their physical and chemical parameters that is not peculiar to quercetin not having lateral isoprene tail.

**Conclusions.** 1. Quercetin effectively prevents the cell death induced by mitochondrial complex II blocker however finds out additional cytotoxic effect to action of complexes III and V blockers.

2.  $\alpha$ -Tocopherol completely eliminates cytotoxic action complexes III and V blockers and is much less effective concerning complex II inhibitor.

3. Cytoprotective action of  $\alpha$ -tocopherol and quercetin is not synergic and does not correlate with them antioxidative properties.

4. Unlike the  $\alpha$ -tocopherol which is not rendering negative effect on the mitochondrial function, quercetin shows both positive and a negative effect depending on a place of a respiratory chain blockade.





## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА «КОУРОХИТИН»

Петровичева С.Е. \*, Попов А.М. \*, Гафуров Ю.М. \*, Московкина Т.В. \*\*, Качанов А.В. \*\*

\*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Россия, Владивосток

\*\*Дальневосточный государственный университет, Россия, Владивосток

e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

Одной из самых опасных болезней, поражающих здоровье человека является рак. Поэтому в мире не прекращается поиск новых противоопухолевых и канцерпревентивных биопрепаратов, к которым можно отнести алкалоид хиназолинового ряда триптантрин (коурпитин) (ТР) (рис. 1). Этот алкалоид имеет широкое распространение среди различных растений, таких как *Isatis tinctoria* L., *Polygonum tinctorium* (*P. tinctorium*), а также синтезируется искусственным путем.

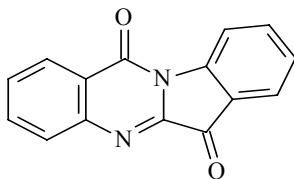


Рис. 1. Структурная формула триптантрин (6,12-гидро-6,12-диоксоиндоло-(2,1-б)-хиназолин).

ТР оказывает выраженное цитотоксическое действие в отношении различных линий опухолевых клеток человека, а также проявляет активность в отношении человеческих лейкоэмических клеток *in vitro*. Интересно, что низкие дозы ТР могут индуцировать дифференцировку лейкоэмических клеток, а высокие концентрации приводят к апоптотической гибели лейкозных клеток, вероятно, по пути каспаза-3/Fas.

Показано также, что ТР обладает антиканцерогенной активностью. При пероральном введении в дозе 50 мг/кг он уменьшает количество случаев рака кишечника у крыс, индуцированного азоксиметаном. ТР супрессирует колиты, индуцируемые декстран сульфатом у мышей, вероятно путем ингибирования продукции интерлейкина-2 активированными клетками селезенки. Помимо цитотоксической и антиканцерогенной активности, ТР обладает высокой специфичностью при действии на возбудителей различных микробных и протозойных инфекций.

В связи с тем, что ТР плохо растворим в биологических жидкостях, нами была разработана гелевая форма препарата, названная «Коурохитин», состоящая из двух компонентов ТР и хитозана. В настоящей работе мы оценили эффективность противоопухолевой активности препарата "Коурохитин" при пероральном маршруте введения отдельно и в сочетании с противоопухолевым препаратом алкилирующего действия циклофосфаном.

Для определения противоопухолевой активности препарата "Коурохитин" использовали экспериментальную модель аденокарциномы Эрлиха (асцитный вариант). Лечение животных с асцитной опухолью начинали через сутки после трансплантации  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток. Гелевую форму препарата вводили перорально в течение 5 дней в расчетной дозе 20 мг/кг.

Как показал эксперимент, препарат «Коурохитин» проявляет слабую противоопухолевую активность (УПЖ = 22,3%). Цитостатик циклофосфан в дозе 120 мг/кг при однократном внутривентральном введении увеличил среднюю продолжительность жизни 88,3% по сравнению с контролем. При применении препарата «Коурохитин» в сочетании с циклофосфаном нами был зарегистрирован синергический противоопухолевый эффект, при котором увеличение средней продолжительности жизни (УПЖ, в %) составило 100,1%. Таким образом, можно заключить, что гелевая форма препарата «Коурохитин» в сочетании с циклофосфаном обладает выраженным противоопухолевым эффектом.

При этом важно подчеркнуть, что ТР является преимущественным ингибитором 5-липоксигеназы и циклооксигеназы-2 - ферментов, экспрессия которых резко возрастает в период развития опухолевых и воспалительных процессов. ТР действует на 5-липоксигеназу как сильный специфический ингибитор, который имеет примерно в 2 раза более высокую активность, чем используемый в клинической практике, другой специфический ингибитор указанного фермента препарат zileuton, успешно применяемый при местном лечении рака кожи. Кроме того было показано, что ингибирование 5-липоксигеназы в опухолевых клетках значительно подавляет активацию ядерного фактора каппа В с последующим ингибированием клеточной пролиферации. Все сказанное выше возможно лежит в основе механизма противоопухолевого действия ТР в составе препарата «Коурохитин».



## STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF «COUROCHITIN» PREPARATION

Petrovicheva S.E. \*, Popov A.M. \*, Gafurov Yu.M. \*, Moskovkina T.V. \*\*, Kachanov A.V. \*\*

\*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok

\*\*Far East State University, Vladivostok

e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

One of the most dangerous illnesses amazing health of the person is the cancer. Therefore in the world search new antitumor and cancer preventing biological products to which it is possible to relate alcaloid quinazoline type tryptanthrin (couropitin) (TR) (fig. 1). This alkaloid has a wide distribution among various plants, such as *Isatis tinctoria* L., *Polygonum tinctorium* (*P. tinctorium*), and also is synthesized by artificial way.

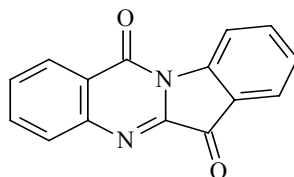


Fig. 1. The structural formula tryptanthrin (indolo [2, 1-b] quinazoline-6, 12-dione).

TR renders expressed citotoxic action concerning various lines of tumor cells, and also shows high activity concerning human leukemic cells *in vitro*. It is interesting, that low doses TR can induce a differentiation of leukemic cells, and high concentration lead to destruction of leukemic cells by apoptosis, probably, on a way caspase-3/Fas.

It is shown also, that TR possesses anticancerogenic activity. At peroral administration TR in a dose of 50 mg/kg reduces quantity of cases of intestine cancer induced of azoxymethane at the rats. TR also inhibited colitis, induced dextran sulfate at mice, it is probable by inhibition of production interleukin-2 the activated cells of a spleen. Besides cytotoxic and anticancerogenic activity, TR possesses high specificity of inhibition action to various microbial and protozoal infections.

Development of agents to overcome multidrug resistance (MDR) is important in cancer chemotherapy. TR could depress overexpression of MDR1 gene. The reduction of P-gp protein in parallel with decreases in mRNA in MCF-7/adr cells treated with TR was shown. Therefore, TR might be a new adjuvant agent for chemotherapy on resistant tumors.

In connection with that TR weakly dissolve in biological liquids; we had been developed gel form of preparation named "Courochitin", consisting of two components TR and chitosan. In the present work, we have estimated efficiency of antitumor activity of "Courochitin" preparation at peroral route of administration separately and in combination to an antitumor preparation of cyclophosphan alkylating action.

For definition of antitumor activity of "Courochitin" preparation used experimental model adenocarcinoma Ehrlich (ascitic variant). The treatment of mice with ascitic tumour began at the same day after transplantation  $3 \times 10^6$  tumoral cells. Gel form of preparation was administrated *per os* within 5 days at dose of 20 mg/kg.

As has shown experiment, "Courochitin" preparation has shown weak antitumor activity (increase life expectancy = 22,3%). Cytostatic agent of cyclophosphan in single dosing of 120 mg/kg at intraperitoneal administration has increased average life expectancy of 88,3% in comparison with the control. At application of "Courochitin" preparation in combination with cyclophosphan us was registered synergetic antitumor effect, at which the increase in average life expectancy has reached 100,1%.

Thus, it is possible to conclude, that gel form of "Courochitin" preparation in a combination with cyclophosphan possesses the expressed of antitumor effect. It is important to emphasize, that TR is primary inhibitor 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 enzymes, expression which sharply grows during development of tumoral and inflammatory processes. TR operates on 5-lipoxygenase as strong specific inhibitor which has approximately in 2 times higher activity, than used in clinical practice, other specific inhibitor there of enzyme - zileuton preparation, successfully used at local treatment of skin cancers. Besides, has been shown, that the inhibition 5-lipoxygenase in tumoral cells considerably suppresses activation of the nuclear factor kappa B with the subsequent of inhibition cellular proliferation. All told above probably underlies the mechanism of antitumor action TR in structure of "Courochitin" preparation.



## ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОСТАНОИДОВ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОРОСТКОВ ТРИТИКАЛЕ

Филипцова Г.Г., Амелянчик Ю.С.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь  
e-mail: filiptsovah@mail.ru

Одной из важнейших черт живого организма является упорядоченность и согласованность биохимических и физиологических процессов, которая может обеспечиваться только за счет их эффективной регуляции. Существенная роль в этом процессе принадлежит простаноидам, что обуславливает повышенный интерес к их синтетическим аналогам, как возможным регуляторам внутриклеточных процессов. Аналоги простагландинов обладают более специфическим и пролонгированным по сравнению с природными соединениями биологическим действием, поэтому могут использоваться при поиске путей управления физиолого-биохимическими механизмами нативной клетки и организма в целом.

Нами была исследована биологическая активность двух синтетических простаноидов, относящихся к простагландинам группы В – N-гептил-2-{3-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]фенокси}ацетамида (П-1) и метил-6-[4-оксо-3-(3-фенилпропил)-4,5-дигидрофуран-2-иламино] гексаноата (П-2), синтезированных в институте биоорганической химии НАН Беларуси. Было установлено действие различных концентраций ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  М) данных препаратов на скорость прорастания семян, рост coleoptилей, время появления и величину первого листа проростков тритикале, выращенных в водной культуре. Семена растений замачивали в растворах простаноидов в течение 24 часов, проростки выращивали в рулонах на растворе Кнопфа при естественном освещении.

Показано, что при предобработке семян П-1 в концентрации  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М энергия их прорастания увеличивается на 15 и 20 % соответственно;  $10^{-5}$  М – оказывает незначительное (10-15 %), а  $10^{-4}$  М сильное ингибирующее действие как на всхожесть семян, так и на энергию прорастания. В последнем случае эти показатели снижаются в 2,5-3 раза. Предобработка семян П-2 практически не влияет на всхожесть, однако вызывает незначительное снижение энергии прорастания (от 5 до 15 % с ростом от концентрации П-2).

Предобработка семян П-1 в концентрации  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М стимулирует рост растения: длина coleoptилей 3-дневных проростков увеличивается на 12-15 % по сравнению с контролем, а площадь 7-дневного листа тритикале на 17-20 %. Концентрация П-1  $10^{-5}$  М оказывает слабое (10-15 %) ингибирующее действие как на рост coleoptилей, так и на величину листа проростков тритикале,  $10^{-4}$  М приводит к снижению длины coleoptиля в 7-8 раз, а площадь первого листа уменьшается в 2,5-3 раза по сравнению с контролем.

Предобработка семян тритикале П-2 в концентрациях  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М вызывает увеличение длины coleoptиля и площади первого листа на 20-30 %, а  $10^{-4}$  М оказывает слабое ингибирующее действие на эти параметры по сравнению с контролем.

Исследованные простаноиды приводят к изменению не только морфометрических, но и биохимических характеристик 7-дневных листьев проростков тритикале. Предобработка семян  $10^{-6}$  М П-1 и П-2 вызывает увеличение концентрации хлорофиллов а и в и каротиноидов на 15 % и 25 %, количество ключевого фермента фотосинтеза – рибулозо-бисфосфат-карбоксилазы возрастает до 1,5 раз по сравнению с контролем. Более высокие концентрации данных препаратов приводят к снижению, как содержания фотосинтетических пигментов, так и РБФК. Содержание антоцианов в листьях увеличивается во всех вариантах опытов, особенно сильно (в 1,5-2 раза) этот показатель возрастает при обработке семян П-2 в концентрации  $10^{-6}$  М и П-1 в концентрации  $10^{-4}$  М.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что предобработка семян синтетическими простаноидами N-гептил-2-{3-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофуран-3-ил)метил]фенокси}ацетамидом и метил-6-[4-оксо-3-(3-фенилпропил)-4,5-дигидрофуран-2-иламино]гексаноатом в концентрации  $10^{-6}$  М вызывает увеличение активности ростовых и фотосинтетических процессов растений. Более высокие концентрации этих простаноидов приводят к снижению исследованных параметров.



## **INFLUENCE OF SYNTHETIC PROSTANOIDS ON MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF TRITICALE GERMS**

*Filiptsova Halina, Ameljanchik Julia*

Belarusian State University, Minsk, Belarus  
e-mail: filiptsovah@mail.ru

One of the most important characteristics of a living organism is order and coherence of its biochemical and physiological processes, which can be ensured only through their effective regulation. Important role in this process belongs to prostanoids, which explains increased interest in their synthetic analogs as possible regulators of intracellular processes. Analogs of prostaglandins have more specific and prolonged biological influence as compared with the natural compounds, and therefore can be used in the search for methods of controlling physiological and biochemical mechanisms of a native cell as well as an organism as a whole.

We have studied biological activity of two synthetic prostanoids which are B group prostaglandins: N-heptyl-2-[3-[(2-(heptylamino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl)methyl] fenoxi]acetamide (P-1) and methyl-6-[4-oxo-3-(3-fenylpropyl)-4,5-dihydrofuran-2-ylamino]hexanoate (P-2), which have been synthesized in the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus. Influence of various concentrations ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M) of these agents on germination speed, growth of coleoptiles, time of appearance and size of a first leaf of triticale germs grown in hydroculture has been determined. The plant seeds were soaked in prostanoids solutions for 24 hours; germs were cultivated in coils on Knopp's solution on natural light.

It was shown that after the seeds were pre-treated with  $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M concentration of P-1, their germination energy have increased by 15 and 20% correspondingly, while  $10^{-5}$  M led to slight and  $10^{-4}$  M led to significant inhibition of both germination and germination speed. In the latter case, the indicators have decreased by 2.5-3. Pre-treatment of seeds with P-2 did not affect their germination in any significant way, however led to a slight decrease in germination energy (5-15% depending on concentration of P-2 in the same way as above).

Pre-treatment of the seeds with P-1 with  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  M concentration stimulated growth of the plants: length of coleoptiles of 3-day germs increased by 12-15% compared to the control, and area of 7-day leaf increased by 17-20% compared to the control.  $10^{-5}$  M concentration of P-1 caused slight (10-15%) inhibition of both growth of coleoptiles and leaf size in triticale germs,  $10^{-4}$  M led to decrease in coleoptiles length by 7-8 times, while area of a first leaf decreased by 2.5-3 times compared to the control.

Pre-treatment of triticale germs by P-2 with  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M concentration led to increase both in coleoptiles length and area of a first leaf by 20-30%, while  $10^{-4}$  M led to slight inhibition of these characteristics compared to the control.

The studied prostanoids lead to the changes in both morphometric and biochemical characteristics of 7-day leafs of triticale germs. Pre-treatment of seeds by  $10^{-6}$  M P-1 and P-2 leads to increase in concentration of *a* and *ε* chlorophylls and carotinoids by 15 and 25%, while quantity of the key enzyme of photosynthesis – ribulose-bisphosphate-carboxylase (RBPC) - increases by 1.5 times compared to the control. Higher concentrations of these agents lead to decrease in quantity of both photosynthetic pigments and RBPC. Content of anthocyanins in leafs increase in all variants of the experiments, especially (by 1.5 – 2 times) when seeds are treated by P-2 with  $10^{-6}$  M and P-1 with  $10^{-4}$  M concentration.

Thus, the data obtained through the experiment indicates that pre-treatment of seeds by the synthetic prostanoids N-heptyl-2-[3-[(2-(heptylamino)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl)methyl] fenoxi]acetamide and methyl-6-[4-oxo-3-(3-fenylpropyl)-4,5-dihydrofuran-2-ylamino]hexanoate with  $10^{-6}$  M concentration leads to increase in growth and photosynthesis in plants. Higher concentrations of these agents lead to decrease in the studied parameters.



## ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОФОСФАМИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕРБЕРИНА

Потопальский А.И., Фильченков А.А., Завелевич М.П., Жаркова Л.Д., Рыбалко С.Л.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина  
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина  
Государственное учреждение "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского" АМН Украины, Киев, Украина  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Показано, что тиофосфорные производные некоторых химических соединений обладают противовирусной активностью [1]. На основе полученных тиофосфорных производных комплекса алкалоидов чистотела разработаны перспективные противоопухолевые препараты [1,2]. Противовирусные свойства тиофосфорных производных суммарных препаратов алкалоидов чистотела в малых дозах изучены в единичных исследованиях (исследования препарата "Амитозин" при вирусных полиартритах [3] и клинические исследования препарата "Украин" у больных хроническими гепатитами [4]). Показана и противовирусная активность отдельных алкалоидов чистотела в опытах *in vitro* [5]. Получение тиофосфосфамидных производных индивидуальных алкалоидов изохинолинового ряда позволяет исследовать противоопухолевые и противовирусные свойства таких соединений [6].

**Цель исследования:** Изучить противовирусные свойства тиофосфорного производного берберина – амитозиноберамида на моделях РНК- и ДНК-вирусных инфекций.

**Материалы и методы:** Амитозиноберамид (N', N'', N'''-три(N-бербериноэтиленамид) тиофосфорной кислоты) синтезирован А.И. Потопальским с сотрудниками. Очищенный и лиофилизированный препарат использовали в виде раствора в ДМСО. На культурах клеток МТ-4 (Т-клеточный лейкоз человека) и RK-13 (клетки почки кролика) определяли цитотоксичность препарата (ЦД<sub>50</sub>). Для изучения противовирусной активности использовали модели герпесвирусной инфекции *in vitro* (клетки RK-13, инфицированные вирусом герпеса 2-го типа) и экспериментальной гриппозной пневмонии беспородных мышей, инфицированных адаптированным к мышам вирусом гриппа A/Port Chalmers 1/73/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. Определяли эффективную дозу препарата (ЭД<sub>50</sub>) в отношении тестируемых вирусов. Противовирусную активность *in vitro* оценивали по снижению инфекционного титра вируса герпеса. На модели гриппозной инфекции *in vivo* рассчитывали индекс эффективности действия препарата по снижению летальности инфицированных мышей стандартными методами.

**Результаты:** В системе герпесвирусной инфекции *in vitro* выявлена противовирусная активность амитозиноберамида. При внесении препарата в дозе 0,25 мкг/мл за сутки до инфицирования вирусом (профилактическая схема введения) снижение инфекционного титра вируса составило 1,7 log<sub>10</sub>, а при внесении препарата после инфицирования (терапевтическая схема введения) снижение инфекционного титра вируса составило 2,5 log<sub>10</sub>. Указанное снижение было статистически достоверным и сопоставимым с таковым при внесении в культуру, инфицированную вирусом герпеса, противогерпетического препарата "Виролекс" (референс-препарат).

На модели экспериментальной гриппозной пневмонии у мышей было установлено, что амитозиноберамид при ежедневном введении сразу же после инфицирования (5 введений в дозе 0,3 мг/кг) достоверно снижает летальность мышей. Индекс эффективности амитозиноберамида составил около 50%, тогда как индекс эффективности референс-препарата "Тамифлю" в той же экспериментальной системе приближался к 75%.

Таким образом, показана противовирусная активность тиофосфамидного производного алкалоида берберина в малых дозах на моделях РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Механизмы противовирусного действия этого вещества требуют дальнейших исследований.

### Литература:

1. Потопальский А.И. Препараты чистотела в биологии и медицине / Киев: Наукова думка. – 1992. – 237с.
2. Habermehl D., Kammerer B., Handrick R., Eldh T., Gruber C., Cordes N., Daniel P.T., Plasswilm L., Bamberg M., Belka C., Jendrossek V. Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway // BMC Cancer. – 2006. – V. 6. – 14.
3. Абрагамович Е.С., Абрагамович О.О., Потопальский А.И., Абрагамович Я.Є. Перспективи лікування системних хвороб сполучної тканини амітозином. Матеріали міжнародного форуму "Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля" / Київ. 31.05-01.06 2005. – С. 12-14.
4. Волчек И.В., Нестеров Н.Н., Сологуб Т.В., Белопольская М.А., Григорьева Т.Д., Александрова В.И., Иванова В.В. Индивидуальная терапия вирусных гепатитов препаратами цитокинов и их индукторов // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 109-115.
5. Hayashi K., Minoda K., Nagaoka Y., Hayashia T., Uesato S. Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2007. V. 17 (No. 6). – P. 1562-1564.
6. Лозюк Л.В., Потопальский А.И., Лозюк Р.М. Медикаментозная терапия и профилактика вирусных инфекций / Львов: Норма. – 2003. – 208с.



## ANTIVIRAL ACTIVITY OF THIOPHOSPHAMIDE DERIVATIVE OF BERBERINE

Potopalskyi A.I., Philchenkov A.A., Zavelevych M.P., Zharkova L.D., Rybalko S.L.

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Kyiv, Ukraine  
 Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Kyiv, Ukraine  
 Public Institution "L.V. Hromashevskyi Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine  
 e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Thiophosphate derivatives of several compounds have been shown to possess antiviral activity. The promising anticancer drugs have been developed based on the complex of celandine alkaloids [1, 2]. There are only few reports on the antiviral activity of the thiophosphate derivatives of celandine alkaloids used at low doses. Amitosin was studied in viral polyarthritis [3]. Ukrain was studied in patients with the chronic hepatitis [4]. Antiviral activity of the individual celandine alkaloids was also shown *in vitro* [5]. The synthesis of thiophosphamide derivatives of the individual isoquinolin alkaloids is advantageous in assessing the antiviral activities of such compounds [6].

**Aim:** To study antiviral activities of thiophosphamide berberine derivative in the models of RNA and DNA viral infections.

**Materials and methods:** Amitosinoberamide (N', N'', N'''-tri(N-berberinoethylenamide) of thiophosphoric acid was synthesized by A. Potopalskyi with co-authors. The purified and freeze-dried preparation was used in culture as the solution in DMSO. The cytotoxicity (CD<sub>50</sub>) was assessed in MT-4 cells (T-cell human leukemia) and RK-13 cells (rabbit kidney). The antiviral activities were studied in the model of herpes virus infection *in vitro* (RK-13 cells infected with herpes virus type II) and the experimental model of flu-induced pneumonia in mice infected with mouse-adapted virus A/Port Chalmers 1/73/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. The effective dose of the preparation (ED<sub>50</sub>) was estimated. The antiviral activity *in vitro* was assessed by the decrease in the infectious titer of herpes virus. In the model of flu infection *in vivo* the efficacy index was calculated by the decrease in the lethality of mice using the conventional techniques.

**Results:** The activity of amitosinoberamide against herpes virus was shown *in vitro*. In the preventive mode of treatment, the substance at a dose of 0.25 μg/mL added to the culture one day before the infection resulted in decreasing the infectious titer by 1.7 log<sub>10</sub>. In the therapeutic mode of treatment, the infectious titer decreased by 2.5 log<sub>10</sub>. The decrease was statistically significant and comparable with that induced in cell culture by the conventional antiherpetic drug Virolex used as a reference drug.

In the model of the experimental flu-induced pneumonia in mice, the daily administration of amitosinoberamide (0.3 mg/kg for 5 days) decreased the death rate substantially. The efficacy index was about 50% as compared to 75% with Tamiflu used as a reference drug in the same experimental system.

To sum up, thiophosphamide berberine derivative at low doses was shown to possess the antiviral activities against RNA and DNA viruses. The further studies are required to elucidate the exact mechanisms of such antiviral activities.

### References:

- Potopalskyi AI. Celandine preparations in biology and medicine. Kiev: Naukova dumka, 1992. 237p (in Russian).
- Habermehl D., Kammerer B., Handrick R., Eldh T., Gruber C., Cordes N., Daniel P.T., Plasswilm L., Bamberg M., Belka C., Jendrossek V. Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. BMC Cancer 2006; 6: 14.
- Abrahamovich ES, Abrahamovich OO, Potopalskyi AI, Abrahamovich YaE. Perspectives for treatment of systemic diseases of connective tissues using amitosin. In International Forum "Fundamentals of molecular genetic health and environmental improvement" Kyiv 31.05-01.06 2005. P.12-14 (in Russian).
- Volchek IV, Nesterov NN, Sologub TV, Belopolskaya MA, Hryhorieva TD, Aleksandrova VI, Ivanova VV. Individual therapy of viral hepatitis with cytokines and their inducers. Cytokines and Inflammation 2002; 1 (2): 109-115 (in Russian).
- Hayashi K., Minoda K., Nagaoka Y., Hayashia T., Uesato S. Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007; 17 (6): 1562-1564.
- Loziuk LV, Potopalskyi AI, Loziuk RM. Medicamentous therapy and prophylaxis of viral infections. Lviv: Norma, 2003. 208p (in Russian).



## ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ ВЕТЕРИНАРНЫХ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МЕЛАТОНИНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

*Пунегова Л.Н., Шитова Т.С., Чурин С.И\*., Давлетханов И.Н\*., Папуниди К.Х\*.,  
Альфонсов В.А., Синяшин О.Г.*

Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: punegova@iopc.knc.ru

\*ФГУ «Федеральный Центр Токсикологической и Радиологической Безопасности Животных», Казань, Россия

Прогресс ветеринарной фармакологии обеспечивается постоянным поиском и созданием новых высокоэффективных препаратов, повышающих сохранность и продуктивность с/х животных. Нами показана перспектива применения для этих целей новых лекарственных имплантируемых средств на основе мелатонина - вещества, выполняющего в живом организме целый ряд жизненно важных функций (препарата Мелапол - активно действующее вещество мелатонин, препарат Мелапол Плюс - мелатонин и феназепам, препарат Ветамекс - мелатонин и ксимедон). В качестве полимерного носителя в этих препаратах использован полиэтилцианакрилат с молекулярной массой до 25000, обладающий аутостерильностью, биологической совместимостью с тканями живого организма, антибактериальными свойствами, способностью к метаболизму, что обеспечивает длительное пролонгированное действие (более 60 суток). Изучение поведения этих препаратов в организме крыс, кроликов, поросят при подкожной имплантации показало, что через 60 суток полной деструкции имплантатов не происходит. Визуально и микроскопически установлено, что деструкция опытных образцов начинается с поверхностных слоев гранул препаратов. Потеря массы гранул при испытаниях на крысах и кроликах для препаратов Мелапол и Мелапол Плюс составляет от 32 до 61%, на поросятах  $\approx$  50%. Препарат Ветамекс теряет от 83 до 90% соответственно, что связано с высокой растворимостью в воде входящего в его состав ксимедона. Исследование остатков гранул препаратов методом ИК спектроскопии показало, что спектры поверхностных слоев растворимой в хлороформе части остатков препаратов Мелапол и Мелапол Плюс отличаются от спектров исходных препаратов лишь уменьшением интенсивности полос поглощения, характерных для мелатонина и феназепама, относительно полиэтилцианакрилата. В спектрах остатков препарата Ветамекс наблюдается существенное снижение интенсивности полос поглощения ксимедона и мелатонина, что согласуется с приведенными данными по потере массы гранул препаратов в организме животных. Спектры сердцевин этих остатков практически идентичны спектрам исходных препаратов. Все это подтверждает сделанный на основе микроскопических и визуальных исследований вывод о том, что биодegradация препаратов происходит преимущественно в поверхностном слое - внешней диффузионно-кинетической области. При этом свойства материала не изменяется до разрушения верхнего слоя.

Изучение спектров нерастворимой в хлороформе части остатков препаратов позволило предположить присутствие в исследуемых образцах, кроме исходных компонентов, вещества пептидной природы (580, 1079, 1540, 1654, 3302  $\text{cm}^{-1}$ ). Совпадение дифференциального спектра вещества белковой природы со спектром материала капсул, образованных вокруг остатков гранул препарата под кожей животных, свидетельствует о том, что через 1 - 2 месяца биодegradация исследуемых препаратов прошла достаточно глубоко и перешла во вторую - клеточную стадию. Неполное рассасывание гранул препарата, на наш взгляд, связано с тем, что в составе полимерного носителя недостаточно полимерных фракций с более низкой молекулярной массой (от 400 до 2000 ед.). Установлено, что характерные для белков полосы в спектрах препаратов Мелапол и Мелапол Плюс появляются через 30 суток нахождения препаратов в организме животных. В спектрах остатков препарата Ветамекс появление белковой составляющей наблюдается уже на 5 сутки.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что биодеструкция препаратов на основе мелатонина протекает в 2 стадии: первая - неклеточная, протекающая в поверхностных слоях гранул препарата и вторая - клеточная, связанная с образованием новой соединительной ткани.

*Исследования проводятся при финансовой поддержке Фонда содействия малым формам бизнеса в научно-технической сфере (грант № 4983р/7404-2007) и ГНО «Венчурный Фонд Республики Татарстан» (грант № 28Н-2007).*



**INVESTIGATION OF BIODEGRADATION PROCESSES OF MULTICOMPONENT MELATONIN CONTAINING VETERINARY IMPLANTS**

*Punegova L.N., Shitova T.S., \*, Churin S.I. \*, Davletkhanov I.N, Papunidi K.C. \*,  
Alfonsov V.A., Sinyashin O.G.*

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry,  
Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia  
e-mail: punegova@iopc.knc.ru,  
\*FGU "FCTRB"

The progress of veterinary pharmacology is provided with constant search and creation of new high performance drugs for increasing of safety and productivity of farm animals.

This work describes the investigation of biodegradation processes of new veterinary preparations bearing one or two bioactive medicines: Melatonin (Melapol) Melatonin and Phenazepamum (Melapol Plus), Melatonin and Xymedon (Vetamex) in the organism of experimental animals: rats, rabbits and pigs.

As the polymeric carrier in these drugs polyethylcianoacrilate with molecular weight up to 25000 used, bearing autosterility, biological compatibility with tissues, antibacterial properties, ability to metabolism, that provides long prolonged action (more than 60 days).

It was established by IR spectroscopy, that the biodestruction proceeds from the surface layer of drugs, the composition of intrinsic part of preparations being the same. After the administration of the preparations they penetrate to collagenic tissue in 25-30 days for Melapol Plus and 5 day for Vetamex, giving capsule, which become more hard later owing to augmentation of collagenic fibers. After 1 - 2 months the biodegradation of researched drugs passes in the following cellular stage. We assume, that the incomplete resorption of granules of a drug is caused by the low contents of polymeric fractions with lower molecular weight (from 400 up to 2000) in the polymeric carrier.

Thus, on the basis of obtained experimental data we can say that the biodestruction of drugs with prolonged actions on the basis of melatonin proceeds in two stages: first - noncellular, proceeding in surface layers of granules and second – cellular, connected with formation of a new collagenic tissue.

*This investigation is supporting by Fund of Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific-Technical Sphere (grant 4983p/7404-2007) and Tatarstan Republic Venture Foundation (grant № 28H-2007).*





**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКОВ «АПИБАКТ®», «СИМБИТЕР® АЦИДОФИЛЬНЫЙ» КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ И «СИМБИТЕР® АЦИДОФИЛЬНЫЙ» С БЕНТОНИТОМ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРГАСТРИНЕМИИ**

*Радчук О.М., Короткий А.Г., Цирюк Е.И., Береговая Т.В., Рыбальченко В.К.*

Научно-исследовательский институт физиологии имени академика Петра Богача биологического факультета Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина  
e-mail: radolm@svitonline.com

Снижение секреции соляной кислоты, обусловленное длительным приемом блокаторов протонной помпы при рефлюкс-эзофагите либо развитием синдрома Золлингера-Эллисона, вызывает повышение уровня гастрина в крови и развитие длительной гипергастринемии. Благодаря своему трофическому влиянию на эпителий слизистой оболочки, гастрин стимулирует пролиферацию эпителиоцитов без полной их дифференциации, что делает его важным фактором образования опухолей как желудка, так и толстой кишки. Другим важным фактором развития опухолей толстой кишки является нарушение ее микробиоценоза, вызванное повышением рН желудочного сока, что приводит к усилению колонизации ЖКТ патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, а также к накоплению их токсинов. Такое нарушение обусловлено уменьшением синтеза короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), которые образуются в процессе расщепления лакто- и бифидобактериями микрофлоры компонентов клеточной стенки растений. Наиболее активными среди них являются уксусная, пропионовая и масляная кислоты, которые обеспечивают закисление содержимого кишечника, угнетают рост патогенной и условно-патогенной флоры и принимают участие в энергетическом обмене. Масляная кислота также индуцирует апоптоз в трансформированных клетках, являясь, таким образом, регулятором процессов пролиферации и дифференциации, поэтому одним из способов профилактики развития последствий длительной гипергастринемии можно рассматривать нормализацию микрофлоры толстой кишки и, таким образом, повышение уровня КЦЖК. Нами было показано, что введение мультипробиотика «Симбитер® ацидофильный» концентрированный способствует нормализации морфометрических показателей слизистой оболочки толстой кишки крыс. Однако, поскольку некоторые изменения все же наблюдаются, целесообразно было исследовать влияние мультипробиотиков «Апибакт®», содержащий прополис, который характеризуется иммуномодулирующим и противовоспалительным действием. Также целесообразно исследовать влияние «Симбитера® ацидофильного» с бентонитом, который обеспечивает сорбционную активность.

Исследования проводились на 41 белой крысе линии Wistar, которые составили 5 групп: контрольная (n=7, получали 0,2 мл воды для инъекций 28 дней), группа, получавшая инъекции омепразола (n=10, «Омес™» в дозе 14 мг/кг 28 дней), группа, получавшая на фоне введения омепразола «Симбитер® ацидофильный» (n=10, 0,14 мг/кг per os), группа, получавшая на фоне введения омепразола «Симбитер® ацидофильный» с бентонитом (n=7, 1,4 мг/кг per os) и группа, получавшая омепразол и «Апибакт®» (n=7, 1,4 мг/кг per os). После эвтаназии толстую кишку заливали в парафин и срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Показано, что после 28-дневного введения омепразола высота слизистой оболочки и площадь поперечного сечения эпителиоцитов по сравнению с контролем достоверно увеличилось, а площадь поперечного сечения ядер эпителиоцитов и ядерно-цитоплазматическое соотношение снизились. После одновременного введения омепразола и «Апибакта®» высота слизистой оболочки и площадь поперечного сечения эпителиоцитов уменьшились, а ядерно-цитоплазматическое соотношение и площадь поперечного сечения ядер эпителиоцитов увеличились, однако контрольного значения достигла только высота слизистой оболочки. В результате введения омепразола и «Симбитера®» показано достоверное снижение высоты слизистой оболочки по сравнению с показателем группы, получавшей омепразол, до контрольного уровня; площади поперечного среза эпителиоцитов и их ядер, и ядерно-цитоплазматический индекс имели тенденцию к нормализации. При введении омепразола одновременно с «Симбитером®» с бентонитом, контрольного уровня достигли высота слизистой оболочки и площадь поперечного среза эпителиоцитов; площадь поперечного среза их ядер и ядерно-цитоплазматический индекс увеличились.

Таким образом, показано, что мультипробиотики «Апибакт®», «Симбитер® ацидофильный» и «Симбитер® ацидофильный» с бентонитом эффективно влияют на восстановление функционального состояния желудочно-кишечного тракта и микробиоценоза толстой кишки крыс при длительной гипергастринемии.



**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE INFLUENCE OF MULTIPROBIOTICS “APIBACT®”, “SIMBITER® ACIDOPHYLIC” CONCENTRATED AND “SIMBITER® ACIDOPHYLIC” CONCENTRATED WITH BENTONITE ON THE MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF RAT’S COLONIC EPITHELIUM IN THE PRESENCE OF LONG-LASTING HYPERGASTRINEMIA**

*Radchuk O., Korotkiy O., Tsyryuk O., Beregova T., Rybalchenko V.*

The investigation is carried out at the departments of Cytophysiology and Pharmaco-Physiology, Faculty of Biology, Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine  
e-mail: radolm@svitonline.com

Decrease of the hydrochloric acid secretion, caused by the long-lasting administration of proton pump inhibitors in patients with gastroesophageal reflux disease or the development of Zollinger-Ellison syndrome, causes rise of the blood gastrin level and development of long-lasting hypergastrinaemia. Due to its trophic effect on the epithelium of the colonic mucous coat gastrin stimulates proliferation of the epithelial cells without their complete differentiation. It makes gastrin considerable factor of stomach and colonic tumor formation as well. The other important factor of colonic tumor development is dearangement of its biotic community, provoked by increase of gastric juice pH. It leads to reinforcement of gastrointestinal tract colonization by pathogenous and opportunistic germs as well as to the toxins accumulation. Such disturbances are caused by diminishing of the short-chain fatty acids (SCFA) synthesis, that are being generated during the decomposition of plant cell walls by lactobacteria and bifidus bacteria. Among them the most active are acetic, propionic and butyric acids that provide the acidulation of the colonic contents, repress growth of the pathogenous and opportunistic germs and take part at the energy metabolism. Also butyric acid induces apoptosis in the transformed cells and thereby regulates the processes of the proliferation and differentiation. Therefore normalization of the colonic microflora and as a result increase of SCFA level can be regarded as one of the preventive measures, pointed at the consequences of long-lasting hypergastrinaemia development. We have shown that the administration of multiprobiotic “Simbiter® acidophylic” concentrated favoures the normalization of morphometric characteristics of rat’s colonic mucous coat. However so far as some alterations are still being observed, there appear to be sufficient reasons for investigation of the activity of multiprobiotic “Apibact®”, which contains propolis, that is characterized by immunomodulatory and antiinflammatory activities. Also the influence of multiprobiotic “Simbiter® acidophylic” with bentonite is reasonable to be investigated due to the sorption activity of bentonite.

A total of 41 Wistar rats were divided in 5 groups: control (n=7, were injected with 0,2 ml distilled water during 28 days), the second received omeprazole (n=10, were injected with “Omez®” in dose of 14mg/kg 28 days), the third received “Simbiter® acidophylic” against the background of “Omez®” (n=10, received 0,14 mg/kg per os), the fourth received “Simbiter® acidophylic” with bentonite against the background of “Omez®” (n=7, received 1,4 mg/kg per os) and the fifth received “Apibact®” against the background of “Omez®” (n=7, received 1,4 mg/kg per os). After euthanasia samples of colon were embedded in parafin and sections with the depth between 5 and 7µm were stained with the hematoxylin and eosine.

It was shown that the 28-days administration of omeprazole causes the significant increase of the mucous coat height, the cross-sectional area of epithelial cells in comparison with control and decrease of the cross-sectional area of nuclei, as well as decrease of the nucleocytoplasmic corellation. After the simultaneous administration of omeprazole and “Apibact®” the mucous coat height and the cross-sectional area of epithelial cells diminished, and the cross-sectional area of nuclei and the nucleocytoplasmic corellation enlarged, but only the mucous coat height has reached the control point. After the simultaneous administration of omeprazole and “Simbiter®” the mucous coat height has been shown to decrease significantly to the control rate in comparison with the group which received only omeprazole. Cross-sectional areas of epitheliocytes and their nuclei as well as the nucleocytoplasmic corellation were tended to the normalization. During the administration of “Simbiter® acidophylic” with bentonite against the background of “Omez®” the mucous coat height and the cross-sectional area of epithelial cells have reached the control point, the cross-sectional area of nuclei and nucleocytoplasmic corellation have increased.

Taking into consideration results of the investigation, it has been shown that the multiprobiotics “Apibact®”, “Simbiter® acidophylic” concentrated and “Simbiter® acidophylic” concentrated with bentonite have effective impact on the renewal of the gastrointestinal fitness and rat’s colonic biocommunity in the presence of long-term hypergastrinemia.



## ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ И ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ N-УРОНОИЛПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Раваева М.Ю., Коренюк И.И., Курьянов В.О., Чулахина Т.А.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
e-mail: mravaeva@ukr.net

В работе исследовалось влияние N-(1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануроноил)- $\beta$ -аланина (**ДАГУ-Ала**), N-(1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануроноил)-глицил-D,L-глутаминовой кислоты (**ДАГУ-Глу**), N-(1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануроноил)-глицил-глицина (**ДАГУ-Гли**), 1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозилурононовой кислоты (**ДАГУ**),  $\beta$ -аланина, D,L-глутаминовой кислоты и глицил-глицина на нейроны виноградной улитки и поведение крыс. С использованием метода внутриклеточного отведения биопотенциалов и анализа первой производной потенциалов действия нейронов ППа1, ППа2, ППа7 и неидентифицированных нейронов висцерального ганглия *Helix albenscens Rossm.* установлено, что порог для проявления нейротропного эффекта соединений **ДАГУ** и **ДАГУ-Гли** у нейронов ППа2 составляет  $10^{-6}$  М, а для остальных типов нейронов пороговые концентрации всех тестируемых соединений –  $10^{-5}$  М. Анализ кривой первой производной ПД показал, что все соединения пропорционально концентрации, в целом, подавляют как входящие натриевые и кальциевые, так и выходящие калиевые трансмембранные ионные токи. При этом, соединения **ДАГУ-Ала**, **ДАГУ-Глу**,  $\beta$ -аланин, D,L-глутаминовая кислота и глицил-глицин оказывают ингибирующее действие преимущественно на выходящий калиевый, а **ДАГУ-Гли** – в большей степени на входящие натриевый и кальциевый ионные токи.  $\beta$ -аланин, D,L-глутаминовая кислота оказывают более выраженный эффект, чем содержащие их конъюгаты, а **ДАГУ** угнетает входящие и выходящие токи в равной степени.

Обнаружено, что при слабом стрессе (тест «открытое поле») наиболее выраженные антистрессорные эффекты отмечены для соединений **ДАГУ-Глу** и **ДАГУ-Гли**, которые заключаются в угнетении локомоций и увеличении исследовательской активности, а соединение **ДАГУ-Ала** – повышает локомоцию, исследовательскую активность и дефекацию, то есть оказывает психостимулирующее действие. При умеренном стрессе («черно-белая камера») только соединение **ДАГУ-Гли** незначительно повышает частоту выглядываний и выходов, а также продолжительность выходов животных в светлый отсек камеры и оказывает анксиолитический эффект, превосходящий по силе эффект пирасетама. В моделях сильного стресса наиболее эффективным антидепрессантом оказалось соединение **ДАГУ-Глу**, которое увеличивает время активного плавания животных в тесте Порсолта и уменьшает латентный период пассивного зависания крыс в тесте «подвешивание за хвост». Антидепрессантное действие **ДАГУ-Глу** превосходит действие amitriptилина. В модели стрессорного язвообразования в желудке вызванного длительным плаванием только при введении соединения **ДАГУ-Гли** у животных достоверно уменьшается общая площадь поражения слизистой оболочки желудка (в 4 раза), то есть данное соединение способно активировать антистрессорные гастропротекторные механизмы.

Результаты данной работы убедительно показывают необходимость дальнейшего исследования тестируемых производных в экспериментальной фармакологии для создания на их основе соответствующих нейротропных лекарственных средств.



**ELECTROPHYSIOLOGICAL INDICES OF SNAIL NEURONS AND RAT BEHAVIOR INDUCED BY SOME N-URONOYL-DERIVATIVE AMINO ACIDS**

*Ravaeva M. Yu., Korenyuk I. I., Kuryanov V. O., Chupakhina T. A.*

V.I. Vernadsky's Taurida National University, Simferopol, Ukraine  
e-mail: mravaeva@ukr.net

The studies effects of some N-uronoil-derivative amino acids N-(1,2:3,4-di-O-izopropiliden- $\alpha$ -D-galaktopiranuronoyl)- $\beta$ -alanin (**DAGU-Ala**), N-(1,2:3,4-di-O-izopropiliden- $\alpha$ -D-galaktopiranuronoyl)-glycil-D,L-glutamin acid (**DAGU-Glu**) i N-(1,2:3,4-di-O-izopropiliden- $\alpha$ -D-galaktopiranuronoyl)-glycil-glycin (**DAGU-Gly**) on electrical activity of *Helix albescens* Rossm. neurons and rat behavior in different stress-tests. Such compounds as **DAGU-Ala** and **DAGU-Glu** occurred to inhibit mostly the output potassium current, whereas **DAGU-Gly** – mostly the input sodium and calcium ionic currents. Systematic injection of **DAGU-Gly** rendered anxiolytic effect, stronger than that of pyracetam, while **DAGU-Glu** rendered antidepressant effect, stronger than that of amitriptyline.

The collected results bring out clearly the possibility of further research of N-uronoil derivatives in experimental pharmacology to help produce the corresponding neurotropic medicines on their basis.



## ЕФЕКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА УМОВ ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ ТА ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ

*Раєцька Я.Б., Торгалло Є.О., Остапченко Л.І.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: raetska@yandex.ru

Робота присвячена дослідженню ключових компонентів системи трансдукції сигналу та особливостей процесів вільнорадикального окиснення ліпідів за умов злоякісного росту карциноми Герена і променевої терапії, а також вивченню дії антиоксидантних препаратів природного походження на ці процеси з метою корекції променевого впливу за допомогою лікувально-профілактичних засобів.

В досліджах використовували білих лабораторних щурів-самців масою  $130 \pm 10$  г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам трансплантували карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-му розчині NaCl, отриманих від щура-донора за методикою Частині тварин щоденно, протягом 7-ми діб після прищеплення пухлини і до локального опромінення перорально вводили антиоксидантні препарати ActiVin™ („InterHealth Nutritionals Incorporated”, Concord, США) в дозі 25 мг/кг маси, Рупногенол™ („Zepter”, Group, США) у дозі 25 мг/кг маси та АММІВІТ (“Львівський фарм. завод”, Україна) у дозі 30 мг/кг маси тварин. Досліджувані препарати – антиоксиданти рослинного походження. При дослідженні ПОЛ та молекулярних механізмів трансдукції сигналу пухлину на 8-му добу після прищеплення піддавали локальному рентгенівському опроміненню в дозі 10 Гр на апараті РУМ–17. Тварин декапітували через 1, 3 та 7 діб після локального опромінення.

На підставі проведених досліджень встановлено, що опромінення призводить до змін значень пероксидного окиснення ліпідів та молекулярних механізмів трансдукції сигналу за умов злоякісного росту. Порушення процесів пероксидації в результаті опромінення супроводжувалося змінами активності аденілат- та гуанілатциклаз, вмісту цАМФ та цГМФ, а також ферментів, активність яких модулюється вищезазначеними чинниками (цАМФ-, цГМФ-,  $Ca^{2+}$ , фосфоліпідзалежні протеїнази). Показано, що введення лікувальних препаратів із властивостями антиоксидантів сприяє нормалізації процесів пероксидації та стану сигнальних систем у клітинах за рахунок підсилення ефективності застосованої радіотерапії. На цій підставі антиоксидантні препарати можуть бути запропоновані з метою профілактики та комплексного лікування злоякісних новоутворень.



## **ANTIOXIDANT EFFECTS IN CANCEROUS GROWTH WITH RADIOTHERAPY**

*Raetska Ya.B., Torgalo E.A., Ostapchenko L.I.*

Taras Shevchenko of National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: raetska@yandex.ru

The presented work is devoted to peroxidation processes and activities of some membrane-bound enzymes research in rat tissues under cancerous growth conditions and its correction by natural antioxidative preparations treatment.

102 white laboratory rats-males (weight  $130 \pm 10$  g) used in experiments, were kept on standard vivarium diet. Geren carcinoma was transplanted to the animals by subcutaneous injection of 20% tumor cells suspension of 0.9% NaCl solution into back extremity hip. Tumor cells were taken from the rat-donor. AMMIBIT, Acti Vin<sup>TM</sup>, Pycnogenol<sup>TM</sup> contains natural antioxidants grape seed proanthocyanidins from polyphenol bioflavonoids group. Some animals took antioxidant preparations AMMIBIT ("Львівський фарм. завод", Україна) peroral at the rate of 30 mg/kg, Pycnogenol<sup>TM</sup> („Zepter", Group, США) and Acti Vin<sup>TM</sup> (InterHealth Nutritionals Incorporated, Concord, CA) peroral at the rate of 25 mg/kg every day during 7 days between tumor inoculation and local radiation treatment. 8 days after inoculation tumor was exposed to X-radiation at the rate of 10 Gr on the RUM-17. Animals were decapitated 30 minutes, 24 hours, 72 hours and 7 days after local radiation treatment with light ether anesthesia. Animals without local radiation treatment were decapitated simultaneously according to the terms of search. Taken data were handled statistically on the studentized test. Superscripts alterations were considered reliable when  $p < 0.05$  and regarded as tendency when  $p > 0.05$ .

It has been shown that irradiation of rats with Geren carcinoma by therapeutic doses of x-rays improved cell methabolic processes in tumor and organs. The irradiation weakened there peroxidation processes and activated antioxidative enzymes. Besides irradiatia partially normalized function of signal systems by its effects on eheir enzymes. Positive effect of complex therapy including irradiatich and natural antioxidatsve preparations these biochemical indexes has been established. It was established that administration of antioxidants normalizes the lipid peroxidation processes and enhances the radiotherapy effectiveness. Other confirmation is that irradiation in therapeutic doses leads to partial normalization of abovementioned cascades functioning. Antioxidant preparations are proposed for prophylactic and complex treatment of malignant process.



## ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ ДОЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА НА АКТИВНОСТЬ ТРИПТОФАН-ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ТРИПТАМИНА В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *CATHARANTHUS ROSEUS*

Ромашко С.Н., Молчан О.В., Юрин В.М.

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь.  
e-mail: svetlan\_rom@mail.ru

*Catharanthus roseus* (L) G. Don является ценным лекарственным растением. Фармакологическая ценность катарантуса розового обусловлена высоким содержанием алкалоидов индольного ряда. К настоящему времени в различных органах и тканях катарантуса идентифицировано более 100 индольных алкалоидов. Особую коммерческую ценность имеют винкристин и винбластин, обладающие противоопухолевой активностью, а также аймалицин – гипотонического действия. Культура клеток *Catharanthus roseus* представляет собой уникальный источник фармакологически активных соединений. Однако содержание конечных продуктов биосинтеза алкалоидов индольного ряда, винбластина и винкристина в каллусной культуре находится на крайне низком уровне. Таким образом, высокая рыночная стоимость и низкое содержание коммерчески ценных алкалоидов в культуре являются предпосылками для разработки различных методов стимуляции биосинтеза индольных алкалоидов [1].

Каллусная культура *Catharanthus roseus* была инициирована из листовых эксплантов. Каллус культивировали в темноте при 25<sup>0</sup>С на среде MS, содержащей кинетин в концентрации 4.65 мкМ и 2,4 D в концентрации 4.52 мкМ [2]. Пересадку осуществляли каждые 30 дней в течение 10 месяцев. Биохимические исследования проводили на культуре, находящейся в стационарной фазе роста.

Для стимуляции процессов биосинтеза алкалоидов через каллусную ткань с помощью двух электродов был пропущен электрический ток, силой в 1,5 мкА. Под воздействием электрического поля каллус находился в течение суток. Определение активности триптофан-декарбоксилазы, фермента, играющего ключевую роль на начальных этапах биосинтеза алкалоидов индольного ряда, в каллусной ткани проводили через сутки после отключения тока. Активность триптофан-декарбоксилазы определяли методом, описанным Sangwan et al., 1998 [3] с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse.

Биосинтез индольных алкалоидов терпеноидного ряда начинается реакцией декарбоксилирования триптофана и превращения его в триптамин. Реакцию катализирует фермент триптофан-декарбоксилаза. В результате проведенных нами исследований было установлено, что изменения активности ТДК, выделенной из каллусной ткани характеризуется линейной зависимостью от времени в течение первых 40 минут инкубации. Изучение зависимости активности фермента от температуры инкубации показало, что оптимальной является температура 30<sup>0</sup>С.

Активность триптофан-декарбоксилазы в каллусной ткани, подвергнутой воздействию электрического тока, была на 30-40% выше. Исследование кинетических характеристик показало, что линейный характер зависимости активности фермента от времени сохраняется до 50 минут инкубации. Следовательно, электрический ток стимулирует активность триптофан-декарбоксилазы в тканях каллусной культуры катарантуса розового.

Кроме того, было оценено содержание триптамина в контрольных и после воздействия электрического тока каллусных культурах. Было показано, что содержание триптамина в ткани каллуса под влиянием электрического тока возрастает почти в 1,5 раза. Данные результаты согласуются с результатами, свидетельствующими о стимуляции активности триптофан-декарбоксилазы в каллусной ткани, и позволяют предположить, что под влиянием электрического тока происходит стимуляция биосинтеза триптамина.

Таким образом, можно заключить, что воздействие малых доз электрического тока приводит к стимуляции начальных этапов биосинтеза алкалоидов индольного ряда в каллусной культуре катарантуса розового.

### Литература:

1. Arvind Verma, Into Laakso. Simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine. // Molecules, 2007, Vol.12, P.1307-1315.
2. Namdeo A.G., Mahadic R.R., Kadam S.S. Cost effective medium for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. // Pharmacognosy magazine, Vol. 2, Issue 8, Oct-Dec, 2006, P.227-231.
3. Erik H.Hughes, Seung-Beom Hong, Susan I. Gibson., et al. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. // Metabolic Engineering, Vol.6, Issue 4, October 2004, P. 268-276.



**THE INFLUENCE OF WEAK ELECTRIC CURRENT ON THE TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE ACTIVITY AND TRIPTAMINE CONTENT IN CALLUS CULTURE OF CATHARANTHUS ROSEUS**

Romashko S.N., Molchan O.V., Yurin V.M.

Belarusian State University, Minsk, Belarus  
e-mail: svetlan\_rom@mail.ru

*Catharanthus roseus* (L) G. Don, the Madagascar periwinkle, is pharmaceutically important tropical plant. The pharmacological value of this plant consists in a rich source of indole alkaloids. By now over 100 indole alkaloids are identified in various organs and tissues of *Catharanthus roseus*. Anti-cancer indole alkaloids vincristine and vinblastine, and anti-hypertensive agent ajmalicine have the most medical and economic value.

Cell culture of *Catharanthus roseus* had been considered to be irreplaceable sources of pharmacologically important substances. But a callus indole alkaloids biosynthesis suffered from a low productivity of indole alkaloids vincristine and vinblastine. [1]

Thus, high market value and low yield of these substances in callus had caused investigation of alkaloid biosynthesis stimulation in callus culture of *Catharanthus roseus*.

Callus culture was initiated from leaves explants of one-year old plant of *Catharanthus roseus*. Explants were disinfected and incised into small pieces and aseptically transferred to MS medium supplemented with growth regulators (4.52  $\mu$ M 2,4 D and 4.65  $\mu$ M kinetine) [2]. After one month the initiated callus were completely isolated from explants and cultured under the same conditions as those of their initiation, with monthly transfers. Cultures were incubated at 25°C for 10 month. The biochemical analysis was carrying out in a stationary phase of callus culture growth.

Weak electric current of the order of 1,5  $\mu$ A with help of two electrodes was passed through callus cultures tissue for the purpose of stimulation of alkaloid biosynthesis. The callus was under the influence of electric current during the 22 h. Tryptophan decarboxylase activity was measured as described Sangwan et al., 1998 [3] with the help of spectrofluorimeter Varian Cary Eclipse.

Terpenoid indole alkaloid biosynthesis starts with the decarboxylation of tryptophan to the tryptamine. Tryptophan decarboxylase is the enzyme that catalyzes this conversion. We have detected the changes of tryptophan decarboxylase activity in callus tissue. It is characterized by linear time dependence during the first 40 min incubation. Temperature optimum of enzyme activity was 30<sup>0</sup> C.

The treatment of electric current increased the activity of tryptophan decarboxylase in callus culture in 30-40% in comparison with untreated callus. Kinetics analysis was shown that TDC activity increased till 50 min incubation.

The results support a hypothesis that weak electric current stimulates the tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* callus culture. Besides tryptamine content was evaluated in treated and untreated with weak electric current tissues of callus culture. It was shown that tryptamine content in treated callus tissue increased at one and a half time. The results agree with tryptophan decarboxylase activation in callus culture tissue under the electric current. This information makes us believe that triptamine biosynthesis increased under the electric current.

Consequently we could conclude that the weak electric current leads to stimulation of initial stage of indole alkaloid biosynthesis in callus culture of *Catharanthus roseus*.

**References:**

1. Arvind Verma, Into Laakso. Simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine. // *Molecules*, 2007, Vol.12, P.1307-1315.
2. Namdeo A.G., Mahadic R.R., Kadam S.S. Cost effective medium for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. // *Pharmacognosy magazine*, Vol. 2, Issue 8, Oct-Dec, 2006, P.227-231.
3. Erik H.Hughes, Seung-Beom Hong, Susan I. Gibson., et al. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. // *Metabolic Engineering*, Vol.6, Issue 4, October 2004, P. 268-276.





## МОЛЕКУЛЯРНА МІМІКРІЯ ЯК ОДИН ІЗ МЕХАНІЗМІВ АД'ЮВАНТНОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ВІРУСНИХ ТА БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ

*Рибалко С.Л., Іванська Н.В., Дядюн С.Т., Завелевич М.П., Федорченко Д.Б., Самойленко В.А., Скриннік М.М., Серебрякова М.В., Поярков О.С., Антоненко С.В.*

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб АМН України», Київ, Україна  
e-mail: y\_dasha@ukr.net

В теперішній час активно розвивається новий напрямок в біології – виявлення антигенної мімікрії (подібності) між хімічними структурами різних біологічних об'єктів – вірусів, бактерій, простіших, системи HLA, імуноглобулінами. Цей феномен має важливе значення в інфекційній патології, так як дозволяє сподіватися на створення профілактичних вакцин на основі мімікрируючих білків проти багатьох вірусних та бактеріальних захворювань.

Так як мімікриуючі білки здатні стимулювати Т-хелпери, антигенспецифічно, пептидна мімікрія нових бактеріальних ад'ювантів, може бути використана не лише як праймуючий, бустерний агент в розвитку тривалої імунної відповіді, а й як новий агент специфічної ад'ювантної терапії.

До таких послідовностей відносяться, наприклад, фактори вірулентності, тобто поверхневі антигени, на які виробляються в організмі нейтралізуючі антитіла.

Запропоновані авторами нові вуглеводмісні структури – мімікрини (MI), які не лише стимулюють гуморальний та клітинний імунітет, але й мають унікальні властивості мімікрії пептидів вірусів, бактерій та токсинів, тобто імітації та копіювання антигенів вірусів, відповідальних за інфекцію, мімікрини можуть контролювати патогенність вірусів.

Очищення виділеної із культурального середовища золотистого стафілококу речовини проводили гель-фільтрацією на колонці із сефадексом G-200. Були виділені мімікрини із культурального середовища росту клітин тварин і рослин, бактерій: пневмококу, гемофільної палички, мікоплазми, *V.cholerae*, *B. meningococcus*, пробіотиків, аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus subtilis*- біоспорин і субалін, до складу якого входить рекомбінантний штам *Bacillus subtilis*- 2335(105).

Вивчення хімічного складу показало, що співвідношення білку та вуглеводу у мімікрину пневмококу - 1:6; гемофільної палички- 1:5; *Bacillus subtilis*- 1:1,5; мікоплазми- 1:9; холери- 1:5; менінгококу 1:7.

Дослідження моносахаридного складу мімікринів стафілококу і пневмококу показало, що основним нейтральним моносахаридом є манноза, глюкози значно менше, співвідношення цих сахарів 24:1 і 6:1 відповідно, а у мікоплазми - 2,6:1. Моносахаридний склад інфлюєнзи значно відрізняється від моносахаридного складу мімікринів пневмококу, золотистого стафілококу. Він представлений глюкозою, галактозою, маннозою і фруктозою у співвідношенні 2,6:2,8:8,1:2,1. Моносахаридний склад MI біфідум і холери представлений в основному галактозою і глюкозою, а також маннозою у співвідношенні 2,5:15,5:5,1; MI менінгококу - маннозою і глюкозою- 22:1.

Крім моносахаридів у MI гемофільної палички, пневмококу, стафілококу і *Bacillus subtilis* ідентифіковані два гексозаміни - галактозамін і глюкозамін у співвідношенні 0,5:3,5 і 1:2. У MI біоспорину - галактозамін і глюкозамін співвідношенні 3:1, у MI субаліну - співвідношення гексозамінів 5:1, у MI холерного вібриону- 1:1,5.

Ступінь очистки виділених фракцій та їх гомогенність була досліджена методом аніонообмінної вискоєфективної рідинної хроматографії HPLC.

Методом MALDI-TOF-масс-спектрометрії по «пептидному фінгерпринту» ідентифіковані амінокислотні послідовності мімікрину та виявлені їх гомологічні послідовності із білками ВІЛ, HCV, HSV, фактору злиття та імуноглобуліну людини та ін.

Досліджено вплив мімікрину, виділеного із бактерій *B.subtilis* (препарат субалін), на ефективність імунізації вакцинами проти грипу, дифтерії, стафілокової та кандидозної.

Виявлена загальна закономірність при використанні мімікрину субаліну: раннішнє, на першому тижні, виявлення 7S-антитіл, високий рівень антитоксичних антитіл – до 5120, гемаглютининів – до 1280, антитіл до стафілококу – 40 960 та кандидатів – 2560, їх більш тривала циркуляція. Повторна імунізація одним препаратом стимулювала утворення специфічних антитіл до титрів 1:640-1280. Виявлена закономірність антитілоутворення при використанні мімікринів бактерій знайшла пояснення в антигенній мімікрії пептидів препаратів с  $\chi$ -ланцюгами імуноглобуліну людини.

Крім того, було встановлено, що ці структури мають здатність: стимулювати проліферацію Т- і В-лімфоцитів; праймувати та індукувати синтез альфа- та гамма-інтерферонів; стимулювати та регулювати репаративний синтез ДНК клітин при вірусній інфекції; регулювати активність ферментів ДНК-полімераз, тимідинкінази, зворотної транскриптази уражених вірусом клітин і мітотичну активність клітин.

Виділені препарати із продуктів метаболізму бактерій, які мають властивості антигенної мімікрії з пептидами вірусу грипу та фрагментом легкого ланцюга імуноглобуліну людини, можуть бути використані при конструюванні вакцин.

Властивість антигенної мімікрії, як основа механізму дії нових бактеріальних ад'ювантів, може бути використана при розробці схем вакцинації, скорочення кратності введень вакцин, навантаження специфічного антигену та заміни повторних введень вакцинних препаратів новими бактеріальними ад'ювантами.



## **MOLECULAR MIMICRY AS ONE OF MECHANISMS OF ADJUVANT THERAPY IN VIRAL AND BACTERIAL INFECTIONS**

*Rybalko S.L., Ivanska N.V., Diadiun S.T., Zavelevych M.P., Fedorchenko D.B., Samoilenko V.A., Skrynnik M.M., Serebriakova M.V., Poiarkov O.S., Antonenko S.V.*

Public Institution "L.V. Hromashevskiy Institute of epidemiology and infectious diseases of the AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine  
e-mail: y\_dasha@ukr.net

The discovery of the antigenic mimicry, i.e. the similarity between the chemical structures of the various biological objects (viruses, bacteria, protozoa, HLA system, immunoglobulins) is the rapidly growing field in the modern biology. Such a phenomenon is of high importance for the infectious pathology offering the hope for the development of the prophylactic vaccines based on the mimicking proteins against a variety of viral and bacterial diseases.

Since the mimicking proteins are capable of antigen-specific stimulation of T helpers, the peptide mimicry of the new bacterial adjuvants may be used not only as the priming booster agent but also as the novel modality of the specific adjuvant therapy.

Such mimicking sequences comprise for example the factors of the virulence representing the surface antigens inducing the production of neutralizing antibodies.

The authors propose the novel carbohydrate-containing structures, which besides the stimulation of the humoral and cell-mediated immunity possess the unique properties of mimicking the peptides of viruses, bacteria, and toxins, i.e. imitating and copying the viral antigens responsible for the infection. Such mimicrins may control the pathogenicity of the viruses.

The neuraminins were isolated from the culture medium of *Staphylococcus aureus*, *Pneumococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma sp.*, *V.cholerae*, *B. meningococcus*, probiotics, *Bacillus subtilis* ('Subalin' preparation) and purified by gel-filtration on Sephadex G-200.

The chemical structure of neuraminins from various sources was analyzed. The following protein/carbohydrate ratios were found out: 1:6 in neuraminin from *Pneumococcus*, 1:5 in neuraminin from *Haemophilus influenzae*, 1:1.5 in neuraminin from *Bacillus subtilis*, 1:9 in neuraminin from *V. cholera*, 1:7 in neuraminin from *B. meningococcus*.

In the neuraminins of *Staphylococcus* and *Pneumococcus*, mannose was found as the major neutral monosaccharide with less content of glucose (24:1 and 6:1 respectively). Mannose/glucose ratio in neuraminin from mycoplasma was 2.6:1. The monosaccharide composition in neuraminin from *Haemophilus influenzae* was quite different representing glucose, galactose, mannose, and fructose at a 2.6:2.8:8.1:2.1 ratio. In neuraminin from *V. cholera*, the major monosaccharides were glucose, galactose, and mannose at a 2.5:15.5:5.1 ratio. In neuraminin from *B. meningococcus*, the mannose to glucose ratio was 22:1.

Besides monosaccharides, in neuraminins of *Haemophilus influenzae*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*, two hexosamines were identified, namely galactosamine and glucosamine at a ratios of 0.5:3.5 and 1:2. In neuraminin from *Bacillus subtilis* ('Subalin') galactosamine to glucosamine ratio was 5:1, in neuraminin from *V. cholera* – 1:1.5.

The purity and homogeneity of the isolated fractions was assessed by anion-exchange HPLC.

The amino acid sequences of mimicrin were identified with the aid of MALDI-TOF-mass-spectrometry according to the peptide fingerprints. The homologous sequences between mimicrin and the proteins of HIV, HCV, HSV, fusion factor and human immunoglobulin were revealed.

The effect of mimicrin from *B. subtilis* ('Subalin' preparation) on the efficacy of the immunization with influenza, diphtheria, staphylococcus, and candidiasis vaccines has been studied. On the first week, the high levels of antitoxic antibodies (5120), anti-hemagglutinins (1280), antibodies to staphylococcus (40960), and antibodies to *Candida* (2560) were detected. Moreover, the antibodies circulated longer than in the case of the immunization without mimicrin. The second immunization with 'Subalin' stimulated the production of the specific antibodies to the titers of 1:640-1280. Such a result seems to be explained by the antigenic mimicry between the preparations used and  $\chi$  chains of the human immunoglobulin.

Therefore, the preparations isolated from the products of the bacterial metabolism possessing the antigenic mimicry with the viral peptides and the fragment of the light chain of the human immunoglobulin may be useful in the development of the vaccine design.

Moreover, these mimicrins were shown to stimulate the proliferation of T- and B-lymphocytes, to prime and induce the synthesis of alpha and gamma interferons, to control and stimulate the reparative DNA synthesis in viral infection, to modulate the activities of DNA-polymerase, thymidine kinase and reverse transcriptase in virus-infected cells.

The phenomenon of the antigenic mimicry may be advantageous in elaborating the vaccination schedules with fewer re-immunizations and decreasing antigen load. Moreover, the novel bacterial adjuvants may be used for re-immunizations instead of the vaccine preparations used for primary immunization.



## ГИДРОГЕЛЕВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОГО ИОНОФОРЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Самченко<sup>1</sup> Ю.М., Пасмурцева<sup>1</sup> Н.А., Суходуб<sup>2</sup> Л.Б., Болдескул<sup>3</sup> И.Е.

<sup>1</sup> Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко Национальной академии наук Украины, Киев, Украина,  
e-mail: yu1sam@yahoo.com

<sup>2</sup> Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Академии медицинских наук Украины, Харьков, Украина

<sup>3</sup> Институт прикладной физики Национальной академии наук Украины, Сумы, Украина

Трансдермальные гидрогелевые системы на основе акриловых мономеров продемонстрировали высокую пролонгирующую способность применительно к широкому спектру химиотерапевтических препаратов - антибиотиков, противовоспалительных, обезболивающих и др. [1]. Ионофоретическое введение лекарственных препаратов обладает рядом преимуществ, что обусловлено более глубоким проникновением диффузанта через кожную мембрану и большей активностью лекарств в ионизированном состоянии.

Применительно к сополимерным гидрогелям на основе акриламида, акрилонитрила и акриловой кислоты была исследована электростимулированная диффузия диклофенака натрия, метатрексата, ношпы, лидокаина, линкомицина и др. Проведено сопоставление диффузионных параметров (скорость и продолжительность высвобождения, ионный поток, коэффициенты диффузии), относящихся к электростимулированному и пассивному высвобождению лекарственных препаратов. Показано, что приложение к гидрогелевым аппликаторам постоянного тока с плотностью 0,01-0,5 мкА/см<sup>2</sup> позволяет повысить эффективность и продолжительность высвобождения лекарственных препаратов, а также обеспечивает их адресную доставку.

Исследованы фазовые переходы (коллапс-набухание, сгибание-разгибание, сжатие-расширение) при пропускании постоянного электрического тока через гидрогелевые матрицы, а также направленный транспорт микрогранул гидрогелей под действием приложения разности потенциалов.

### **Литература:**

1. Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р. Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов // Доповіді НАН України. 2007. №6, с. 143-148



## **HYDROGEL THERAPEUTIC SYSTEMS FOR TRANSDERMAL IONTOPHORESIS OF MEDICINES**

*Samchenko<sup>1</sup> Yu., Pasmurceva<sup>1</sup> N., Sukhodub<sup>2</sup> L., Boldeskul<sup>3</sup> I.*

<sup>1</sup> Institute of Biocolloidal Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: yu1sam@yahoo.com

<sup>2</sup> Institute of Microbiology and Immunology after I.I. Mechnikov, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup> Institute of Applied Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine,

Transdermal hydrogel systems on the base of acrylic monomers have shown high prolong ability in the context of a wide spectrum of chemotherapeutic preparations - antibiotics, anti-inflammatory, anaesthetics etc. [1]. Iontophoretic delivery of medical preparations possesses a number of advantages that is caused by deeper penetration of diffusants through a skin membrane and higher activity of medicines in the ionised state.

With reference to copolymer hydrogels on the base of acrylamid, acrylonitrile and acrylic acid electrostimulated diffusion of sodium diclofenac, methatrexat, no-spa, lidocaine, lynkomicine etc has been investigated. Comparison of diffusion parametres (speed and duration of release, ionic flux, diffusion coefficients), concerning to electrostimulated and passive release of medical products was carried out. It is shown, that the applying to hydrogel matrixes of direct current with density 0,01-0,5  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  allows to raise efficiency and duration of release of medical preparations, and provides their address delivery.

Phase transitions (collapse-swelling, bending-unbending, compression-expansion) induced by transmission of constant electric current through hydrogel matrixes, and also the directional transport of hydrogel microgranules under the influence of direct current are investigated.

### **References:**

1. Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р. Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов//Доповіді НАН України. 2007. №6, с. 143-148



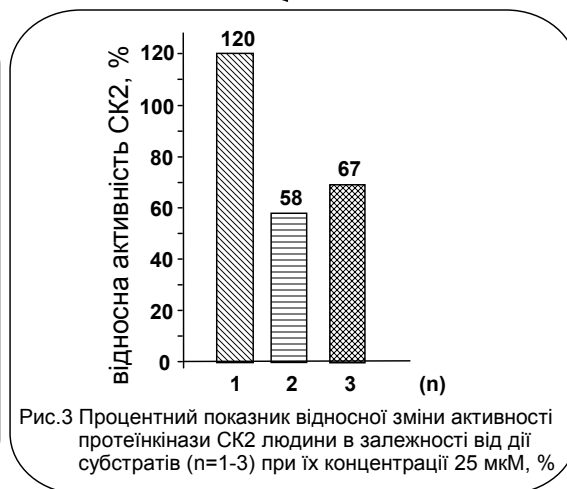
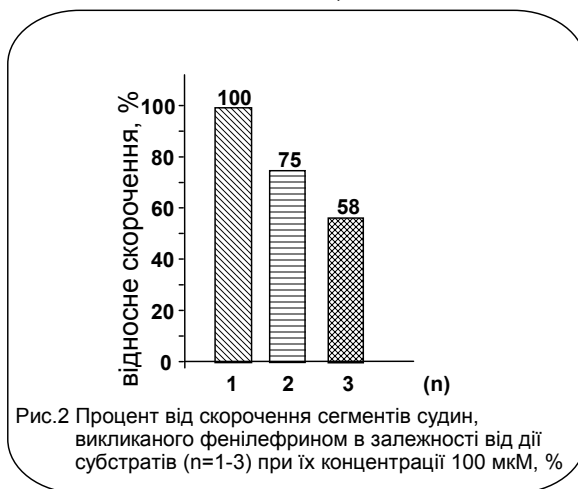
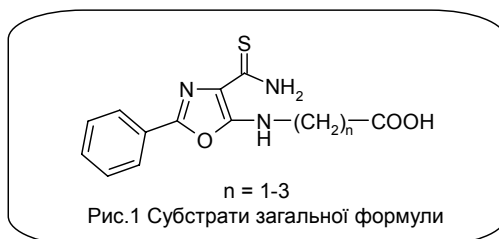
## ПОШУК СПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБОРИВ ПРОТЕЇНАЗИ СК2 ТА ВАЗОАКТИВНИХ СПОЛУК СЕРЕД ПОХІДНИХ 5-АМІНО-1,3-ОКСАЗОЛІВ

Шабликін О.В., Кухаренко<sup>1</sup> О.П., Яковенко І.Н., Ярмолюк<sup>1</sup> С.М., Броварець В.С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна  
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua; shablykin@gmail.com

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

При взаємодії 2-ациламіно-3,3-дихлороакрилонітрилів з амінокислотами – гліцином, β-аланіном, γ-аміномасляною кислотою та орнітином – отримані нові похідні 5-амінооксазолу. Біологічну активність нових сполук протестовано на моделі ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів (за впливом на тонус судин) та в біохімічних тестах активності ряду протеїнази людини. Деякі похідні 5-амінооксазолу, а саме, N-(феніл-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)амінокислоти (рис.1) виявили вазодилатуючі властивості (рис.2) поряд з інгибуванням активності протеїнази СК2 людини (рис.3). Запропонований можливий механізм дії досліджених сполук на тонус каротидних артерій кроликів, обумовлений їх впливом на протеїназу СК2 судинних міоцитів.



### Література:

1. О.В. Шабликін, О.П.Кухаренко, І.Н. Яковенко, С.М. Ярмолюк, В.С. Броварець Пошук специфічних інгібіторів протеїнази СК2 і вазоактивних сполук серед похідних 5-аміно-1,3-оксазолів // *Ukrainica Bioorganica Acta.* - 2008. - Vol.6, N 1. - P. 28-36. ([www.bioorganica.org.ua/UBAAdenovo/pubs\\_6\\_1\\_08/Shablykin\\_2008\\_1.pdf](http://www.bioorganica.org.ua/UBAAdenovo/pubs_6_1_08/Shablykin_2008_1.pdf))



RESEARCH FOR SPECIFIC PROTEIN KINASE CK2 INHIBITORS AND VASOACTIVE COMPOUNDS AMONG 5-AMINO-1,3-OXAZOLES DERIVATIVES

Shablykin O.V., Kucharenko<sup>1</sup> O. P., Yakovenko I.N., Yarmoluk<sup>1</sup> S. M., Brovarets V.S.

Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua; shablykin@gmail.com

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Under treatment of 2-acylamino-3,3-dichloroacrylonitriles with glycine,  $\beta$ -alanine,  $\gamma$ -amino acid and ornithine the new N-substituted aminooxazoles were obtained. The new chemical compounds were screened for the possible influence on the tonus of isolated rabbit carotid arteries as well as for inhibition activity against some human protein kinases. Some derivatives of 5-aminoxazoles, especially N-(phenyl-4-thiocarbomoyl-1,3-oxazol-5-yl)aminoacids (Fig.1), relaxed phenylephrine-precontracted rabbit carotids (Fig.2) (maximal vasodilatation activity observed for compound with  $n = 2$  and 3) that good correlated of human protein kinase CK2 activity (Fig.3). Discovered vasodilatation properties of researched new chemical compounds by inhibition of myocyte protein kinase CK2, which participate in regulation of intracellular mediator signals conducting with phosphoinositides was discussed.

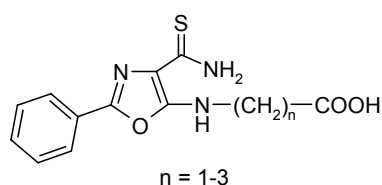


Fig.1 Investigated substrates the general formula

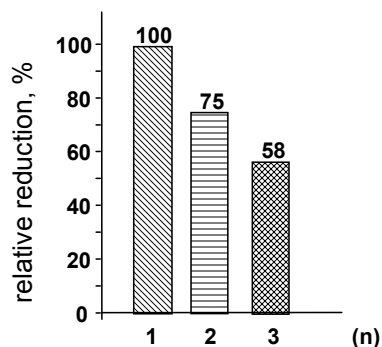


Fig.2 Percentage of reduction in vessel segments due phenylephrine depending on the actions of substrates ( $n = 1-3$ ) at concentrations 100 mkM

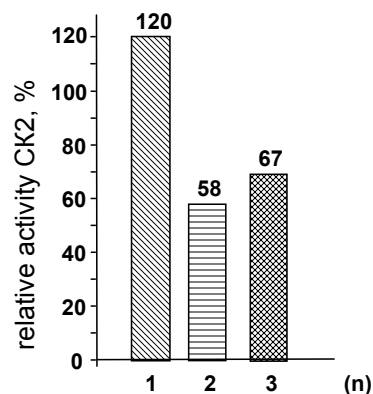


Fig.3 Percentage of relative activity of protein CK2 kinase depending on the actions of substrates ( $n = 1-3$ ) at concentrations 25 mkM

References:

- Search for specific protein kinase CK2 inhibitors and vasoactive compounds among 5-amino-1,3-oxazoles derivatives /O.V. Shablykin, O.P. Kucharenko, I.N. Yakovenko, S.M. Yarmoluk, V.S. Brovarets // *Ukrainica Bioorganica Acta.* - 2008. - Vol.6, N 1. - P. 28-36.([www.bioorganica.org.ua/UBAdenovo/pubs\\_6\\_1\\_08/Shablykin\\_2008\\_1.pdf](http://www.bioorganica.org.ua/UBAdenovo/pubs_6_1_08/Shablykin_2008_1.pdf))



## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ GLU И В<sub>6</sub> ПРИ ОСТРОЙ ГЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ.

*Шафрановская Е.В., Афонин В.Ю., Волыхина В.Е.*

Институт Фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Минск, Белорусь  
e-mail: pharmcenter@academpharm.by

Последнее время большое внимание уделяют разработке препаратов на основе аминокислот, применяемых в качестве вспомогательных средств при терапии различных патологических состояний, а также включению аминокислот и витаминов в состав биологически активных добавок.

Целью данного исследования явилось изучение активности ряда ферментов и субстратов в крови экспериментальных животных в условиях гипоксии и возможность коррекции выявленных отклонений с помощью пиридоксина и глутамина, а также значение водной ржаной вытяжки в данном эксперименте исследования выполнены на белых крысах-самках линии Вистар массой 110-140 грамм содержащихся в виварии института фармакологии и биохимии НАН Беларуси. Всех животных распределяли на десять равноценных групп по 5 особей в каждой. Животные 1-4 групп подвергались внутрибрюшинной (в/б) инъекции физиологического раствора и служили контролем, внутрибрюшинному введению раствора глутамина (Glu) в течение трех дней (200 мг/кг, pH 7,0), инъекции раствора пиридоксина (40 мг/кг) и введение нитрита натрия в дозе 50 мг/кг для создания гемической гипоксии. Животным 5-7 групп вводили в/б в течение 3-х дней ржаную вытяжку, пиридоксин и глутамин соответственно; за 60 мин до декапитации животных вводили нитрит натрия в/б. Восьмая группа получала в/б раствор глутамина и пиридоксина в течение трех дней. Девятая группа – крысы после острой гипоксии на фоне предшествующего трехдневного введения В<sub>6</sub> и Glu. Десятая группа – крысы после острой гипоксии на фоне предшествующего трехдневного введения ржаной водной вытяжки и Glu. Отбор крови осуществляли через 60 минут после введения нитрита натрия. Изучали состояние ряда биохимических параметров в сыворотке крови экспериментальных животных и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов, а также число ядерных эритроидных клеток. Достоверность различий между группами оценивали с помощью методов параметрической статистики (t-критерий Стьюдента) и ANOVA (множественный анализ).

Установлено, что краткосрочное комбинированное действие изучаемых веществ в применяемых концентрациях приводит к достоверным изменениям ряда биохимических показателей. Так, отмечено повышение содержания IgM в группах, где крысы подвергались острой гемической гипоксии на фоне введения пиридоксина и/или глутамина (группы №6,7,9) на 20-34% и ржаной вытяжки (группы №5, 10) - на 88%. Не выявлено изменение содержания иммуноглобулинов G во всех экспериментальных группах животных.

Известно, что антигипоксанты и гипоксия приводят к изменению соотношения клеточных субпопуляций в кроветворной ткани, а также к цитогенетическим нарушениям и/или изменению экспрессии ряда генов. Гемическая гипоксия в течение одного часа, вероятно, не могла привести к явному изменению гематологических показателей периферической крови. Анализ крови животных, получавших различные добавки, показал достоверное увеличение числа ядерных эритроидных клеток при инъекциях глутамина и ржаной вытяжки, как вместе, так и по отдельности. Это факт указывает о возможной интенсификации процессов пролиферации эритроцитов, что является одним из защитных механизмов против гипоксии.

Согласно литературным данным, падение активности АЛТ свидетельствует о состоянии недостаточности пиридоксина в организме. Однако, снижение активности данного фермента в условиях гипоксии не восстанавливается краткосрочными введениями В<sub>6</sub>, тогда как нормализация этого фермента происходит в результате действия водной ржаной вытяжки. И при гипоксии, и при комбинированном воздействии изучаемых веществ на фоне гипоксии наблюдалось достоверное снижение триглицеридов на 24-48% по сравнению с контролем. В группах крыс, которым вводили В<sub>6</sub>, вырос уровень креатинина и мочевины. Активность эритроцитарной Г-6-ФДГ уменьшилась при гипоксии, а также в тех группах, где гипоксия комбинируется с В<sub>6</sub>.

Таким образом, изучаемые вещества проявляют на фоне гипоксии иммуномодулирующие свойства, причем водная ржаная вытяжка повышает в 3,5 раза содержание IgM в опытных образцах, чем там где применялось воздействие Glu и/или пиридоксина. Не происходит восстановления активности АЛТ до уровня контрольных показателей, увеличивается концентрация мочевины и креатинина, а также не нормализуется активность Г-6-ФДГ, обеспечивающей физиологический уровень проницаемости мембран эритроцитов в условиях гемической гипоксии при применении В<sub>6</sub> и/или Glu.

**METABOLIC EFFECTS OF GLU AND B<sub>6</sub> COMBINED ACTION AT THE ACUTE HEMIC HYPOXIA***Shafranovskaya E.V., Afonin V.Yu., Volykhina V.E.*

Inst. of Pharmacology and Biochemistry of NASB, Minsk, Belarus

E-mail: [pharmcenter@academpharm.by](mailto:pharmcenter@academpharm.by)

Presently, the researchers pay much attention to the development of amino acid-based preparations used as auxiliary drugs in the therapy of various pathologic states as well as to the inclusion of amino acids and vitamins into the composition of biologically active additives.

The objects of study were the activity of a number of enzymes and substrates in the blood of experimental animals in the conditions of hypoxia and the possibility of correction of revealed deviations with pyridoxin and glutamine as well as the significance of aqueous rye extraction in this experiment.

The study was carried out with white female Wistar rats weighing 110-140 g taken from the vivarium of the Institute of Pharmacology and Biochemistry of NASB. The animals were divided into ten equal groups 5 animals in each. The animals of groups 1 to 4 underwent 1) an intraperitoneal injection of salt solution and were the control ones; 2) intraperitoneal injection of glutamine (Glu) solution during 3 days (200 mg/kg, pH 7.0); 3) injection of pyridoxin solution (40 mg/kg) and 4) injection 50 mg/kg of sodium nitrite in order to cause hemic hypoxia. The animals of groups 5 to 7 underwent 5) intraperitoneal injection of rye extraction during 3 days; 6) injection of pyridoxin; 7) injection of glutamine; 60 minutes before the decapitation they underwent the intraperitoneal injection of sodium nitrite. Group 8 – injection of glutamine and pyridoxin solutions during three days. Group 9 – acute hypoxia preceded by injections of glutamine and pyridoxin solutions during three days. Group 10 - acute hypoxia preceded by injections of glutamine and rye extraction during three days. The blood was taken for analysis 60 minutes after the injection of sodium nitrite. A number of biochemical parameters was studied in blood serum of animals as well as the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase of erythrocytes and the quantity of nuclear erythroid cells. The reliability of differences between groups was assessed by methods of parametric statistics (t-test) and ANOVA (analysis of variance).

It was found that short-term combined action of studied substances in used concentrations led to reliable changes of a number of biochemical indices. Increase of IgM content was registered in groups that underwent the acute hemic hypoxia after pyridoxin and/or glutamine injection (groups 6, 7, 9) – by 20-34%, and after the injection of rye extraction (groups 5, 10) – by 88%. The content of G immunoglobulins did not change in any group.

It is known that antihypoxants and hypoxia cause changes in correlation of cell subpopulations in hematopoietic tissue, cytogenetic damages and/or change of expression of a number of genes. Probably, hemic hypoxia during one hour could not evidently change the haematological indices of peripheral blood. The analysis of blood of animals showed verifiable increase of number of nuclear erythroid cells after the injections of glutamine and rye extraction, both together and separately. This fact testifies to the possibility of intensification of erythrocytes proliferation, which is one of mechanisms of protection from hypoxia.

According to literary data, the fall of ALT activity testifies to pyridoxin insufficiency in the organism. However, in the conditions of hypoxia, the short-term injections of B<sub>6</sub> do not recover the activity of enzyme whereas the aqueous rye extraction does. Both during hypoxia and at the combined effect of studied substances against the background of hypoxia the reliable decrease of triglycerides by 24-48% as compared with control was observed. The levels of creatinine and urea increased in groups of animals with B<sub>6</sub> injections. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase of erythrocytes decreased during the hypoxia and when hypoxia was combined with B<sub>6</sub>.

Thereby the studied substances showed immunomodulating properties, and the aqueous rye extraction increased 3.5 times IgM content in samples as high as Glu and/or pyridoxin did. The use of pyridoxin and/or glutamine in the conditions of hemic hypoxia did not recover ALT activity up to the control levels, did not recover the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase which provides the physiological level of permeability of erythrocyte membranes; the concentrations of urea and creatinine increased.





## ИЗУЧЕНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ДЕГИДРОКВЕРТЕЦИНА

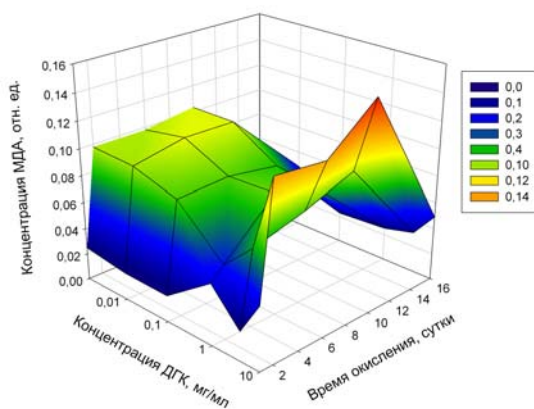
Шаталин Ю.В.<sup>1,2</sup>, Шмарев А.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Пушинский государственный университет, Пушино, Россия.

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия.

<sup>3</sup> Пензенский государственный педагогический университет, Пенза, Россия.  
e-mail: it@rambler.ru

Способность флавоноидов предотвращать перекисное окисление липидов в последнее время широко используют для профилактики и сопутствующей терапии патологий сопровождающихся развитием окислительного стресса. В работе сконцентрировано внимание на способности флавоноида – дигидрохверцетина, предотвращать или ускорять накопление активных форм кислорода и метаболитов окислительного стресса – карбонильных соединений. На модели окисления лецитина показано, что дигидрохверцетин проявляет прооксидантный эффект в щелочной области рН, тогда как при нейтральных и кислых значениях рН дигидрохверцетин является эффективным антиоксидантом. В присутствии ионов железа (II), катализирующих реакцию Фентона, дигидрохверцетин образует комплекс с металлом, который проявляет антиоксидантную активность в области высоких значений рН. В процессе окисления липида в присутствии антиоксиданта обнаружена "седловидная" форма зависимости накопления малонового диальдегида и концентрации дигидрохверцетина от времени окисления (рис. 1), что говорит о наличие концентрационных границ про- и антиоксидантной активности дигидрохверцетина и наличие как минимум двух механизмов прооксидантного действия флавоноида.



**Рис. 1.** Изменение концентрации МДА при окислении лецитина в присутствии дигидрохверцетина и сульфата железа (II).

*Работа поддержана грантом аналитической ведомственной целевой программы "Развитие научного потенциала высшей школы" № 2.1.1/6872.*



## THE STUDYING PRO- AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIHYDROQUERCETIN

Shatalin Yu.V.<sup>1,2</sup>, Shmarev A.N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pushchino state university, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> Institute of theoretical and experimental biophysics, Pushchino, Russia.

<sup>3</sup> Penza state pedagogical university, Penza, Russia.

e-mail: it@rambler.ru

The ability of flavonoids to prevent of lipid peroxidation recently widely use for preventive maintenance and accompanying therapy of pathologies accompanied by development of oxidation stress. In works the attention to abilities of flavonoid – dihydroquercetin is concentrated, to prevent or accelerate accumulation of active forms of oxygen and metabolites of oxidative stress – carbonyl compounds. On model of oxidation of lecithin it is shown, that dihydroquercetin exhibit of prooxidant effect in alkaline zone pH whereas at neutral and acidic values pH dihydroquercetin is an effective antioxidant. In the presence of ions of iron (II), which catalyze of Fenton's reaction, the complex dihydroquercetin with metal shown antioxidant activity in the field of high values pH. In the course of lipid peroxidation in antioxidant presence the "saddle" form of dependence of accumulation malonic dialdehyde and concentration dihydroquercetin from oxidation time (fig. 1) that speaks about presence of concentration limits pro- and anyioxidant activity of dihydroquercetin and presence at least two mechanisms prooxidant actions of flavonoid.

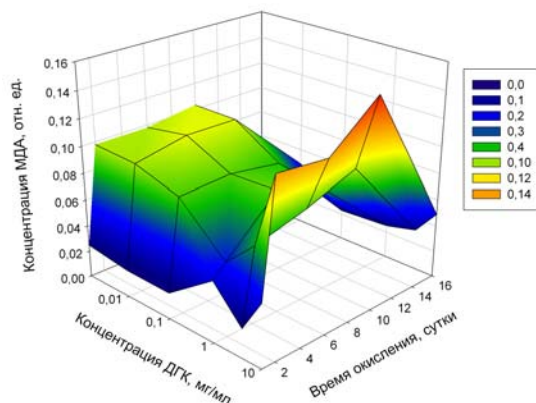


Fig. 1. Change of concentration MDA at lecithin oxidation at presence dihydroquercetin and sulphate of iron (II).

The study is supported by the grant of the analytical departmental target program "Development of scientific potential of the higher school" № 2.1.1/6872.



## ДЕТОКСИКАЦИЯ ОБЛУЧЕННОЙ ВОДЫ И ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИОКСИДАНТОВ

*Шевченко И.Н., Мисюра А.Г.*

Институт прикладных проблем физики и биофизики НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: vadiks117@mail.ru

**Задачи работы.** Глобальное повышение радиационного фона приводит к интенсификации роста различного рода грибов, водорослей, плесени, что в свою очередь предъявляет повышенные требования к методам стерилизации. Увеличение стерилизующих доз при облучении или озонировании приводит к росту концентрации свободных радикалов и пероксидов.

Задачей настоящей работы было отработать тестирование количественного определения свободных радикалов и перекисных соединений с последующим подбором антиоксидантов (АО) для их дезактивации.

**Методы исследований.** В качестве моделей для получения свободных радикалов и пероксидов водорода и органических соединений были использованы следующие образцы воды: 1) водопроводная вода Киева, 2) вода из зоны очистительных фильтров, 3) различные концентрации взвеси *E.coli*, 4) суспензии непатогенного гриба *Thielavia species*, 5) суспензии дрожжей *Candida Tropicalis*. Микробиологические объекты получали и тестировали в Институте микробиологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Указанные выше образцы облучали до полной стерилизации монохроматическими пучками электронов с  $E$  ср. 2 МэВ и поглощенной дозой от 0,3 до 7,0 Мрад или озонировали на экспериментальном озонаторе, автоматизированном компьютерной программой. Исследования проведены в Институте физической химии НАН и Институте коллоидной химии и химии воды НАНУ.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Индикация свободнорадикальной активности воды и водных растворов была проведена методами радиоспектрометрии (ЭПР), хемилюминесценции и трибохемилюминесценции. Отработан также метод хемилюминесцентного определения пероксидов водорода и органических соединений.

Выяснение природы свободных радикалов и пероксидов, их количественную характеристику и динамику убывания проводили, используя различные ингибиторы свободнорадикальных процессов: супероксиддисмутазу (ингибитор анион-радикала кислорода), каталазу и пероксидазу (инактиваторы пероксидов водорода), аскорбиновую кислоту, альфа-токоферол. Снижение токсичных продуктов в модельных растворах для обоих видов стерилизации во времени происходит двухфазно по экспоненциальному типу. Это короткоживущие (2 – 3 сут.) и долгоживущие радикалы, количество последних выходит на стационарный уровень (Институт ИПОР НАНУ, Институт коллоидной химии и химии воды НАНУ)

Принимая во внимание окислительный характер деструктивного действия радикалов и пероксидов были исследованы различные классы АО, а именно: ферменты и ингибиторы свободнорадикальных процессов общего действия, металлы-восстановители, иониты, обработанные металло-восстановителем.

Приведенные выше разработки проводятся для финишной санитарно – гигиенической обработки воды. Детоксикация облученной воды и водных растворов необходима для профилактики онкозаболеваний и защиты генофонда страны. В технике – очистка воды снижает ее коррозионное действие на аппаратуру и оборудование.



## DETOXICATION OF IRRADIATED WATER AND WATER SOLUTIONS USING ANTIOXIDANTS

*Shevchenko I.N., Misyura A.G.*

Institute of applied problems in physics and biophysics, NAS of Ukraine  
e-mail: vadiks117@mail.ru

**Introduction.** Global elevation of radiation background has resulted in intens growth of various mushrooms , seaweeds and mould, which sets new standards for sterilization methods. Increased sterilization dosage under irradiation or ionization brings about increase in free radicals and peroxides concentrations.

**Objective.** To work out testing procedures for quantitative determination of free radicals and peroxide compounds followed by selection of antioxidants for their detoxication.

**Methods.** The following samples of water were used as models for obtaining free radicals, hydrogen peroxides and organic compounds: 1) tap water in the city of Kiev, 2) filter-purified water, 3) different concentrations of E.coli suspension, 4) suspensions of non-pathogenic mushroom Thielavia species, 5) suspensions of yeast Candida Tropicalis. The microbiological objects were obtained and tested at the Zabolotny Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Ukraine. The samples in question were irradiated till their complete sterilization with monochromatic rays of electrons (E averaged 2 MeV and the received doses were from 0.3 through 7.0 Mrad) or ozoned using an experimental computerized ozoner. The investigation was done at the Institute of Physical Chemistry and Institute of Colloid and Water Chemistry NAS of Ukraine.

**Results.** Indication of free radical activity of water and water solutions was done using radio-spectrometria , chemiluminescence and tribochemiluminescence. We also tested the method of chemiluminescent identification of hydrogen peroxides and organic compounds.

The free radicals' nature, their amount and dynamics of decrease were investigated using various inhibitors of free radical processes: super-oxid-dismutase (an oxygen anion-radical inhibitor), cathalase and peroxidase (hydrogen peroxides inactivators), ascorbic acid, and alfa-tocoferol. Toxic products in model solutions for both kinds of sterilization decreased in two phases exponentially. Those were long-lived (two to three days) and long-lived radicals. The latter approached a stationary level (Institute of Physical Chemistry and Institute of Colloid and Water Chemistry, NAS of Ukraine).

**Discussion.** Taking into account free radicals' and peroxides' oxidizing character of their destructive effects different classes of antioxidants were investigated which included ferments and inhibitors of general character free radical processes, metal-restorators, and metal-restorator treated ionites.

The methods under consideration are used for finishing sanitation-hygienic treatment of water. Detoxication of irradiated water and water solutions is necessary for prevention of oncological diseases and protection of the country's genotype. In engineering water purification decreases its corroding effects on equipment and machinery.



## КОРЕГУЮЧА ДІЯ ВІТАМІНІВ Е ТА С НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ТА АКТИВНІСТЬ $\alpha$ -АМІЛАЗИ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА УМОВ СТРЕСУ

Склярів О. Я., Таловер М. В.

Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, Львів, Україна  
e-mail: rocsmart@yandex.ru

Нейрогенний стресовий вплив є одним з патогенетичних чинників розвитку гострого панкреатиту, який супроводжується розвитком оксидативного стресу. Вітаміни Е та С за участю різних механізмів забезпечують процеси антиоксидантного захисту клітин. Відомо, що високі дози адреналіну викликають структурно-геморагічні ураження слизової оболонки шлунка, та впливають на функціонування підшлункової залози. У зв'язку з цим, завданням наших досліджень було виявити самостійну та поєднану дію вітамінів Е та С на активність процесів ліпопероксидації та вміст NO у тканині підшлункової залози та L-аргініну і активності  $\alpha$ -амілази у сироватці крові за умов стресу.

Матеріали і методи.

Дослідження проведені на 20 білих щурах, самцях вагою 150-200 гр. Стрес викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням адреналіну у дозі 2 мг/кг, вітамін Е (150 мг/кг) та вітамін С (200 мг/кг) вводили за 30 хв до дії адреналіну.

Визначали вміст продуктів тіобарбітурової кислоти (МДА, Тімірбулатов, 1981), активність супероксиддисмутази (СОД, Чеварі С, 1985), вміст NO у тканині підшлункової залози з реактивом Гріса, рівень L-аргініну (І.М.Коренман, 1975) та активність панкреатичної  $\alpha$ -амілази (набір фірми «Pliva Lachema Diagnostica») у плазмі крові.

Результати.

Вплив адреналіну призводить до зростання у тканині підшлункової залози продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) на 16%, вміст NO на 28%, зростання СОД на 64% у порівнянні з інтактними тваринами. Вміст L-аргініну не значно зростав, активність  $\alpha$ -амілази зменшувалась у сироватці крові. При цьому в слизовій оболонці шлунка спостерігали виражені структурно геморагічні ураження, у вигляді ерозій, виразок, та крововиливів.

Введення вітаміну Е зменшувало вміст ТБК активних продуктів на 11%, вміст NO зменшувався не значно, активність СОД знижувалась на 24%. Вміст L-аргініну у сироватці крові зменшувався на 28%, активність  $\alpha$ -амілази не значно знижувалась, у порівнянні із самостійним впливом адреналіну.

Введення вітаміну С на фоні стресу зменшувало кількість ТБК активних продуктів на 10%, вміст NO не значно зменшувався, активність СОД падала на 49% ( $p < 0,005$ ). Активність  $\alpha$ -амілази та вміст L-аргініну у сироватці крові дещо зростали.

Поєднана дія вітамінів Е та С мала тенденцію до зниження процесів ліпопероксидації у порівнянні із самостійною дією адреналіну. Вміст NO зменшувався на 45%, активність СОД зростала на 13% у тканині підшлункової залози. У крові активність  $\alpha$ -амілази зростала на 44%, концентрація L-аргініну була вища, ніж при впливі віт Е на фоні стресу.

Висновок.

Вітамін Е локалізується у плазматичній мембрані проявляє антиоксидантний вплив шляхом розриву ланцюга окисних процесів. Антиоксидантний ефект вітаміну С пов'язаний із зв'язуванням  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2^\cdot$ , і ін., та відновленням  $\alpha$ -нітрозомісних сполук.

Отже введення  $\alpha$ -токоферолу на фоні стресу викликаного введенням адреналіну призводить до зменшення процесів ліпопероксидації, вмісту оксиду азоту у тканині підшлункової залози. При цьому активність СОД зростала. Активність  $\alpha$ -амілази у плазмі крові знижувалась.

Антиоксидантна дія вітаміну С на фоні стресу характеризується незначним зменшенням активності процесів ПОЛ та значним зниженням активності СОД, активність  $\alpha$ -амілази в крові зростала.

При поєднаній дії вітамінів Е та С не спостерігалось підвищення їх ефектів дії на активність процесів ліпопероксидації, тоді, як відзначалось різке зниження вмісту NO та зростала концентрація  $\alpha$ -амілази в сироватці крові.

Самостійна дія вітамінів Е та С призводить до зменшення процесів ліпопероксидації, тоді, як активність L-аргініну та  $\alpha$ -амілази у сироватці крові виявляють різносторонній вплив.



**THE CORRECTING EFFECT OF VITAMINS E AND C ON THE PROCESSES OF LIPOPEROXIDATION IN PANCREAS AND AMILASE ACTIVITY IN BLOOD SERUM UNDER THE CONDITIONS OF STRESS**

*Sklyarov O.Ya., Talover M.V.*

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine  
e-mail: rocsmart@yandex.ru

Neurogeneous influence of stress is one of the pathogenetic factors in the development of acute pancreatitis, which is accompanied by oxidative stress. Vitamins E and C by use of different mechanisms participate in processes of antioxidative cell damage. It is known that high doses of adrenaline lead to structural hemorrhagic damage of gastric mucosa and influence the function of pancreas. By reference to this the aim of our investigation was to determine separate and combined effect of vitamins E and C on the activity of processes of lipoperoxidation and NO level in pancreas tissue and level of L-arginine, amylase activity in blood serum in stress.

**Material and methods.**

The investigations were conducted on 20 white rats, with body weight of 150-200 g. Stress was induced by one-acting intraperitoneal adrenaline injection in dose of 2 mg, vitamin E (150 mg/kg) and vitamin C (200 mg/kg) were injected 30 minutes before the influence of adrenaline.

The level of products of tiobarbituric acid (MDA, Timirbulatov, 1981), superoxididismutase (SOD, S. Chevari C, 1985), NO level with the use of reactive of Griess in pancreas tissue, level of L-arginine (I. M. Corenman, 1975) and activity of pancreatic amylase («Pliva Lachema Diagnostica») in blood plasm were determined.

**Results.**

Adrenaline influence provokes the increase of the activity of tiobarbituric acid products (TBA) for 16%, NO level for 28%, SOD increase for 64%. Simultaneously the level of structural hemorrhagic lesions in gastric mucosa was determined, which were observed like erosions, ulcers and hemorrhages. The level of L-arginine in serum was not significantly increased,  $\alpha$ -amilase activity was decreased.

Vitamine E administration provoked the decrease of the level of active products of TBA for 11%, NO level was decreased not significantly, SOD activity was decreased for 24%. L-arginine level in serum was decreased for 28% and amilase activity was decreased not significantly in comparison to adrenaline influence.

Vitamine C administration under the conditions of stress decreased the amount of NBA active products for 10%, the level of NO decreased not significantly, SOD activity decreased for 49%.  $\alpha$ -amilase activity and L-arginine level in serum increased not significantly.

Combined effect of vitamins E and C had tendency to decrease of lipoperoxidation processes in comparison to separate effect of adrenaline. NO level decreased for 45%, SOD activity increased for 13% in pancreatic tissue. Activity of  $\alpha$ -amilase increased for 44%, L-arginine concentration was higher in comparison to vitamine E effect in stress.

**Conclusion.**

Vitamin E, being located in plasmatic membrane, shows antioxidative effect by the disruption of oxidative processes. Antioxadative effect of vitamin C is due to binding  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^+$ ,  $O_2^+$ , etc and reconstruction of  $\alpha$ -nitroso-containing compounds.

So administration of  $\alpha$ -tokoferol in stress, induced by adrenaline injection provokes the decrease of lipoperoxidation, NO level in pancreatic tissue. Simultaneously the SOD activity increased.  $\alpha$ -amilase activity in plasm diminished.

Antioxidative effect of vitamin C in stress is characterized by not significant decrease of activity of the processes of lipoperoxidation and significant decrease of SOD activity, the  $\alpha$ -amilase activity in blood was increased.

Increase of the activity of lipoperoxidation processes under the combined effects of vitamins E and C was not evaluated but simultaneously significant decrease of NO level was seen and concentration of  $\alpha$ -amilase in blood serum increased.

Separate effect of vitamins E and C provokes decrease of lipoperoxidation, and L-arginine and  $\alpha$ -amilase activity in blood serum show multilateral influence.



## ВПЛИВ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛУ НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА ВМІСТ ОКСИДУ АЗОТУ В ШЛУНКУ ЗА УМОВ БЛОКУВАННЯ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ ТА ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ-2

Скляр О.Я., Журомський В.С.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
e-mail: vjacheslavmed@rambler.ru

Розвиток ульцерогенних ушкоджень слизової оболонки шлунка (СОШ) супроводжується зростанням експресії індуктибельної NO-синтази (iNOS) та циклооксигенази-2 (COX-2) в СОШ за умов експериментальної виразки.

Оксид азоту, вступаючи в реакцію з кисневими радикалами, утворює пероксинітрит, який є одним з факторів розвитку процесів ліпопероксидації та деструктивних ушкоджень клітин СОШ. Простагландини, що синтезуються COX-2, також приймають участь в процесах виразкоутворення.

Вітамін Е (віт Е) є одним з компонентів системи антиоксидантного захисту, однак його характер дії залежить від дози, виду та активності ферментів антиоксидантного захисту.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було визначення активності процесів ліпопероксидації в СОШ за умов введення екзогенного віт Е на фоні блокування iNOS та COX-2.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження були проведені на 20 білих щурах. Моделювання структурно - геморагічних ушкоджень (СГУ) СОШ проводили шляхом введення адреналіну інтраперітонеально в дозі 2 мг/кг. Віт Е ("Sigma") попередньо був розчинений у соняшниковій олії і вводився внутрішньом'язево (150 мг/кг), віт С (200 мг/кг) вводили внутрішньом'язево. Вітаміни вводились за 30 хв до дії ульцерогенного фактора. Блокування COX-2 проводили шляхом перорального введення целекоксибу в дозі 10 мг/кг. Блокування iNOS здійснювали введенням L-канаваніну в дозі 100 мг/кг внутрішньом'язево.

Тварини були поділені на 4 групи досліджень: перша – тварини, у яких моделювали ульцерогенні ушкодження СОШ шляхом введення адреналіну; друга – тварини, яким вводили віт Е на фоні ульцерогенного ушкодження шлунка; третя – тварини, у яких на фоні введення адреналіну визначали поєднану дію віт Е та блокатора COX-2 целекоксибу; четверта - тварини, у яких на фоні введення адреналіну визначали поєднану дію віт Е та блокатора iNOS L-канаваніну. Процеси ліпопероксидації оцінювали на основі визначення вмісту продуктів ТБК (Тімірбулатов, 1981), активність ферментів антиоксидантного захисту – за визначенням СОД (Чеварі С., 1985), вміст окису азоту (NO), використовуючи реактив Грися. Вміст віт Е у плазмі крові визначали за методом Черняускене З. Ч. (1984).

Результати оброблено за методом варіаційної статистики з визначенням t-критерію Стьюдента. Всі дослідження проведено відповідно норм, передбачених Європейською Комісією по нагляду за проведенням лабораторних дослідів за участю експериментальних тварин.

**Результати досліджень.** Дія віт Е призводила до зменшення утворення продуктів ТБК на 18% та активності СОД на 25% у СОШ ( $p < 0,05$ ). Вміст окису азоту незначно зростав. Концентрація віт Е в крові була підвищена на 45% ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з самостійним впливом адреналіну.

Блокування iNOS L-канаваніном на фоні введення віт Е спричиняло різке зменшення продуктів ТБК – на 39% , вмісту окису азоту – на 33%. Активність СОД суттєво не змінювалась.

Блокування COX-2 при одночасній дії віт Е, на відміну від самостійного впливу віт Е, призводило до зменшення вмісту продуктів ТБК на 30%, вмісту окису азоту - на 46%. Вміст віт Е при блокуванні COX-2 L-канаваніном в плазмі крові був дещо вищим, ніж за самостійної дії віт Е.

**Висновки.** Дія віт Е на процеси ліпопероксидації та активність ферментів антиоксидантного захисту моделюється в залежності від вмісту окису азоту та простагландинів, що синтезуються iNOS та COX-2 відповідно.

Одночасне блокування iNOS та COX-2 і введення віт Е проявляє більш виражений антиоксидантний ефект, ніж самостійний вплив віт Е, що пов'язано зі зменшенням продуктів ТБК та вмісту окису азоту в СОШ.

Підвищення антиоксидантних процесів при поєднаній дії віт Е на фоні блокування iNOS та COX-2 можливо пов'язані зі зменшенням синтезу пероксинітриту, який є одним з активаторів активності COX-2.

**EFFECT OF  $\alpha$ -TOCOFEROL ON THE PROCESSES OF LIPOPEROXIDATION AND CONTENT OF NITRIC OXIDE IN THE STOMACH UNDER BLOCKAGE OF INDUCIBLE NO-SYNTASE AND CYCLOOXIGENASE-2**

*Sklyarov A. Ya., Zhuromskiy V.S.*

Danylo Halytskyi national medical university of Lviv  
e-mail: vjacheslavmed@rambler.ru

Development of ulcerogenic lesions in gastric mucosa (GM) is associated with increased expression of inducible NO-synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in gastric mucosa under experimental ulcer.

Once nitric oxide has started reacting with oxygen radical, it produces peroxinitrite, a factor of the development of lipoperoxidation processes and destructive changes in the cells of GM. Prostaglandins synthesized by COX-2 also participate in the processes of ulcerogenesis.

Vitamin E (Vit E) is one of components of the antioxidant protection system but character of its action is related to the dose, kind, and activity of the antioxidant enzymes.

Proceeding from the aforementioned, purpose of our research was to assess activity of lipoperoxidation processes in GM resulting from injection of endogenic Vit E at the background of iNOS and COX-2. blockage.

**Material and methods.** The investigation was carried out on 20 white rats. Structural-hemorrhagic lesions (SHL) in GM were modeled by adrenaline injected intraperitoneally in the dose of 2 mg/kg. Vit E (Sigma) was dissolved in the sunflower-seed oil prior to intramuscular injection (150 mg/kg), Vit C (200 mg/kg) was injected intramuscular. Vitamins were injected 30 min before the action of ulcerogenic factor. Blockage of COX-2 was accomplished with celecoxib introduced perorally (10 mg/kg). Blockage of iNOS was performed with the intramuscular injection of L-canavanine (100 mg/kg). Experimental animals were divided into the four assessment groups: group 1 was modeled ulcerogenic lesions of GM by means of adrenaline injection; group 2 was injected Vit E at the background of ulcerogenic damage of the stomach; group 3 – at the background of adrenaline injection, was determined combined action of Vit E and iNOS blocker – L-canavanine; and group 4 - at the background of adrenaline injection, was determined combined action of iNOS – L-canavanine. Lipoperoxidation processes were estimated by the indices of TBA products (Timirbulatov 1981), activity of enzymes of antioxidant protection – by the activity of SOD (Chevari S. 1985); content of nitric oxide (NO) was determined with the use Gries' reagent. Content of Vit E in the plasma of blood was estimated by the method of Chernyauskene Z.Ch. (1984).

Obtained results were processed by the method of variation statistics with the determination of Student's t-criterion. All investigations were performed according to the principles approved by the European Commission for inspection of laboratory investigations with the involvement of experimental animals.

**Results.** Action of Vit E caused decline of TBA products by 18% and reduction of SOD activity by 25% in GM ( $p < 0.05$ ). Content of NO slightly increased. Blood concentration of Vit E was by 45% ( $p < 0.05$ ) higher as compared to the separate action of adrenaline.

Blockage of iNOS with L-canavanine at the background of Vit E injection resulted in steep decline of TBA products – by 39% and NO content – by 46%. Under blockage of COX-2 with L-canavanine, content of Vit E in the plasma of blood was somewhat higher than under a separate action of Vit E.

**Conclusions.** Action of Vit E upon the lipoperoxidation processes and activity of antioxidant protection enzymes is modulated depending on the content of nitric oxide and prostaglandins synthesized by iNOS and COX-2, respectively.

Concomitant blockage of iNOS and COX-2 and injection of Vit E exert a more pronounced antioxidant action than independent effect of Vit E that is due to decrease of TBA products and content of NO in GM.

Enhancement of antioxidant processes under a combined action of Vit E at the background of iNOS and COX-2 blockage are likely to be related to reduced synthesis of peroxinitrite which promotes COX-2 activity.





## **ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ**

*Слета И.В., Гальченко С.Е., Олефиренко А.А.*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Несмотря на многолетний опыт и успехи консервативного и оперативного лечения хронических диффузных заболеваний печени, на сегодняшний день нельзя говорить о наличии эффективных методов терапии этих заболеваний. Одной из причин этого является отсутствие препаратов, достаточно полно стимулирующих регенерацию печени.

В последние годы для оптимизации процессов регенерации в органах и тканях стали применять регуляторные пептиды. Под оптимизацией в данном случае имеется в виду не только поддержка целостности органа или ткани в нормальных условиях, но и быстрое и эффективное ее восстановление при остром или хроническом воздействии какого-либо повреждающего фактора, существенное снижение темпа (или возможности) развития патологических форм регенерации: разрастание фиброзной ткани, метапластическое перерождение клеток (как в случае цирроза) и др. На сегодняшний день физиологически активные пептиды выделены практически из всех внутренних органов. Одной из форм препаратов, содержащих регуляторные пептиды, могут быть экстракты тканей соответствующих органов. Экспериментальными исследованиями показано стимулирующее влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов печени новорожденных поросят и селезенки свиней на регенерацию печени при ее диффузных заболеваниях. При этом было установлено, что действие экстракта печени тканеспецифично, а селезенки – тканенеспецифично.

Цель работы состояла в определении особенностей действия смеси экстрактов криоконсервированных фрагментов печени и селезенки свиней на характер и динамику восстановительных процессов в печени крыс с экспериментальным циррозом.

Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Вистар массой 200-250 г. Животные с экспериментальным циррозом были разделены на две группы (экспериментальную и контрольную). Животным экспериментальной группы (85 крыс) на протяжении 3-х суток в брюшную полость вводили по 1 мл смеси экстрактов печени и селезенки (ЭПС). Экстракт содержал 100 мкг/мл пептидов; животным контрольной группы лечение цирроза не проводили (85 крыс). Группа животных с нормальной печенью – 25 крыс.

В работе использованы методы моделирования тетрахлорметан-индуцированного цирроза печени, прижизненной контактной микроскопии, биохимические, гистологические, морфометрические методы и методы статистической обработки результатов.

Гистологические исследования динамики спонтанной регенерации цирротически измененной печени без какого-либо воздействия на нее (контрольная серия) показали, что в течение 2-х месяцев патологические изменения в печени не подвергались полной регрессии после возникновения. Это свидетельствовало об адекватности данной модели цирроза печени, что позволило использовать ее в эксперименте по изучению влияния различных вариантов воздействий на течение репаративных процессов.

Микроциркуляция в печени крыс с экспериментальным циррозом на 7-е сутки после введения экстрактов печени и селезенки характеризуется заметным, по сравнению с контролем, распространением васкуляризации на всю массу органа, при этом синусоиды расширены. На 14-е сутки в печени животных экспериментальной группы отсутствует извилистость синусоидов, свойственная циррозу, а также увеличивается количество функционирующих микрососудов, их площадь 15% больше, чем в контрольной группе.

Гистологические исследования подтвердили, что введение ЭПС останавливает процесс склерозирования цирротически измененной печени и стимулирует восстановление архитектоники поврежденного органа. Отношение стромы к паренхиме при введении экстрактов на 14-е сутки составляет  $3,16 \pm 0,67$ , тогда как при нелеченном циррозе печени в этот же срок оно составляет  $7,09 \pm 1,09$ .

После введения экстрактов активно восстанавливаются метаболические функции в цирротически измененной печени, о чем свидетельствуют (с 14-х суток) нормализация гепатозависимых ферментов, восстановление белоксинтетической функции, а также выраженное снижение интенсивности перекисного окисления липидов.

Таким образом, результаты экспериментального исследования показали, что при введении экстрактов наблюдается активная стимуляция репаративных процессов в цирротически измененной печени экспериментальных животных. В течение месяца восстанавливались все исследованные показатели функции печени до уровня, близкого к нормальному.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности и перспективности использования смеси экстрактов криоконсервированных фрагментов печени и селезенки для стимуляции восстановительных процессов в цирротически измененной печени крыс. Экспериментальное обоснование использования экстрактов печени и селезенки для коррекции структурно-функционального состояния печени крыс с экспериментальным циррозом может быть использовано при разработке теоретических основ новых методов лечения цирроза печени.



## **ACTION OF LIVER AND SPLEEN EXTRACTS ON REPARATIVE PROCESSES IN THE LIVER WITH EXPERIMENTAL CIRRHOSIS**

*Sleta I.V., Galchenko S.E., Olefirenko A.A.*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine  
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Despite long-term experience and certain achievements in conservative and operative treatment of diffuse hepatic disorders, currently there still exists no effective therapy of these diseases. Absence of preparations, capable of sufficiently stimulating liver regeneration, is one of the basic reasons for that.

In recent years regulatory peptides have been applied for optimization of regenerative processes in organs and tissues. In this case optimization means not only maintenance of the organ or tissue integrity under normal conditions, but also their rapid and effective restoration during acute or chronic exposure to any damaging factors, significant slowing down of the rate (or possibility) of development of regenerative pathologic forms: accretion of fibrous tissue, metaplastic transformation of cells (as in the case with cirrhosis), etc. As of today physiologically active peptides have been isolated from nearly all inner organs. And tissue extracts of respective organs may become one of the forms of preparations, which contain regulatory peptides. Experimental research shows the extracts of cryopreserved fragments of newborn pig liver and porcine spleen to stimulate liver regeneration during its diffuse diseases. The action of liver extracts turns out to be tissue-specific, while that of spleen extracts – tissue-nonspecific.

The aim of the given research was to determine specific features of the action of porcine liver and spleen cryopreserved fragment mixture on the nature and dynamics of reparative processes in the livers of rats with experimental cirrhosis.

Male Wistar rats with the body weights of 200-250 g were used in experiments. The animals with experimental cirrhosis were divided in two groups (experimental and control ones). The animals of the experimental group (85 rats) were intraperitoneally injected with 1 ml of liver and spleen extract (LSE) mixture throughout 3 days. Each extract contained 100 µg/ml of peptides; the animals of the control group (85 rats) were not treated for cirrhosis. The group of animals with normal livers amounted to 25 rats.

Methods for modeling carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis, intravital contact microscopy, biochemical, histological, morphometric means and statistical processing methods were used in the given research.

Histological studies of dynamics of spontaneous regeneration of cirrhotically affected livers, which were not exposed to any treatment (control series), showed that for 2 months pathologic changes in the livers did not experience complete regression after their development. This was indicative of the given model of cirrhosis to be quite adequate, thus allowing to experimentally apply it for studying the effect of various exposures on the occurrence of reparative processes.

Microcirculation in the rat livers with experimental cirrhosis at the 7<sup>th</sup> day after injection of liver and spleen extracts was characterized by a pronounced, as compared with control, advancement of vascularization over the whole weight of the organ, and sine curves were expanded. By the 14<sup>th</sup> day the livers of the experimental group animals demonstrated the absence of sine curve irregularities, which was characteristic of cirrhosis, while the amount of functioning microvessels increased, and their area was by 15% higher as compared with the control group.

Histological studies confirmed that LSE injection terminated hardening of the cirrhotically affected liver and stimulated regeneration of architectonics of the injured organ. The ratio of stroma to parenchyma upon injection of extracts by the 14<sup>th</sup> day comprised  $3,16 \pm 0,67$ , while at the same day with the non-treated cirrhosis it was equal to  $7,09 \pm 1,09$ .

Injection of extracts resulted in active restoration of metabolic functions in the cirrhotically affected liver, which was supported (starting from the 14<sup>th</sup> day) by normalization of hepatic-dependent enzymes, recovery of protein-synthesizing function and a significant reduction in the intensity of lipid peroxidation.

Thus, the results of the experimental research showed that injection of extracts was followed by active stimulation of reparative processes in the cirrhotically affected livers of experimental animals. All the studied features of the liver function were restored up to the level, which was close to normal, within one month.

Hence, the results obtained testify to the expedience and perspective of applying a mixture of extracts of cryopreserved fragments of the liver and spleen for stimulating reparative processes in the cirrhotically affected rat liver. Experimental substantiation for applying spleen and liver extracts for correction of the structure-functional state of the rat liver with experimental cirrhosis may be used when developing theoretical grounds for new methods of treatment of the liver cirrhosis.



**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРРОЦЕН-СОДЕРЖАЩИХ БИМОЛЕКУЛ.  
МЕХАНИСТИЧЕСКИЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

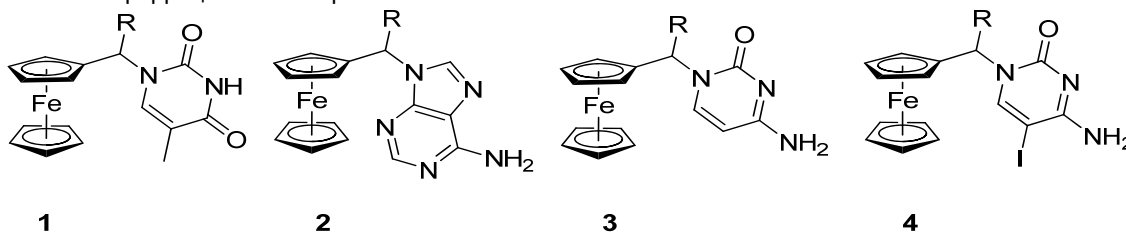
Снегур Л.В.

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация  
e-mail: snegur@ineos.ac.ru

Интенсивные поиски новых лекарственных соединений для химиотерапии опухолевых заболеваний привели в 1960-1970-е годы к появлению на фармацевтическом рынке таких хорошо известных теперь лекарств как меркаптопурин, тиогуанин, фторурацил. Эти препараты содержат в своей структуре различные нуклеиновые основания и были классифицированы как соединения с антиметаболитным действием. В течение 4-х десятилетий и до настоящего времени эти лекарственные соединения с успехом используются в клинической практике. В то же время были обнаружены некоторые негативные побочные эффекты, в основном связанные с гемато- и гепато-токсичностью. Поэтому поиск новых активных противоопухолевых лекарственных соединений, обладающих меньшей токсичностью по отношению к нормальным клеткам и тканям остаётся одной из самых актуальных и важных проблем современной противоопухолевой химиотерапии.

Противоопухолевые свойства ферроцен-содержащих соединений весьма интенсивно исследуются в мире в последние два десятилетия *in vitro* and *in vivo*. Так было обнаружено, что эти соединения эффективны против некоторых солидных опухолей животных, они также обладают ДНК-разрывающей активностью и проявляют ингибирующее действие на синтез ДНК.

Интерес к ферроцен-модифицированным пуриновым и пиримидиновым производным, а также другим биомолекулам, в последние два десятилетия обусловлен уникальными свойствами ферроцена, в особенности, хорошей проницаемостью через липидные мембраны, низкой токсичностью и редокс-активностью. Ферроценовый фрагмент может быть с успехом введён в различные *N*-положения пуриновых и пиримидиновых систем. Недавно мы синтезировали серию новых ферроценовых производных нуклеиновых оснований из нуклеиновых оснований – тимина, аденина, цитозина и 5-идоцитозина – и ферроценовых спиртов.



R = H, Me, Et, Ph

Противоопухолевое действие ферроценовых производных на некоторые опухолевые модели животных, такие как карцинома 755 (Ca 755), меланома В16 и карцинома лёгких Льюис (LLC), изучено *in vivo*. Была обнаружена выраженная противоопухолевая активность изучаемых соединений, до 95% ингибирования опухолевого роста в сравнении с контролем. Такая эффективность весьма значительна и сопоставима с действием препарата цисплатин. Недавно нами было обнаружено синергетное терапевтическое действие при совместном применении ферроценил(метил)тимина (1, R=H) с хорошо известным цитостатиком циклофосфамидом в экспериментах на моделях Ca 755 и LLC [2]. Эти результаты принципиально важны для будущих исследований ферроценовых соединений в качестве перспективных лекарств для полихимиотерапии опухолей.

Обсуждаются возможные пути биологической конверсии ферроцен-модифицированных соединений исходя из структурных и электрохимических данных, химических превращений и результатов тестов по противоопухолевой активности.

Исследование было поддержано Российской академией наук (Программа Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»), Отделением химии и наук о материалах (Проект ОХ-09) и Российским Фондом Фундаментальных Исследований (Проект №09-03-00535).

**Литература:**

1. L.V. Snegur, Yu.S. Nekrasov, N.S. Sergeeva *et al.*, Ferrocenylalkyl azoles: bioactivity, synthesis, structure, *Appl. Organomet. Chem.*, **2008**, 22, 139-147.
2. A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur *et al.*, Simple Route to Ferrocenylalkyl Nucleobases. Antitumor Activity *in vivo*, *Appl. Organomet. Chem.* **2009**, in press.



ANTITUMOR ACTIVITY OF FERROCENE-LABELED BIOMOLECULES.  
MECHANISTIC AND SYNTHETIC ASPECTS

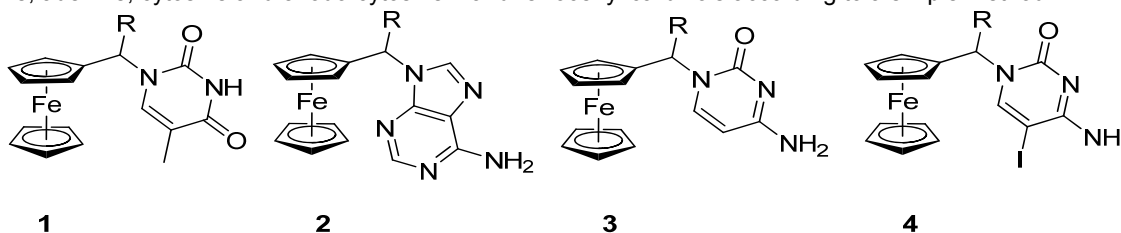
Snegur L.V.

A.N. Nesmeyanov Institute of OrganoElement Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation  
e-mail: snegur@ineos.ac.ru

Intensive searches of novel drugs for chemotherapy of tumor diseases led in the 1960s-1970s to an appearance on pharmaceutical market such well known drugs as mercaptopurine, thioguanine, fluorouracil. These drugs content in their structures various nucleic bases and had been classified as substances with antimetabolic activity. During the past four decades, these drugs had been successfully used in clinical practice. At the same time some negative toxic side-effects of these drugs were found (mainly haemato- and hepatotoxicity). Thus, the search of the new active antitumor drugs with the less toxicity against normal cells and tissues remains one of the most actual and significant problem of the modern antitumor chemotherapy.

Antitumor activities of ferrocene-containing compounds had been extensively studied *in vitro* and *in vivo* in the past two decades. It was found that these compounds are effective against some solid tumors in mice, they are also displayed DNA-cleaving activity and DNA synthesis inhibitory effects.

The interest in ferrocene-modified purine and pyrimidine derivatives during the last two decades caused by the unique properties displayed by ferrocene, in particular, membrane permeability and low toxicity. The ferrocenyl unit has been successfully introduced into different *N*-positions of the purine and pyrimidine ring systems. Recently we synthesized the series of novel ferrocene-modified nucleobases from nucleobases – thymine, adenine, cytosine and 5-iodo-cytosine – and ferrocenyl carbinols according to a simple method.



R = H, Me, Et, Ph

Acute toxicities were defined by V.B. Prozorovsky's express method using the increasing doses of the substances. For those preparations where the determination of LD<sub>50</sub> turned out to be impossible due to the small solubility of the complexes in water, maximum tolerated doses (MTD) were found. All studied compounds belong to low toxicity (MTD 400-1500 mg kg<sup>-1</sup> for uncharged ferrocene-modified compounds) or middle toxicity (LD<sub>50</sub> 178-300 mg kg<sup>-1</sup> for ferricenium salts) series [1].

Antitumor effects of ferrocene derivatives on some murine tumor systems such as carcinoma 755, melanoma B16 and Lewis lung carcinoma were evaluated *in vivo*. The significant antitumor effects of studied compounds, equal to the 95% of tumor growth inhibition, as compared with control, were found. This effectiveness was compared with that of cisplatin. Recently therapeutic synergism of antitumor activity of combination of ferrocenylmethyl thymine (1, R=H) with well-known cytostatic agent cyclophosphamide was demonstrated in experiments with carcinoma 755 and Lewis lung carcinoma [2]. These results are principally important for the further investigation of ferrocene compounds as potential prospective drugs for antitumor polychemotherapy.

The possible routes of biological conversion of ferrocene-modified compounds are discussed taking into consideration the structural and electrochemical data, chemical transformation routes and the results of the antitumor activity tests.

This work was supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Program "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Project OX- 09), and by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 09-03-00535).

References:

1. L.V. Snegur, Yu.S. Nekrasov, N.S. Sergeeva *et al.*, Ferrocenylalkyl azoles: bioactivity, synthesis, structure, *Appl. Organomet. Chem.*, **2008**, 22, 139-147.
2. A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur *et al.*, Simple Route to Ferrocenylalkyl Nucleobases. Antitumor Activity *in vivo*, *Appl. Organomet. Chem.* **2009**, *in press*.



## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ОКСИРЕЗВЕРАТРОЛУ

Соляник<sup>1</sup> Г.І., Сорокіна<sup>1</sup> Л.В., П'ятчаніна<sup>1</sup> Т.В., Слатья<sup>2</sup> Є.А.

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАНУ, Київ, Україна

<sup>2</sup> Інститут винограду та вина «Магарач» УААН, Ялта, Крим  
e-mail: gis@onconet.kiev.ua

Одним із найбільш досліджених природних поліфенолів ряду гідроксистилюбенів з яскраво вираженою антиоксидантною активністю, протипухлинними та антиангіогенними ефектами є резвератрол. Проте, майже нез'ясованими є антиоксидантні властивості та фармакологічна активність його гідроксильованого похідного - оксирезвератролу (2,3',4,5'-тетрагідроксистилюбену), незважаючи на вищі, порівняно з резвератролом, показники розчинності та біодоступності. Терапія оксирезвератролом мишей з привитою карциномою Ерліха не впливає на ріст асцитної форми пухлини, однак призводить до збільшення середньої тривалості життя цих тварин на 27% ( $p < 0.01$ ). Подовження тривалості життя тварин за відсутності прямого протипухлинного ефекту оксирезвератролу на моделі асцитної форми карциноми Ерліха, можливо, відбувається за рахунок реалізації його антиоксидантних властивостей.

**Мета роботи.** Дослідити антиоксидантні властивості оксирезвератролу методом *in vitro*.

**Матеріали і методи:** Оксирезвератрол в формі порошокподібної субстанції отримували із етилацетатного екстракту деревини *Maclura romifera* подальшим концентруванням (ступінь очистки 99%). Антиоксидантні властивості оксирезвератролу (1пкМ-2мМ) досліджували в системах *in vitro*, які містили пероксид гідрогену та генерували супероксидний аніон радикал. Активність оксирезвератролу порівнювали з показниками активності супероксиддисмутази та каталази супернатантів гемолізатів еритроцитів та тканинних екстрактів печінки інтактної миші

**Результати.** Встановлено, що оксирезвератрол *in vitro* здатний проявляти антиоксидантні властивості в діапазонах концентрацій, нижчих за 200 мкМ. Виявлено обернену залежність між концентрацією оксирезвератролу в діапазоні 1 пкМ-20мкМ та здатністю даної сполуки виявляти каталазну активність. Суттєве достовірне ( $p < 0,05$ ) зростання каталазної активності спостерігали при додаванні оксирезвератролу до тканинного екстракту печінки миші. Супероксиддисмутазна здатність оксирезвератролу є найбільш ефективною за концентрацій даного поліфенолу у межах 0,02-20 нМ. Спостерігали збільшення супероксиддисмутазної активності в препаратах супернатантів гемолізатів еритроцитів та тканинного екстракту печінки при додаванні резвератролу в концентраціях 2-20 мкМ до реакційної суміші.

**Висновки.** Оксирезвератрол здатний проявляти антиоксидантні властивості в діапазоні концентрацій 1пкМ-20 мкМ по відношенню до пероксиду гідрогену, а в межах концентрацій 0,02-20 нМ виявляти супероксиддисмутазну активність. Такі властивості оксирезвератролу можуть забезпечувати подовження тривалості життя тварин з пухлинами за відсутності прямого протипухлинного ефекту.



## THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF OXYRESVERATROL

*Solyanik<sup>1</sup> G. I., Sorokina<sup>1</sup> L. V., Pyatchanina<sup>1</sup> T. V., Slastya<sup>2</sup> Eu. A.*

<sup>1</sup> R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of Vine and Wine "Magarach", Yalta, Ukraine

**E-mail:** gis@onconet.kiev.ua

One of the most examined compounds from the group of hydroxystilbens is resveratrol for which rather high antioxidant ability, antitumor and antiangiogenic activities have been shown. However, the pharmacological properties and antioxidant activity are less known for the resveratrol hydroxylated derivate - oxyresveratrol (2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) in spite of its considerably better solubility in water and higher bioavailability in comparison with resveratrol. Oxyresveratrol therapy in mice with Ehrlich carcinoma does not influence the growth either of solid or of ascites tumor, although it leads to increase of mean life duration of animals with ascites form of Ehrlich carcinoma by 27% ( $p < 0,01$ ). In the absence of the direct antitumor effect in the model of ascites form of Ehrlich carcinoma the prolongation of life duration is probably determined by the antioxidant properties of oxyresveratrol.

**Aim of the study.** To investigate the antioxidant properties of oxyresveratrol using the in vitro approach.

**Materials and methods:** Oxyresveratrol in the form of powder-like substance was obtained from purified extract of the wood of *Maclura pomifera* by ethyl-acetate isolation with further purification (rate of purification 99%). The antioxidant properties of oxyresveratrol (1 pM-2 mM) were investigated in vitro using the systems with hydrogen peroxide and superoxide-anion. The antiradical activity of oxyresveratrol was compared with the indices of catalase and superoxide dismutase activities in hemolysat of erythrocytes and in liver tissue extract from the intact mouse.

**Results.** The antioxidant properties of oxyresveratrol were demonstrated in the concentrations less than 200  $\mu$ M. The catalase activity of this natural polyphenol was shown the inverse dependence from the concentration of oxyresveratrol in the range of 1 pM-200  $\mu$ M. The significant and reliable ( $p < 0,05$ ) increase of catalase activity was established after adding of oxyresveratrol to the liver tissue extract. The superoxide dismutase activity of oxyresveratrol was revealed to show the more effectiveness at the concentration range of 0,02-20 nM. In the presence of oxyresveratrol (2-20  $\mu$ M) in the reaction mix the erythrocytes hemolysat and liver tissue extract were revealed the higher indices of superoxide dismutase activity.

**Conclusions.** The abilities of oxyresveratrol to reveal the antioxidant properties concerning hydrogen eroxide and superoxide- anion were shown for the concentration ranges of this polyphenol of 1 pM-200  $\mu$ M and 0,02-20 nM respectively. These properties of oxyresveratrol can promote the prolongation of life duration of animals with tumors in the absence of the direct antitumor effect.



## ПРОТИПУХЛИННА ТА АНТИМЕТАСТАТИЧНА АКТИВНІСТЬ ОКСИРЕЗВЕРАТРОЛУ

Соляник<sup>1</sup> Г.І., Горбик<sup>1</sup> Г.В., Федорчук<sup>1</sup> О.Г., Якшибаєва<sup>1</sup> Ю.Р., Слатья<sup>2</sup> Є.А.

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАНУ, Київ, Україна

<sup>2</sup> Інститут винограду та вина «Магарач» УААН, Ялта, Україна  
e-mail: gis@onkonet.ua; grigor.72@mail.ru

Гідроксистильбени відносяться до групи природних поліфенолів, яким притаманна здатність нейтралізувати в клітинах радикальні форми кисню та азотних сполук (ROS/RNS). Найбільш відомим та дослідженим поліфенолом цієї групи є резвератрол, для якого було показано достатньо високу протипухлинну та антиангіогенну активність. Менш відомим представником гідроксистильбенів є оксирезвератрол (2,3',4,5'-тетрагідроксистильбен). Незважаючи на суттєво кращу розчинність оксирезвератролу у воді (в порівнянні з резвератролом) та вищу біодоступність, його фармакологічна активність (в тому числі і протипухлинна) майже не вивчалась.

**Мета роботи.** Дослідити вплив оксирезвератролу на ріст та метастазування експериментальних злоякісних пухлин та оцінити його вплив на функціональну активність перитонеальних макрофагів.

**Матеріали і методи:** дослідження виконані на мишах - лінії С57В1/6 (карцинома Льюїс) та білих безпородних (карцинома Ерліха). В якості пухлинних моделей використовували два варіанти карциноми легень Льюїс (LLC та LLC/R9) з різною залежністю росту від процесів пухлинного ангіогенезу, та карциному Ерліха (асцитний та солідний варіанти). Оксирезвератрол в формі порошкоподібної субстанції отримували із етилацетатного екстракту деревини *Maclura rotifera* з подальшим концентруванням (ступінь очистки 99%). Терапію проводили щоденно протягом 15 діб шляхом введенням оксирезвератролу *per os* в сумарній дозі 0,2 мг/г ваги тварини. Визначали динаміку росту пухлини, середню кількість метастазів та їх розподіл по фазам росту, об'єм метастатичного ураження, збільшення середньої тривалості життя. Оцінювали при цьому зміни стану протипухлинної резистентності за рівнем метаболічної і цитотоксичної активності перитонеальних макрофагів.

**Результати.** Встановлено, що терапія оксирезвератролом не впливає на ріст первинної пухлини у мишей з LLC та LLC/R9. Між тим виявлена здатність цього агенту інгібувати процес метастазування, що проявляється в статистично достовірному зменшенні як середньої кількості метастазів в легенях на 43% та 78%, так і об'єму метастатичного ураження на 69% та 83% (для LLC та LLC/R9, відповідно). При цьому, на відміну від LLC/R9, більш виражене інгібування оксирезвератролом об'єму метастатичного ураження легень (в порівнянні зі зменшенням кількості метастазів) у мишей з LLC обумовлено зменшенням долі метастазів в васкулярній фазі росту на 56% ( $p < 0,05$ ), що вказує на здатність цього агенту інгібувати пухлинний ангіогенез. Виявлено, що оксирезвератрол у лікованих мишей підвищує рівень цитотоксичної та метаболічної активності перитонеальних макрофагів на 20% ( $p < 0,05$ ) та 28% ( $p < 0,01$ ), відповідно, що може вносити свій вклад в антиметастатичну дію цього агенту. Антиметастатичну дію оксирезвератролу підтверджено у експериментах *in vitro*, де показано що цей агент інгібує міграцію клітин LLC та LLC/R9 залежне від дози. Терапія оксирезвератролом мишей з карциною Ерліха не впливає на ріст як солідної, так і асцитної пухлини, однак призводить до збільшення середньої тривалості життя тварин з асцитною формою карциноми Ерліха на 27% ( $p < 0,01$ ).

**Висновки.** Терапія оксирезвератролом в застосованому режимі та сумарній дозі не впливає на ріст солідних пухлин і інгібує процес метастазування. Висока антиметастатична активність корелює з підвищеним рівнем показників протипухлинної резистентності. Застосування оксирезвератролу призводить до збільшення середньої тривалості життя тварин-пухлиноносців. Отримані результати вказують на багатофакторність механізму протипухлинної дії оксирезвератролу.



### ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF OXYRESVERATROL

Solyanik<sup>1</sup> G. I., Gorbik<sup>1</sup> G. V., Fedorchuk<sup>1</sup> O. G., Yakshibaeva<sup>1</sup> I. R., Slastya Eu. A.

<sup>1</sup>R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Vine and Wine "Magarach", Yalta, Ukraine  
e-mail: gis@onkonet.ua; grigor.72@mail.ru

Hydroxystilbens belong to the group of natural polyphenols that possess the property to neutralize radical forms of oxygen and nitric compounds (ROS/RNS) in cells. The most popular and the most examined polyphenol from this group is resveratrol, for which rather high antitumor and antimetastatic activity has been shown. Less known hydroxystilbens representative is oxyresveratrol (2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene). In spite of considerably better solubility of oxyresveratrol in water (in comparison with resveratrol) and higher bioavailability its pharmacological properties (including antitumor properties) practically have not been studied.

**Aim of the study.** To examine oxyresveratrol influence on growth and metastasis of experimental malignant tumors and to access its influence on the functional activity of peritoneal macrophages.

**Materials and methods:** The experiments were performed on mice of C57B1/6 strain (Lewis carcinoma) and on white random-bred mice (Ehrlich carcinoma). As tumor models two variants of Lewis lung carcinoma (LLC and LLC/R9) with different dependence of growth on tumor angiogenesis and Ehrlich carcinoma (ascites and solid variants) were applied. Oxyresveratrol in the form of powder-like substance was obtained from purified extract of the wood of *Maclura pomifera* by ethyl-acetate isolation with further purification (rate of purification 99%). The therapy was performed every day during 15 days by per os - oxyresveratrol administration in total dose was 0,2 mg/g of animal mass. Tumor growth dynamics, the number of metastases and their distribution by growth phases, the volume of metastatic lesions, and increase of average life duration were studied. At the same time the alteration of antitumor resistance status by the level of metabolic and cytotoxic peritoneal macrophages activity was estimated.

**Results.** It was established that oxyresveratrol therapy does not influence the growth of primary tumor in mice with LLC and LLC/R9. In the meantime the ability of this agent to inhibit metastasizing process that is manifested in statistically reliable decrease both of mean lung metastases number by 43% and 78% and of metastatic lesion volume by 69% and 83% (for LLC and LLC/R9, accordingly) was detected. In that, in contrast to LLC/R9, more expressed inhibition by oxyresveratrol of lung metastatic lesion volume (in comparison with metastases number reduction) in mice with LLC was detected by decrease of the proportion of metastases in vascular phase of growth by 56% ( $p < 0,05$ ). This indicates the ability of this agent to inhibit tumor angiogenesis. It was shown that oxyresveratrol in treated animals increases the level of cytotoxic and metabolic activity of peritoneal macrophages by 20% ( $p < 0,05$ ) and 28% ( $p < 0,01$ ), accordingly, that may contribute into antimetastatic action of this agent. Antimetastatic action of oxyresveratrol was confirmed by *in vitro* assay. Oxyresveratrol inhibited LLC and LLC/R9 cell migration by dose-dependent way. Oxyresveratrol therapy in mice with Ehrlich carcinoma does not influence the growth either of solid or of ascites tumor, although it leads to increase of mean life duration of animal with ascites form of Ehrlich carcinoma by 27% ( $p < 0,01$ ).

**Conclusions.** Oxyresveratrol therapy in applied regiment and total dosage does not influence solid tumors growth, although inhibits metastasizing process. High antimetastatic activity correlates with increased level of antitumor resistance indices. Oxyresveratrol application leads to increase of mean life duration of animals with tumors. The obtained results indicate multifactor nature of the mechanism of oxyresveratrol antitumor activity.





## АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ ПЕНИЦИЛЛОВ ПОЧВ МОЛДОВЫ

Сырбу Т. Ф., Бурцева С. А.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ., Кишинев, Молдова  
e-mail: sirbutf@rambler.ru

В настоящее время становится актуальной биологическая защита растений с использованием естественных природных регуляторов численности вредных насекомых и антагонистов возбудителей болезней растений. Применение биологических препаратов для защиты растений является весьма перспективным, особенно для повышения иммунитета к возбудителям болезней.

Целью исследований было выявление антифунгальной активности у выделенных из почвы Молдовы микромицетов по отношению к возбудителям болезней сельскохозяйственных культур.

Антифунгальную активность определяли у представителей микромицетов, выделенных из почв Молдовы. В опытах использовали 26 штаммов микромицетов рода *Penicillium*, выбранных из 150 почвенных изолятов.

Тест - культурами являлись фитопатогенные грибы - возбудители фузариоза, монилиоза, серой гнили и ожогов у плодовых, ягодных, овощных культур и винограда.

Антимикробную активность определяли методом блоков (Егоров, 2004).

Анализируя результаты определения антифунгальной активности выделенных из почвы центральной зоны Молдовы микромицетов рода *Penicillium*, было установлено, что многие штаммы характеризовались слабой антифунгальной активностью к *M. fructigena*, *Rh. solani*, *P. fumigatus*, *Sc. sclerotiorum*.

Против *Rh. Solani* - возбудителя черной парши картофеля, гнили всходов сахарной свеклы, томатов и других культур, были выявлены 5 штаммов. Зоны задержки роста этой тест - культуры варьировали от слабо заметных до 16,0-25,0 мм.

Возбудитель белой гнили – *Sc. sclerotiorum* практически не имел антагонистов среди микромицетов почвы Молдовы, за исключением штамма *Penicillium sp. 6* с низкой способностью задерживать его рост и *Penicillium sp. 2*, под действием метаболитов которого у этого фитопатогена зоны были диаметром 20,0-22,0 мм. Для *M. fructigena* среди штаммов рода *Penicillium* удалось найти 4 штамма, в незначительной степени задерживающих развитие этого тест-гриба.

Антагонистами средней активности против возбудителей аспергиллезов и фузариозов можно считать *Penicillium sp. 23*, *Penicillium sp. 104*, *Penicillium sp. 52*, *Penicillium sp. 6*, *Penicillium sp. 19*, *Penicillium sp. 70*, так как они вызывали образование зон отсутствия роста фитопатогенов диаметром 20,0-25,0 мм.

Особое внимание привлекают результаты определения антагонизма пенициллов к таким широко распространенным в Молдове фитопатогенам, как *A. alternata*, *B. cinerea*, *T. basicola*: из изучаемых представителей рода *Penicillium* были обнаружены штаммы, активно задерживающие их рост. Так, 7 штаммов пенициллов обладали способностью в разной степени подавлять рост *A. alternata*. Зоны задержки роста варьировали от 11,0 мм до 29,0-35,0 мм. Можно отметить 2 штамма *Penicillium sp. 2* и *Penicillium sp. 5*, которые в равной степени проявляли свою способность активно подавлять рост этого фитопатогена, так как зоны достигали 30,0-35,0 мм. 9 штаммов пенициллов задерживали с разной степенью активности рост такого фитопатогена, как *B. cinerea* (диаметр зон от 10,5 до 35,0 мм). Задержку роста *T. basicola* разного уровня вызывали 14 штаммов (зоны от 14,0 до 35,0 мм).

Для возбудителей фузариозов среди изучаемых микромицетов обнаружены малоактивные штаммы, вызывающие появление небольших зон (12,0-18,0 мм), но были, например, и штаммы, под действием которых диаметр зон достигал 23,0-25,0 мм. Это штаммы *Penicillium sp. 6*, *Penicillium sp. 17*, *Penicillium sp. 19*, *Penicillium sp. 23*, *Penicillium sp. 70*. Активным антагонистом против фузариозов следует назвать штамм *Penicillium sp. 104*, под действием метаболитов которого у *F. solani* замечены зоны подавления роста 50,0-60,0 мм, а у *F. graminearum* (зоны 28,0 и 30,0 мм). Необходимо также отметить, что этот штамм, в большей степени, по сравнению с другими изученными пенициллами, обладал высокой антагонистической способностью воздействовать на рост *M. vulgaris* и, что особенно важно, на *F. solani*, что подтверждалось зонами отсутствия роста диаметром 30,0-40,0 мм и 50,0-60,0 мм соответственно.

Полученные результаты позволяют рассматривать выделенные из почвы Молдовы микромицеты рода *Penicillium*, как перспективные штаммы - антагонисты по отношению к фитопатогенным грибам.



## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF METABOLITES OF *PENICILLIUM* FROM SOILS OF MOLDOVA

Syrbu T. F., Boortseva S.A.

Institute of Microbiology and Biotechnology ASM, Kishinau, Moldova

e-mail: sirbutff@rambler.ru

At present time becomes relevant the biological plant protection, using the natural regulators of natural numbers of harmful insects and antagonists of plant pathogens. The use of chemicals against pests and pathogens of plants leads to environmental pollution and the creation of the sustainability of these pests in relation to the applied preparation. The use of biological products for plant protection is very promising, especially for improving of the immunity to diseases.

The aim of the research was to identify the antifungal activity of the micromycetes isolated from soil of Moldova in relation to diseases of crops.

The antifungal activity was determined on representatives of micromycetes isolated from soils of Moldova. In experiments was used 26 strains of micromycetes from genus *Penicillium*, selected from the 150 soil isolates. Test-cultures were phytopathogenic fungi - fusariosa pathogens, moniliosa, brown rot and burn in fruit, berries, vegetables and grapes. Antimicrobial activity was determined by means of blocks (Egorov, 2004).

Antifungal activity of micromycetes of genus *Penicillium*, isolated from soil of central zone of Moldova, had found that many strains were characterized by weak antifungal activity for *M. fructigena*, *Rh. solani*, *P. fumigatus*, *Sc.sclerotiorum*. Against *Rh. solani* - been identified 5 strains. Zone stunted growth of the test-culture ranged from weak to significant 16,0-25,0 mm.

Causative agent of white rot - *Sc. sclerotiorum* antagonists had little or no to micromycetes from soil of Moldova, with the exception of the strain *Penicillium* sp. 6 of the low delay of growth and *Penicillium* sp. 2, under the action of metabolites by this phytopathogen zones were 20,0-22,0 mm in diameter. For *M. fructigena* among strains of the genus *Penicillium* have found 4 strains, slightly delaying the development of the test fungus.

Antagonists secondary activity against pathogens g. *Aspergillus* and g. *Fusarium* can be regarded as *Penicillium* sp. 23, *Penicillium* sp. 104, *Penicillium* sp. 52, *Penicillium* sp. 6, *Penicillium* sp. 19, *Penicillium* sp. 70 because they were lack of formation zones of growth of phytopathogens 20,0-25,0 mm in diameter.

Particular attention is drawn by the results of the definition of antagonism g. *Penicillium* to the widespread Moldova phytopathogenic as *A. alternata*, *B. cinerea*, *T. basicola*. 7 strains of g. *Penicillium* has the ability in varying degrees, inhibit the growth of *A. alternata*. Areas of stunting ranged from 11.0 mm to 29,0-35,0 mm. It may be noted 2 strain of *Penicillium* sp.2 and *Penicillium* sp. 5, which is equally demonstrated its ability to inhibit the growth of this phytopathogene as zone reached 30,0-35,0 mm. 9 strains of g. *Penicillium* detained with varying degrees of activity growth phytopathogen such as *B. cinerea* (the diameter of zones - 10.5 - 35.0 mm). Stunted growth *T. basicola* different levels were 14 strains (the zone from 14.0 to 35.0 mm).

For pathogens g. *Fusarium* found among the studied strains of low, causing the appearance of small areas (12,0-18,0 mm), but were, for example, and strains to which the diameter of zones reached 23,0-25,0 mm. These strains were *Penicillium* sp. 6, *Penicillium* sp. 17, *Penicillium* sp. 19, *Penicillium* sp. 23, *Penicillium* sp. 70. Active antagonist against phytopathogenic fungi g. *Fusarium* was strain *Penicillium* sp. 104, under the action of metabolites which have *F. solani* observed a zone of suppression of growth 50,0-60,0 mm, and the *F.graminearum* (zone 28,0 and 30,0 mm). This strain, to a greater extent in comparison with other known strains of g. *Penicillium* have high antagonistic ability to influence the growth of *M. vulgaris*, and, most importantly, in *F. solani*, which was confirmed by the lack of growth zones 30,0-40,0 mm in diameter and 50,0-60,0 mm, respectively.

The results obtained allow to consider micromycetes of g. *Penicillium* isolated from soils of Moldova, as promising strains-antagonists for phytopathogenic fungi.



## ПРИРОДНИЙ БІЛКОВО-МІНЕРАЛЬНИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ОПОРНО-РУХОВОГО АПАРАТУ

*Терлецька Я.Т., Жукотський Е.К., Шаркова Н.О., Козак М.М., Декуша Г.В.*

Інститут технічної теплофізики НАН України, Київ, Україна  
e-mail: apache07@rambler.ru

Кожна п'ята людина в світі скаржиться на запалення або обмеження рухів у суглобах. В різних країнах частота захворювань опорно-рухового апарату різна, але з віком процент захворюваності різко підвищується і досягає 80-90%. На сьогодні існує велика кількість інформації, яка свідчить про вирішальну роль харчування в розвитку таких патологій. Тому, і для лікування і для профілактики розвитку дегенеративних змін опорно-рухового апарату необхідно відповідне харчування з використанням біологічно-активних комплексів. Особливо важлива наявність комплексу мінеральних речовин в необхідній кількості та в легкозасвоюваній формі при формуванні скелету дитячого та юнацького організму.

Цінним джерелом комплексу таких біологічно активних речовин можуть бути колагенвісні субпродукти, отримані при переробці сільськогосподарської птиці. На сьогодні субпродукти птахівництва, які містять велику кількість колагену та мінеральних речовин, переважно використовують для виробництва кормів. Раціональне та більш ефективне використання вторинних субпродуктів із великим вмістом білків і мінеральних речовин для створення харчових продуктів є актуальною проблемою і потребує нових рішень.

В Інституті технічної теплофізики НАН України в результаті комплексу експериментальних досліджень були розроблені оригінальні ощадні біотехнологічні прийоми направленої дії і проведені експериментальні дослідження процесу екстракції білкових і мінеральних речовин із вторинної колагенвісної сировини птиці. Це дозволило розробити технологію отримання з вторинної сировини - курячих ніг, оригінального продукту - білково-мінерального концентрату (БМК), що містить біогенний кальцій та колагеновий матрикс. Природний білково-мінеральний концентрат містить 70-75% білка і 10% мінеральних речовин, з яких 50-60% складає кальцій та інші характерні для кісткової тканини мікро- та макроелементи. Значна частина білка продукту (до 50%) перебуває у гідролізованій формі. Амінокислотний склад білка характеризується високим вмістом глютамінової та аспарагінової кислот, гліцину, проліну та оксипроліну, що характерно для колагену. Колаген є основним структурним компонентом сполучної тканини і відіграє головну роль у виконанні її різноманітних біологічних функцій: опорної, трофічної та захисної. Проведені морфо-функціональні дослідження БМК показали значну кількість глікозаміногліканових субстанцій в продукті.

Слід підкреслити, що кальцій у продукті знаходиться у цитратній формі, що забезпечує високу засвоюваність цього макроелементу.

Завдяки широкому промисловому розведенню птиці в закритих комплексах виробництво продукту буде забезпечено дешевою та надійною сировинною базою.

Враховуючи високу харчову та біологічну цінність білково-мінерального концентрату, він може використовуватись як самостійний продукт в профілактичному харчуванні, а також як складовий компонент для збагачення пробіотичними білковими і мінеральними компонентами продуктів і напоїв спеціального призначення при травмах та захворюваннях опорно-рухового апарату, при порушеннях мінерального обміну, а також при підвищених фізичних навантаженнях.

**NATURAL PROTEIN-MINERAL COMPLEX FOR PREVENTION OF LOCOMOTORIUM DISEASES**

*Terletska Ya., Zhukotskiy E., Sharkova N., Kozak M., Dekusha G.*

Institute of engineering thermophysics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: apache07@rambler.ru

Fifth everyone in the world complains of an inflammation or limitation of motion in joints. In different countries frequency of diseases is different but percent of diseases rises considerably with age and mounts to 80-90 %. Today there is enough information which is indicative of the basic role of nutrition in the increase of such pathologies. Therefore for treatment and prevention of developing of degenerative changes in the locomotorium the proper nutrition is needed with the use of biologically-active complexes. The presence of a complex of mineral nutrients is especially important in necessary amount and in a well assimilative form to organize the skeleton of child's and youth organism.

The valuable source of complex of such bioactive nutrients can be collagen containing by-products obtained by processing of hen's legs. Today by-products of the poultry farming which enriched with collagen and mineral matters mainly are used for production of forage. Rational and more effective use of the by-products enriched with collagen and mineral matters for production of foodstuffs is the actual problem and needs new decisions.

In the Institute of engineering thermophysics of National Academy of Sciences of Ukraine a complex of experimental researches of process of protein and mineral nutrients extraction from the by-products of the hen's legs enriched collagen had been conducted. New original saveing biotechnological procedures of the directed action have been worked out.

It allowed to develop a technology of obtaining an original product – collagen-mineral concentrate (CMC) enriched with a biogenic calcium and collagen matrix.

A natural collagen-mineral concentrate contains 70-75% protein and 10% mineral matters, from which 50-60% drops on a calcium and other typical for bone tissue microelements and macronutrients. Considerable part of collagen of the product (up to 50 %) is in a hydrolyzated form. Amino acid composition of product protein is characterized by high maintenance of glutamic and aspartic acids, glycine, proline and hydroxy-proline, those are typical for collagen. The collagen is the basic structural component of conjunctive tissue and carries out basic biological functions: support, trophic and protective. Morpho-functional researches of CMC show high maintenance of glycosaminoglycan substances in the product.

It is necessary to underline that a calcium in the product is in a citrate form which provides with high assimilability of this macronutrient.

Due to the wide industrial breeding of poultry in the closed complexes the manufacture of product will be provided with the cheap and reliable source of raw materials.

Taking into account the high nutritious and biological value of collagen-mineral concentrate it can be used as an independent product in a prophylactic nutritious, and also as a component for enriching proteins and mineral components of products for a special prescription at traumas and locomotorium diseases, at the disturbances of mineral exchange, and also at the increased physical loadings.



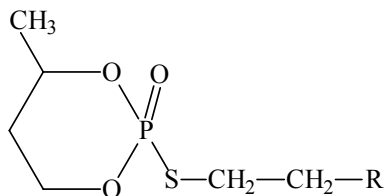
## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЯДА ДИОКСАФОСФОРИНАНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ

Тиллябаев З., Абдуллаева Л.К.

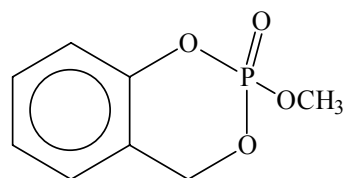
Институт биоорганической химии им. академика А.С.Садыкова АН РУз, ТашкентУзбекистан  
e-mail: tilyabaevzaid@mail.ru

Богатейшим источником биологически активных соединений, способных регулировать различные функции человека и животных, являются растения. Наиболее исследована группа растительных биологически активных соединений – алкалоиды, изучение которых уже многие годы ведется в Узбекистане. Известно множество алкалоидов, используемых в качестве разнообразных лекарств и инсектицидов. Регулирующие свойства этим соединениям можно придать путем модификации их структуры, т.е. таким подходом можно не только создать препараты с избирательно действующим эффектом, но и выявить общие закономерности, позволяющие предсказать свойства ещё не полученных веществ с определенной химической структурой.

Вышеизложенное послужило основанием для синтеза 2-оксо-2-SR-4-метил-диооксафосфоринанов, содержащих алкалоиды: сальсолидин (1), сальсолин (2), декагидрохинолин (3) и цитизин (4). Введение циклофосфатной структуры в фрагменты алкалоидов обусловлено тем, что шестичленный циклофосфат салигенин, проявляет высокую антихолинэстеразную (анти-ХЭ) активность и избирательную токсичность по отношению к насекомым, чем теплокровным.



R= сальсолидин (1), сальсолин (2),  
декагидрохинолин (3), цитизин (4)



Салигенин

Наибольшую анти-ХЭ активность проявляет сальсолидин содержащее вещество, которое на порядок менее активно сальсолинового производного. Переход к декагидрохинолиновому и далее к более сложному цитизиновому аналогу приводит к снижению анти-ХЭ активности по отношению к ферменту теплокровных. Изучение анти-ХЭ активности по отношению к ХЭ озимой совки (насекомое) показало, что все эти вещества являются слабыми ингибиторами фермента этих животных. Эффективность соединений 2 и 4 в качестве ингибитора карбоксилэстеразы печени свиньи ниже, чем в случае с ферментами озимой совки. Зависимость активности от особенностей структуры определяется тем, что замена сальсолина на цитизин приводит к двукратному подавлению активности карбоксилэстеразы цитизиновым производным. Инсектицидная активность изученных соединений выше, чем токсичность по отношению к теплокровным, что в дальнейшем может служить основанием для их практического применения в сельском хозяйстве.



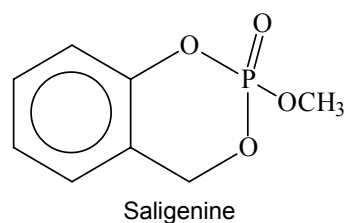
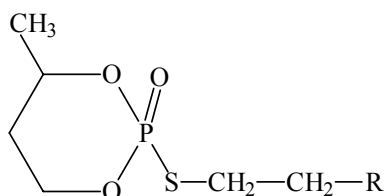
## COMPARATIVE STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF DIOXAPHOSPHORINANE DERIVATIVES OF ALKALOIDS

*Tilyabaev Z., Abdullaeva L.K.*

A.S. Sadykov's Institute of Bioorganic Chemistry of AS of RUz, Tashkent, Uzbekistan  
e-mail: tilyabaevzaid@mail.ru

Plants are a rich source of biologically active compounds capable to regulate different functions in animal and human organisms. Alkaloids are the most studied group of biologically active phytochemicals being investigated for many years in Uzbekistan. It is well-known that many alkaloids are used as medicines and insecticides. By modification of their structure it is possible not only to create substances with selective action, but also to reveal general correlations between properties and structure of compounds.

The above-mentioned became a reason why 2-oxo-2-SR-4-methyl-dioxaphosphorinanes, containing such alkaloid fragments as salsolidine (1), salsolin (2), decahydrogenquinoline (3) and cytosine (4) were synthesized. All alkaloids have cyclophosphate fragment of saligenine which exhibits a high anticholinesterase (anti-ChE) activity and selective toxicity to insects.



R= salsolidine (1), salsolin (2), decahydrogenquinoline (3) and cytosine (4)

Salsolidine-containing substance has the highest anti-ChE activity which is 10 times lower than that of salsoline-containing one. Decahydrogenquinoline and cytosine analogs were found even much less active to enzymes of warm-blooded animals. The study of anti-ChE activity to ChE of *A. Segetum* Schiff (insect) has demonstrated that all of compounds tested are weak inhibitors of this enzyme. The effectiveness of compounds 2 and 4 as inhibitors of carboxylesterase of pig liver is lower than that with *A. Segetum* Schiff's enzymes. The dependence of activity on structure is determined as follows: change of cytosine fragment by salsolidine brings to double suppression of carboxylesterase activity to cytosine derivatives. Insecticidal activity of compounds tested is higher than their toxicity for warm-blooded animals, which further can act as basis of their practical usage in agriculture.



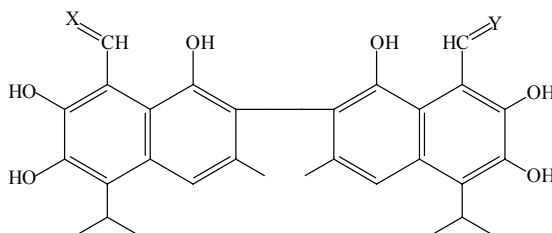
## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ГОССИПОЛА И ЕГО МОНО- И ДИАМИНОПРОИЗВОДНЫХ

Тилиябаев К.З., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т., Талипов С.А.

Институт биоорганической химии имени академика А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Узбекистан  
email:ibchem@uzsci.net; tilyabaevzaid@mail.ru

Как известно, госсипол (диальдегид) и его производные обладают широким спектром активности. Однако, было установлено, что его производные, содержащие 1 свободную –CHO группу, более активны, чем сам госсипол [1]. В связи с этим мы синтезировали моноанилиногоссипол и монорагосин [2].

Изучив активность госсипола, синтезированных веществ и их ди-аналогов по 50% цитотоксичной концентрации (CC<sub>50</sub>) по отношению к опухолевым клеткам линии K562, были получены следующие результаты:



№	Исследованное вещество	X, Y	K562 CC <sub>50</sub> (μM)
1	Госсипол	X=Y=O	2.0
2	Дианилиногоссипол	X=Y=NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	8.0
3	Моноанилиногоссипол	X=O, Y=NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100
4	Дипроизводное госсипола с 4-аминоантипирином (рагосин)		74
5	Монопроизводное госсипола с 4-аминоантипирином		5.0

Из приведённых в таблице данных видно, с уменьшением числа свободных альдегидных групп, активность веществ уменьшается.

### Литература:

- Guo Zhengming, Wan Feng, Gu Zhiping, Wu Guopei, Peng Sixum. Synthesis of mono-aldehyde gossypol and its analogs. *Peop.Rep.China*, 22 (8), 597-602 (1987).
- Тилиябаев К.З., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т. Получение новых производных госсипола. Сборник трудов Международной научно-методической конференции "Совершенствование взаимосвязи образования и науки и проблемы подготовки высококвалифицированных специалистов" 2006. Шымкент с. 186-187



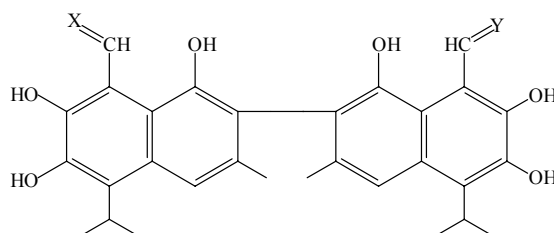
## STUDY OF ANTICANCER ACTIVITY OF GOSSYPOL AND ITS MONO- AND DIAMINODERIVATIVES

Tilyabaev K.Z., Yuldashev A.M., Ibragimov B.T., Talipov S.A.

A.S. Sadykov's Institute of Bioorganic Chemistry of Uzbek Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan  
e- mail:ibchem@uzsci.net; tilyabaevzaid@mail.ru

It is well known that gossypol (dialdehyde) and its derivatives exhibit a wide range of biological activity. However, it has been determined that gossypol derivatives containing 1 free aldehyde group are more active than gossypol itself [1]. That was a point for us to synthesize monoanilinogossypol and monoragosyn [2].

Having studied the activity of gossypol, compounds we have synthesized and their di-analogs against K562 human leukemia line cells by determining their 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) we have obtained the following results:



#	Compound tested	X, Y	K562 CC <sub>50</sub> (μM)
1	Gossypol	X=Y=O	2.0
2	Dianilinogossypol	X=Y=NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	8.0
3	Monoanilinogossypol	X=O, Y=NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100
4	Gossypol diaminoderivative with 4-aminoantipyrine (ragosyn)	 X=Y=N	74
5	Gossypol monoaminoderivative with 4-aminoantipyrine	 Y=N X=O,	5.0

From the data given above it can be concluded that the less the number of free aldehyde groups is, the less is the anticancer activity of compounds.

### References:

- Guo Zhengming, Wan Feng, Gu Zhiping, Wu Guopei, Peng Sixum. Synthesis of mono-aldehyde gossypol and its analogs. Peop.Rep.China, 22 (8), 597-602 (1987).
- Тилибаев К.З., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т. Получение новых производных госсипола. Сборник трудов Международной научно-методической конференции "Совершенствование взаимосвязи образования и науки и проблемы подготовки высококвалифицированных специалистов" 2006. Шымкент с. 186-187





## АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Толочкина С.А., Чинчлей А.Г., Растимешина И.О., Стряпан Н.В., Мамалига В.К.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ, Кишинев, Молдова  
e-mail: innula@gmail.com

Глобальное химическое загрязнение биосферы порождает обоснованное беспокойство о возможном нарушении экологических процессов и экологического равновесия в отдельных участках биосферы. Особую опасность представляют синтетические природные соединения, поступающие в природу в результате хозяйственной деятельности человека. Препараты, полученные в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, как правило, относительно безопасны для биосферы, так как не являются чужеродными.

Наши научные изыскания велись в нескольких направлениях. Для реализации поставленных задач проводился скрининг микроорганизмов – продуцентов тех или иных веществ, а также трансформаторов сложных химических соединений, в частности, лабданового дитерпеноида склареола, полученного при извлечении эфирного масла из растительной массы шалфея *Salvia sclarea* L.

При определении углеводного состава водорослей *Dunaliella salina* и *Spirulina platensis*, нами получены препараты из культуральной жидкости (КЖ) и биомассы. Была проверена биологическая активность этих препаратов [1].

В процессе исследований, для расширения спектра полезных свойств микроорганизмов, мы изучали и их антимикробную активность в отношении патогенов – возбудителей различных заболеваний, в том числе и виноградных (микроспизет *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, возбудитель серой гнили винограда *Botrytis cinerea*, возбудитель белой гнили винограда *Sclerotinia sclerotiorum*; бактерий *Agrobacterium tumefaciens*) и других.

Изучение антибиотических свойств основано на способности веществ диффундировать в агаровой пластинке и воздействовать на тестируемый фитопатоген [2, 3].

Выявлено, что под влиянием препарата из биомассы водоросли *D. salina* подавлялся рост *A. niger*. Зона негативного влияния распространялась до 16 мм в диаметре. Культура характеризуется при этом как чувствительная.

Препараты, полученные из КЖ и биомассы *S. platensis*, ингибировали рост микроскопических грибов *A. alternata*. Зоны, в которых наблюдалась задержка роста фитопатогена, достигали 29,5 мм, что свидетельствует о высокой чувствительности тест-культуры к препаратам.

В результате скрининга микроорганизмов, способных к биотрансформации склареола, был выделен штамм микроскопического гриба, идентифицированный как *Penicillium camemberti* Thom, Raper a.Thom CNM-FP-03, активно утилизирующий склареола в качестве единственного источника углерода. Установлено, что в определенных условиях деградация склареола грибом *P. camemberti* сопровождается образованием трех мажорных неполярных и двух полярных производных склареола.

Мы провели исследования по влиянию полученных соединений на рост фитопатогенов. Выявлено, что тест-культуры оказались устойчивы к воздействию естественных продуктов жизнедеятельности *P. camemberti*. Комплекс неполярных микробных метаболитов вызывает ингибирование *Pseudomonas syringae*, *Corynebacterium citri*, *Erwinia carotovora*, ингибирование роста *A. tumefaciens* (до 13,0 мм). Довольно высокий антимикробный эффект наблюдался при воздействии полярных метаболитов склареола в отношении фитопатогенного микроспизета *A. alternata* (диаметр зоны лизиса – более 23,0 мм).

Особенно интересен димеризованный неполярный продукт трансформации склареола А-5 (химическая формула  $C_{20}H_{22}O_7$ ), выделенный нами из неполярной фракции гидроксилированных метаболитов [4]. Негативная чувствительность тест-культур (13,0-15,2 мм), сопровождалась длительностью действия. Продолжительность угнетения фитопатогенов раствором димера А-5 достигала 40 суток и более.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают наличие антимикробных свойств у изученных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности и свидетельствуют о перспективности использования их в фитотехнии.

### Литература:

1. Rudic V., Cincilei A., Sepoi L., Tolocichina S., Somnic G. Chemical characters and antimicrobial activity of some microalgal carbohydrate complexes // Pap. Int. Conf. on Intensifying Proceedings of Biomaterial Processing „Probiom”, Sinaia, Romania, August 20-23, 2007.
2. Сэги И. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983, с.164-179.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина, 1982.
4. Чинчлей А.Г., Толочкина С.А., Растимешина И.О., Драгалин И.П. Новые продукты микробной трансформации склареола: получение, свойства, оценка // Микробиология і Біотехнологія, Одесса, 2007, № 1, с. 34-39.



## ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF NEW PREPARATIONS OF MICROBIAL ORIGIN

*Tolocichina S.A., Cincilei A.G., Rastimesina I.O., Streapan N.V., Mamaliga V.K.*

Institute of Microbiology and Biotechnology ASM, Chisinau, Moldova

e-mail: innula@gmail.com

Global chemical pollution of the biosphere raises reasonable concern about possible violations of environmental and ecological balance in some parts of the biosphere. Particularly dangerous are synthetic compounds discarded in the nature as a result of human economic activity. Preparations obtained from microorganisms usually relatively safe for the biosphere, as they are organic.

Our research conducted in several directions. To implement the tasks, the screening of microorganisms - producers of some substances was carried out, as well as transformers of complex chemical compounds, in particular, sclareol the labdane diterpenoid, obtained when extracting essential oil from the plant mass sage *Salvia sclarea* L.

In determining the carbohydrate composition of algae *Dunaliella salina* and *Spirulina platensis*, we have received the preparations from the culture liquid (CL) and biomass. It was verified the biological activity of these preparations [1].

In the process of research, to expand the range of useful properties of microorganisms, we studied their antimicrobial activity against some pathogens, including the wine grapes phytopathogens (micromycetes *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, agent of grey rot of grapes *Botrytis cinerea*, agent of white rot of grapes *Sclerotinia sclerotiorum*; bacteria *Agrobacterium tumefaciens*) and others.

The study of antibiotal properties was based on the ability of substances to diffuse in agar plate and influence the tested phytopathogen [2, 3].

It was revealed, that under the influence of the preparation from the biomass of algae *D. salina* the growth of *A. niger* was suppressed. Zone of the negative impact was extended up to 16 mm in diameter. In this case the fungus is characterized as sensitive.

Products derived from *S. platensis* biomass and CL inhibited the growth of microscopic fungi *A. alternata*. Areas in which there was a delay of growth of phytopathogen, reached 29.5 mm, which demonstrates the high sensitivity of the test-culture to preparations.

As a result of screening of microorganisms capable to biotransformate sclareol, was isolated microscopic fungus identified as *Penicillium camemberti* Thom, Raper a.Thom CNM-FP-03, actively utilizing sclareol as the unique source of carbon. It was found that under certain conditions, the degradation of sclareol by fungi *P. camemberti* was accompanied by the formation of three major and two non-polar sclareol derivatives.

We conducted a study on the impact of these compounds on the growth of phytopathogens. It was revealed that the test-cultures had been resistant to the effects of natural products of *P. camemberti*. Complex of non-polar metabolites caused inhibition of *Pseudomonas syringae*, *Corynebacterium citri*, *Erwinia carotovora*, inhibition of growth of *A. tumefaciens* (up to 13,0 mm). Quite a high antimicrobial effect was observed under the action of polar sclareol metabolites against phytopathogenic micromycetes *A. alternata* (diameter of lysis area - more than 23.0 mm).

Special attention is the product of sclareol transformation - non-polar dimer A-5 (chemical formula  $C_{20}H_{22}O_7$ ), selected from a non-polar fraction of hydroxylated metabolites [4]. The negative sensitivity of the test-cultures (13,0-15,2 mm) was accompanied by prolonged action. The duration of suppression of phytopathogen microorganisms by solution of dimer A-5 was up to 40 days or more.

Thus, our studies confirm the antimicrobial properties of the studied microorganisms and their metabolites and demonstrate the perspectives of their use in phytotechniques.

### References:

1. Rudic V., Cincilei A., Cepoi L., Tolocichina S., Somnic G. Chemical characters and antimicrobial activity of some microalgal carbohydrate complexes // Pap. Int. Conf. on Intensifying Proceedings of Biomaterial Processing "Probiom", Sinaia, Romania, August 20-23, 2007.
2. Szegi J. Methods of soil microbiology. M.: Kolos, 1983, c.164-179.
3. Birger M.O. Handbook of microbiological and virological methods. M.: Meditsina, 1982.
4. Cincilei A.G., Tolocichina S.A., Rastimeshina I.O., Dragalin I.P. The new products of microbiological transformation of sclareol: characteristic and biological activity // Mikrobiologiya i Biotehnologiya, Odessa, 2007, № 1, pp. 34-39.



## ПРОБЛЕМИ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК: СТАН ПИТАННЯ, РЕАЛІЇ І ПЕРСПЕКТИВИ

*Трахтенберг І.М.*

ДУ «Інститут медицини праці АМНУ», Київ, Україна  
e-mail: kostatram@gmail.com

За останні десятиліття в наукових медико-біологічних розробках і, відповідно, у медичній практиці виник новий напрямок розвитку, який спрямований на збереження здоров'я людини та профілактику захворювань. Одним із ефективних методів для вирішення даної проблеми є корекція раціону харчування сучасної людини, що забезпечує добові фізіологічні норми споживання вітамінів, мінералів, органічних кислот, харчових волокон тощо.

На сьогодні використання сучасних технологій переробки продуктів харчування впливає на їх якість. Нам приходится вживати оброблену, консервовану, рафіновану їжу, з якої не можна отримати необхідну кількість амінокислот, вітамінів мінералів, макро- та мікроелементів. Недостатня кількість цих життєво важливих речовин знижує стійкість організму до різноманітних хвороб, людина швидше старіє. Зниженню кількості необхідних організму поживних речовин в сучасних овочах та фруктах також сприяє безконтрольне виснажливе використання сільськогосподарських земель.

Світова наукова спільнота сьогодні визнає, що одним із ефективних, економічно обґрунтованих і швидких шляхів рішення цього питання є включення в систему оздоровлення людини біологічно активних добавок (БАД). Мета застосування БАД якраз і полягає в корекції раціону харчування і профілактиці захворювань, у компенсації додаткових навантажень на організм, що виникають унаслідок розвитку техногенної цивілізації. БАД є джерелом незамінних живильних речовин, мінорних компонентів їжі, про- і пребіотичних природних компонентів, що містяться в них у межах фізіологічних потреб організму. Вони сприяють асиміляції їжі, підтримці нормального стану мікроекокомплексу травної системи; регулюють неспецифічну резистентність організму, у тому числі при високих фізичних і психоемоційних навантаженнях та несприятливих екологічних умовах. Їх застосування сприяє зниженню ризику розвитку захворювань. За даними статистики, сьогодні до 70% населення розвинутих країн вживають БАД. І головною причиною цього стало тяжіння людей до здорового способу життя. Інша ситуація у нас. За дуже приблизними даними, в Україні регулярно вживають БАД менше 10% населення. А в той же час застосування цих продуктів у нас більш актуальне, ніж для населення країн Західної Європи й Америки. Несприятливі екологічні умови в Україні, зокрема загроза шкідливої поєднаної дії на людей хімічного та радіологічного факторів обумовлюють необхідність використання засобів так названої біологічної профілактики в загальному комплексі оздоровчих заходів.

На жаль, сьогодні ще має місце небезпечна помилка, коли БАД рекомендують застосовувати для лікування, причому навіть таких тяжких захворювань як інфаркт, інсульт, цукровий діабет, гіпертонічна хвороба, рак тощо. Зрозуміло, що при кожному з цих захворювань існують відпрацьовані і перевірені схеми лікування, що можуть продовжувати життя і поліпшувати її якість. На відміну від лікарських препаратів, БАДи можна рекомендувати вживати здоровим людям з метою профілактики захворювань, рідше в стані перед хвороби, а також у відновлюваному періоді після хвороби. Під час хвороби ці речовини можуть бути використані тільки як доповнення до основної терапії, але ні в якому разі не як засіб монотерапії. При цьому частину широковідомих препаратів, що застосовуються у здорових людей, можна віднести до розряду БАД (наприклад такі, що містять вітаміни, макро- і мікроелементи, дозування яких відповідають критеріям БАД). До речі, деякі із зареєстрованих в Україні лікарських засобів природного походження в країнах виробника зареєстровані, як БАД. Це можна зв'язати з тим, що довіра до БАД в багатьох країнах світу вища, ніж у нас в Україні.

Прийняття нових норм потребує великих фінансових затрат на проведення досліджень та зміну нормативної бази. Доки це питання не буде вирішено доти і будуть часто-густо реєструвати БАД, як лікарські засоби. Виникають подвійні стандарти – в одних країнах це БАД, в інших це лікарський засіб. І тоді у недосвідчених людей виникає хибна думка, що лікарські засоби можна безконтрольно вживати. Виникає жага до самолікування.

Головне сьогодні – зробити виважені, обґрунтовані кроки як законодавцям, так і виробникам і дистриб'юторам БАД з метою прийняття оптимальних рішень, щодо застосування в Україні цієї важливої для українських громадян продукції. Тільки компетентні фахівці в галузі охорони здоров'я разом з представниками виробників, контролюючих органів, органів реєстрації та юристами спільними зусиллями повинні удосконалити цивілізовані норми обігу БАД в Україні.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### THE PROBLEM OF NUTRACEUTICALS SAFETY: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

*Trachtenberg I.M.*

Institute for Occupational Health of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine  
e-mail: kostatram@gmail.com

In recent years medical practice saw a new direction aimed to protect human health and provide preventive treatment to basic diseases. Food fortification is an effective public health policy of adding micronutrients (essential trace elements and vitamins) to foodstuffs to ensure that minimum dietary requirements are met.

Nowadays using of modern technologies of food processing affects food quality. We consume the food with a shortage of amino acids, vitamins, minerals, macro- and microelements, which decreases the resistance of human body to different diseases. The decrease of necessary elements in food is also due to exhaustive land usage.

Several ranges of food supplements are recognized: additives which repair a deficit to "normal" levels; additives which appear to enhance a food; supplements taken in addition to the normal diet. Nutraceutical implies that the extract or food is demonstrated to have a physiological benefit or provide protection against a chronic disease. They can be consumed as part of a usual diet but are demonstrated to have physiological benefits and/or reduce the risk of chronic disease beyond basic nutritional functions.

Moving on from this reasonably accepted usage, there is increasing evidence for the use of food supplements in established medical conditions. This nutritional supplementation using foods as medicine (nutraceuticals) has been effectively used in treating disorders affecting the immune system. This goes beyond the definition of "food supplement", but should be included for the sake of completeness. Nutraceuticals can also be used in course of preventive treatment and during remission periods.

However, there is still a big mistake when nutraceuticals are recommended as a sole way of treatment of such complicated diseases as infarction, stroke, hypertension, diabetes mellitus, and cancers. It is well known that each of listed diseases has its verified treatment scheme. In course of disease treatment nutraceuticals can only be used as supplements to main therapy but not as means of a monotherapy.

Therefore, main task for legislative authorities, producers and distributors is to make well thought-out steps in order to implement optimal decisions on using so important products in Ukraine. Only competent specialists in the field of public health together with industrial representatives, control and registration bodies in order to improve the legal basis of nutraceuticals in Ukraine.



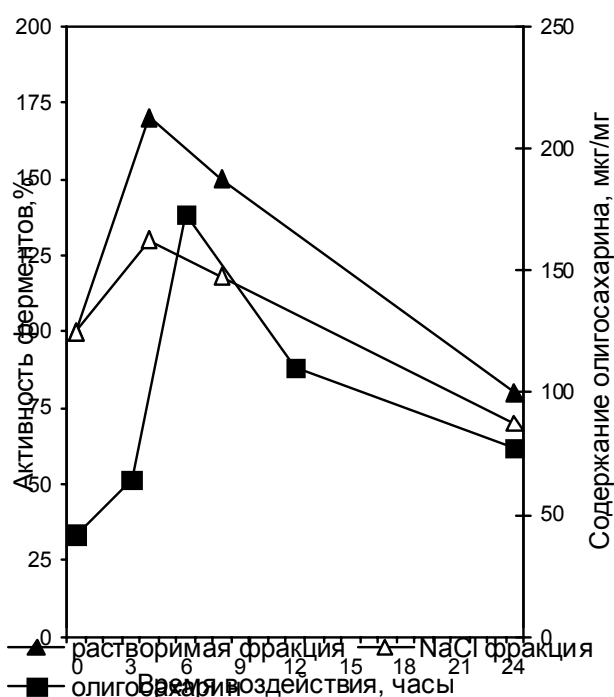
## УЧАСТИЕ ЭНДОГЕННОГО ОЛИГОСАХАРИНА В РЕАКЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМЫХ РАСТЕНИЙ

Трофимова О.И., Барышева Т.С., Ларская И.А., Заботин А.И.

Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия  
e-mail: trofimova@mail.knc.ru

Несмотря на значительные успехи селекционеров в создании морозоустойчивых сортов, до сих пор наблюдаются большие потери урожая из-за ограниченной способности растений переживать неблагоприятные температурные воздействия. Исследование механизма, с помощью которого растения воспринимают внешние сигналы и передают их внутрь клетки, для реализации адаптивного ответа, является актуальной задачей.

Нами было показано, что в корнях проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в процессе закаливания их низкой положительной температурой происходит накопление биологически активного



**Рис.1.** Влияние закаливающей температуры (+2°C) на активность гликозидазы и накопление олигосахарина в корнях проростков озимой пшеницы. За 100% принята активность в начальный период времени без воздействия, что соответствует 0,40 (в опт.ед./г сырой массы/ч)

олигосахарида (олигосахарина), обладающего способностью повышать морозоустойчивость озимых растений (OS) [1,2]. Его моносахаридный состав Glc<sub>5</sub> Xyl<sub>5</sub> Aga<sub>1</sub> Gal<sub>1</sub> отражает, по-видимому, изменения, происходящие при катаболизме гемицеллюлоз (вероятно, ксилоглюканов) клеточной стенки, метаболизм которых, как было показано [3], заметно активизируется в течение первых суток адаптации. Максимум эндогенного содержания OS наблюдался через 6 часов закаливания, что по времени совпадало с активацией гликозидаз клеточной стенки (рис.1). При обычной температуре выращивания (+25°C) отсутствовало как образование OS, так и активация ферментов. Это может свидетельствовать о скоординированной последовательности гидролитических реакций, осуществляющихся только при инициации процесса адаптации. Эффективная концентрация OS составляет 10<sup>-8</sup> – 10<sup>-9</sup>М, что соизмеримо с эндогенным содержанием в клетках растений абсцизовой кислоты (АБК) [4]. При этом было показано, что, полученный олигосахарин повышал морозоустойчивость проростков озимой пшеницы как выращиваемых при комнатной температуре, так и при постановке их на закаливание. Более того, оказалось, что значительное повышение морозоустойчивости проростков озимой пшеницы, предобработанных олигосахаринном до АБК, носило

синергический характер, что можно интерпретировать как повышение чувствительности клеток к фитогормону. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный олигосахарин является эндогенным регуляторным фактором, наряду с такими сигнальными молекулами как ц-АМФ, Ca<sup>2+</sup> [5]. Расшифровка роли и механизма действия новой регуляторной молекулы, позволит углубиться в понимание процесса формирования морозоустойчивости озимых растений, а также даст возможность проводить их целенаправленную модификацию, используя современные методы трансформации.

### Литература:

1. Заботина О.А., Аюпова Д.А., Ларская И.А., Николаева О.Г., Петровичева Г.А., Заботин А.И. Физиология растений. 1998.Т.45. №.2. с. 262-267.
2. Заботина О.А., Аюпова Д.А., Торощина Т.Е., Заботин А.И. Известия РАН, 2003.№ 5, с. 560-564
3. Zabolina A.I., Barisheva T.S., Zabolina O.A., Larskaya I.S., Lozovaya V.V., Beldman G., Voragen A.G. J. Plant Physiol. 1998. V. 152. P.473-479.
4. Cornish K., Zeevaart J.A.D. Plant Physiology. 1985. V.78.P.623-626.
5. Assmann S. M.Plant Physiol. 1995.V.108.P.885-889.



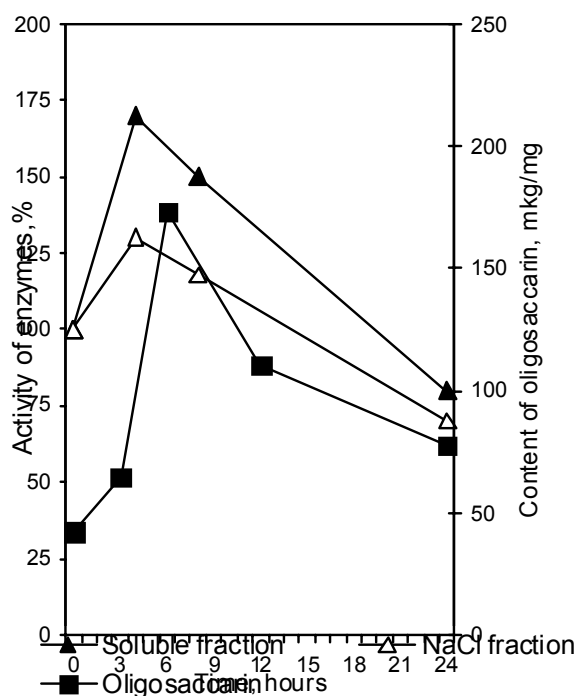
## THE PARTICIPATION OF ENDOGENOUS OF OLIGOSACCHARIN IN REACTION OF FROST RESISTANCE FORMATION OF WINTER PLANTS

Trofimova O.I., Barysheva T.S., Larskaya I.A., Zabolin A.I.

Establishment of the Russian Academy of Sciences the Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics  
KazSC the Russian Academy of Science, Kazan, Russia  
e-mail: trofimova@mail.knc.ru

Despite a considerable success of selectors in creation of cold-resistant variety of plants, the heavy losses of yield have been observed so far because of the limited ability of plants to survive under unfavorable temperature influences. The investigation of mechanism with the help of which plants perceive external signals and transfer them in a cell, for realization of the adaptive response is an actual problem.

We have shown that in roots of seedlings of a winter wheat (*Triticum aestivum* L.) the accumulation of a biologically active oligosaccharide (oligosaccharin), having the property of raising the frost resistance of winter plants (OS) occurs during hardening its low positive temperature [1,2]. Its monosaccharide structure (Glc<sub>5</sub> Xyl<sub>5</sub> Ara<sub>1</sub> Gal<sub>1</sub>) apparently reflects the changes occurring at hemicelluloses's catabolism (probably, xyloglucans) of a cell wall of plants, which metabolism are considerably activated within the first days of adaptation as it has been shown [3]. The maximum of endogenous content of OS was observed in 6 hours of hardening that through time coincided with the activation of cell wall glycosidases (fig. 1). At usual temperature of cultivation (+25°C) both OS accumulation and activation of enzymes were absent. It can testify to the coordinated sequence of hydrolytic reactions carried out only at initiation of the adaptation process. The effective concentration of OS is 10<sup>-8</sup> - 10<sup>-9</sup>M that is commensurable with the endogenous content of the abscisic acids (ABA) in plant cells [4]. In this case it has been shown, that oligosaccharin obtained raised the frost resistance of winter wheat seedlings grown up at a room temperature as well as at hardening. Moreover, it appeared that a considerable increase of frost resistance of seedlings that was pretreated by oligosaccharin before ABA was of synergic character. This can be interpreted as an increase of sensitivity of cells to a



**Fig. 1.** The influence of the hardening temperature (+2°C) on the activity of glucosidase and the accumulation of oligosaccharin in roots of winter wheat seedlings. 100 % is activity in an initial stage of time without any influence that corresponds 0,40 (in opt.un./g crude weight/h).

phytohormone. The obtained data show that this oligosaccharin is the endogenous regulatory factor, along with such signalling molecules as cAMP and Ca<sup>2+</sup> [5]. Decoding of a role and the mechanism of action of a new regulatory molecule, will allow refining the understanding of the process of frost resistance formation of winter plants, and also will give the chance to spend their purposeful updating, using modern methods of transformation.

### References:

1. Zabolina O.A., Ayupova D.A., Larskaya I.A., Nikolaeva O.G., Petrovicheva G.A., Zabolin A.I. Russian Plant Physiol. 1998.V.45. №2. P. 262-267.
2. Zabolina O. A., Ajupova D.A., Toroshina T.E., Zabolin A.I. News of the Russian Academy of Sciences, 2003. № 5, P. 560-564
3. Zabolin A.I., Barisheva T.S., Zabolina O.A., Larskaya I.S., Lozovaya V.V., Beldman G., Voragen A.G. J. Plant Physiol. 1998. V. 152. P.473-479.
4. Cornish K., Zeevaart J.A.D. Plant Physiology. 1985. V.78.P.623-626.
5. Assmann S. M. Plant Physiol. 1995.V.108.P.885-889.



## ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНИХ ЕФЕКТИВ ІНГІБІТОРІВ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази – КАЛІКСАРЕНІВ С-99 ТА С-107.

*Веклич Т.О., Шкрабак О.А., Данилович Г.В.*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна  
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua

В попередніх дослідженнях встановлено, що каліксарени С-107 та С-99 є високоефективними інгібіторами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази активності плазматичної мембрани (ПМ) клітин міометрія. Дана іон-транспортуюча системи є мембранозв'язаним ферментом, а приймаючи до уваги гідрофобні властивості зазначених каліксаренів цілком можливо, що їхні ефекти частково або повністю опосередковуються взаємодією з мембранами. Тому в даній роботі ми вивчали деякі мембранотропні ефекти цих сполук.

Ми використали метод лазерно-кореляційної спектроскопії для вивчення впливу каліксарену С-107 на гідродинамічні показники суспензії мембран. У контрольних дослідах з допомогою даного методу було охарактеризовано фракцію ПМ за їх розмірами (середній гідродинамічний діаметр становить  $401 \pm 17$  нм) та перевіряли наявність у розчинах ДМСО та каліксарену С-107 мікрочастинок, що розсіюють світло. Як виявилось, розчин каліксарену С-107 в 2,5 % ДМСО містить мікрочастинки з різними розмірами від 100 нм до 10 мкм. З літератури відомо, що деякі амфіфільні каліксарени, розчинені в органічному розчиннику, при подальшому розчиненні у воді утворюють так звані "тверді ліпідні частинки", розміри яких залежать від складу розчину. Такі мезоскопічні системи розглядаються дослідниками як транспортна форма каліксаренів при їх інтравенозному застосуванні в якості можливих фармакологічних агентів. Присутність таких частинок ускладнює аналіз результатів взаємодії каліксарену із мембранами в зазначеному діапазоні розмірів, але можна стверджувати, що після такої взаємодії утворюється певна кількість частинок з розмірами більше 10 мкм, тобто у присутності каліксаренів вірогідно відбувається аглютинація везикул між собою та/або з мікрочастинками каліксарену. У літературі описане також злиття міцел каліксаренів з ліпідними мембранами, тому такий шлях збільшення гідродинамічного діаметру везикул також можливий. Результати електронно-мікроскопічних досліджень також дають змогу припускати взаємодію фрагментів плазматичних мембран з мікрочастинками каліксарену С-107, що приводить до утворення комплексів між ними.

Відомо, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза бере участь в генерації трансмембранного потенціалу, а деякі каліксарени можуть впливати на функціонування іонних каналів та мають йонофорні властивості, опосередковуючи транспорт іонів крізь мембрану каналним, або човниковим механізмом. Отже, слід було очікувати, що такі сполуки будуть впливати на величину трансмембранного потенціалу та відповідно на ферментативні системи, активності яких залежать від потенціалу. Нами були проведені дослідження мембранотропного впливу каліксаренів на величину  $\text{K}^+$ -дифузійного трансмембранного потенціалу за допомогою потенціал-чутливого флуоресцентного зонду дигексилоксакарбоцианіну  $\text{DiOC}_6(3)$  на експериментальні моделі  $\text{K}^+$ валініоміцин – везикули ПМ. Встановлено гасіння каліксаренами С-99 та С-107 флуоресценції зонду за відсутності трансмембранного потенціалу, при цьому зміни положення піків збудження та флуоресценції не відбувається. Так як гасіння флуоресцентної відповіді зонду каліксареном С-99 було незначним порівняно з гасінням каліксареном С-107, подальші дослідження із використанням протокової цитометрії виконували лише з каліксареном С-99. Аналогічний ефект гасіння реєструвався даним методом за умов відсутності градієнту іонів  $\text{K}^+$ , тобто відсутності трансмембранного потенціалу. По мірі зростання потенціалу вплив каліксарену С-99 відображався у зменшенні гасіння флуоресценції зонду, а за десятикратного градієнту концентрації іонів  $\text{K}^+$ , що відповідає розрахунковому потенціалу  $-58,3$  мВ, ефект гасіння не спостерігався. Таким чином, вплив каліксарену С-99 на флуоресцентну відповідь потенціалчутливого зонду  $\text{DiOC}_6(3)$  залежить від поляризації мембрани. Це може свідчити про вплив на мембранний потенціал, можливо завдяки відомим з літератури йонофорним властивостям каліксаренів, хоча ефект гасіння флуоресценції зонду за відсутності потенціалу не дає змоги однозначно оцінити взаємодію каліксарену С-99 з везикулами ПМ.

Отже, досліджені каліксарени здатні проявляти мембранотропні ефекти і, таким чином, опосередковано впливати на АТФ-гідролазні мембранозв'язані ферменти, активність яких залежить від структурно-функціонального стану мембран. Саме  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза є таким ферментом, тому не виключається, що такий вплив дає певний внесок у модифікування її активності. Отже результати проведених досліджень можуть бути корисними для подальшого вивчення мембранних механізмів інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази активності каліксаренами.

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ В.І.Кальченку (Інститут органічної хімії НАНУ) за люб'язно надані каліксарени та член-кор. НАНУ С.О.Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів.



**THE INVESTIGATION OF MEMBRANE EFFECTS OF Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase INHIBITORS – CALIXARENES C-99 AND C-107.**

*Veklich T.O., Shkrabak O.A., Danilovich A.V.*

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua

As it was found in our previous investigations, calixarenes C-107 and C-99 are the high effective inhibitors of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of myometrium cell plasma membrane (PM). It is known that calixarenes possess hydrophobic properties and this ion-transporting system is a membrane-bound enzyme. All above mentioned let us make a suggestion that their effects can be partially or completely mediated by interaction with membrane lipids. That is why we studied some membrane effects of these compounds.

We used the laser correlation spectroscopy to investigate the influence of calixarene C-107 on hydrodynamic parameters of the membrane suspension. The PM fraction was characterized by this method in checking experiments (the average hydrodynamic diameter was 401±17 nm). We also checked a presence of microparticles which can disperse the light in the solutions of calixarene C-107 and 2,5 % DMSO (solvent of calixarenes). It was found that the solution of calixarene C-107 had such microparticles (size range from 100 nm to 10 μm). It is known that some amphiphilic calixarenes soluted in organic solvent can create solid lipid nanoparticles during further dilution in water. The size of the last ones depends on the solution composition. Such mesoscopic system can be considered as transport systems of calixarenes when they can be used intravenously as probable pharmacological agents. The presence of these particles complicated the analysis results concerning interaction of calixarene with membranes, but we have registered the creating of some quantity of particles with the size more than 10 μm. We came to the conclusion that membrane vesicles agglutinated to each other and/or to calixarene microparticles. A fusion of calixarene micelles with lipid membranes which was described by other researchers could also cause the increase of vesicle hydrodynamic diameter. The results of electron-microscope investigation allowed us to suggest the interaction of PM fragments with the calixarene C-107 microparticles that led to formation of their complexes.

It is known that some calixarenes have ionophore properties and can affect on the ion channels. Therefore it was to be expected that these compounds would influence on the transmembrane potential and activities of enzymatic systems which depend on its magnitude. Since Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase also takes part in generation of the membrane potential we carried out an investigation concerning the influence of our calixarenes on K<sup>+</sup>-diffused membrane potential with the use of the voltage-sensitive fluorescent probe dihexylcarbocyanine DiOC<sub>6</sub>(3) in the experimental system of PM vesicles – K<sup>+</sup>/valinomycin. We determined the fluorescence quenching of the probe by calixarenes C-99 and C-107 under the conditions without any membrane potential. The wavelengths of excitation and fluorescence did not change by these calixarenes and we continued investigation using flow cytometry but only with calixarene C-99 because of its less fluorescence quenching as compared with calixarene C-107. The similar quenching effect was recorded with this method in the absence of K<sup>+</sup> concentration gradient that is without membrane potential. During increase of potential the fluorescence quenching of the probe decreased and under the conditions of tenfold gradient of K<sup>+</sup> concentration, that correspond to calculated potential -58.3 mV, quenching effect was not observed. Hence, the effect of calixarene C-99 on the fluorescence response of the voltage-sensitive fluorescent probe DiOC<sub>6</sub>(3) depends on membrane polarization. It can indicate the influence on the membrane potential perhaps due to the known ionophore properties of calixarene though because of the quenching effect of the probe fluorescence when the potential was absent we could not unambiguously estimate the interaction of calixarene C-99 with PM vesicles.

Thus, researched calixarenes can show the membrane effects and therefore indirectly influence on ATP-hydrolyzing membrane-bound enzymes which activities depend on structure functional state of membrane. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is just such an enzyme so we do not exclude that these effects might partially cause the modification of its activity. The results of our research can be useful for subsequent investigation of membrane mechanisms of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition by calixarenes.

We are thankful to corresponding member of NASU V.I. Kalchenko (Institute of Organic Chemistry, NASU) for kindly given calixarenes and corresponding member of NASU S.O. Kosterin (O.V. Palladin Institute of Biochemistry, NASU) for valued advices during discussion of our investigation results.





## РЕГУЛЯЦІЯ ПРОЦЕСУ ГІДРОКСИЛЮВАННЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛУ ВІТАМІНОМ Е ЗА УМОВ D-ГІПОВІТАМІНОЗУ ТА D-ГІПЕРВІТАМІНОЗУ

*Великий М.М., Апуховська Л.І., Донченко Г.В., Хоменко А.В.*

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна  
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Згідно сучасних рекомендацій ступінь забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> визначається за вмістом 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові. За нормального забезпечення організму вітаміном D<sub>3</sub> вміст 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові знаходиться в межах 100-150 нмоль·л<sup>-1</sup> (40-60 нг·мл<sup>-1</sup>). Зниження вмісту 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові нижче 40 нг·мл<sup>-1</sup> свідчить про розвиток D-гіповітамінозного стану. Гіпервітаміноз D та гіперкальціємія спостерігаються при рівні 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові понад 500 нмоль·л<sup>-1</sup> (200 нг·мл<sup>-1</sup>), що має місце при вживанні щодоби більше 40000 МО вітаміну D<sub>3</sub> протягом тривалого часу. Механізм участі вітаміну Е у регуляції мінерального обміну і стану кісткової тканини реалізується через його вплив на обмін вітаміну D<sub>3</sub>, а саме регуляцію активності вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів та процесу транспорту вітаміну у гепатоцити де відбувається синтез 25OHD<sub>3</sub>. Характер та інтенсивність впливу вітаміну Е залежить від його доз та тривалості призначення.

Метою досліджень було вивчити механізми регуляторного впливу вітаміну Е на інтенсивність синтезу 25OHD<sub>3</sub> та активність вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних систем гепатоцитів за умов D-гіповітамінозу та D-гіпервітамінозу.

Експерименти проводили на щурах з моделями D-гіпо- та D-гіпервітамінозу. Вітамін Е вводили щодобово у дозах: 0,726 МО, 7,26 МО та 36,3 МО протягом 20 діб за D-гіпо- та протягом 9 діб за D-гіпервітамінозу. Вміст 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові визначали методом радіоконкурентного зв'язування з використанням [<sup>3</sup>H]-вітаміну D<sub>3</sub>. Активність вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилаз визначали у дослідах *in vitro* шляхом інкубації гепатоцитів зі 100 нмоль неміченого вітаміну D<sub>3</sub>. Реакцію зупиняли сумішшю розчинників: хлороформ-метанол (2:1). Екстракцію, колоночну хроматографію та кількісне визначення 25OHD<sub>3</sub> проводили як для сироватки крові.

Встановлено, що за умови D-гіповітамінозу вміст 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові знижувався на 51,9% порівняно з вмістом гідроксихолекальциферолу у контрольних тварин, що відображає недостатню загальну забезпеченість організму вітаміном D<sub>3</sub>. Активність вітаміну D-гідроксилазних ензимів гепатоцитів щурів зростала за цих умов на 38%, що підтверджує розвиток D-гіповітамінозу.

Введення фізіологічної дози вітаміну D<sub>3</sub> (40 МО D<sub>3</sub>) супроводжувалось підвищенням вмісту 25OHD<sub>3</sub> на 40,9% порівняно з його рівнем у тварин при D-гіповітамінозі та зниженням активності вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилаз до рівня контролю. Однак рівень 25OHD<sub>3</sub> ще залишався на 32,2% нижчим ніж у контрольних тварин. Одночасне введення вітаміну D<sub>3</sub> та фізіологічної дози α-токоферолу (0,726 МО Е) призводило до подальшого зростання вмісту 25OHD<sub>3</sub> у сироватці крові, рівень якого наближався до значень у контрольних тварин та зростання (на 25%) активності вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилаз. Однак, високі дози вітаміну Е (до 36,3 МО) дозозалежно інгібували утворення 25OHD<sub>3</sub>. Отже вітамін Е у фізіологічних дозах активував, а 10-кратна та більш високі дози інгібували синтез 25OHD<sub>3</sub> за умов D-гіповітамінозу, впливаючи на активність вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів. Встановлено, що на тлі D-гіповітамінозу існує пряма залежність між кількістю синтезованого 25OHD<sub>3</sub> і активністю вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів.

Інша закономірність в динаміці змін вмісту 25OHD<sub>3</sub> в сироватці крові та активності вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів під дією цих самих доз вітаміну Е спостерігалась за умов D-гіпервітамінозу. При D-гіпервітамінозі вміст 25OHD<sub>3</sub> більше ніж в 3 рази (на 250%) перевищував його рівень у крові контрольних тварин на тлі зниження (на 50%) активності вітаміну D<sub>3</sub>-гідроксилазних систем гепатоцитів за введення токсичних доз вітаміну D<sub>3</sub>. Оскільки за цих умов практично не змінювався рівень гормонально активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub>, негативні порушення мінерального обміну у різних тканинах обумовлювались саме зростанням вмісту 25OHD<sub>3</sub>. Можна припустити, що зниження активності гідроксилазних ензимів шляхом інгібування продуктом реакції є захисним механізмом, спрямованим на зниження синтезу та вмісту в тканинах 25OHD<sub>3</sub> за умови надмірного надходження вітаміну D<sub>3</sub> в організм.

За введення D-гіпервітамінозним тваринам фізіологічних доз вітаміну Е активність D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів знижувалась на 40% порівняно з активністю цих ензимних систем за D-гіпервітамінозу, що практично корелює з відсотком зниження вмісту 25OHD<sub>3</sub> за цих умов. При введенні на тлі D-гіпервітамінозу вітаміну Е у дозі в 50 разів вищій за фізіологічну (36,3 МО Е), активність вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів мала тенденцію до подальшого зниження, хоча вміст 25OHD<sub>3</sub> зростав.

Таким чином, одним із механізмів участі вітаміну Е у регуляції мінерального обміну є його вплив на обмін вітаміну D<sub>3</sub>, який проявляється через регуляцію активності вітаміну D<sub>3</sub> 25-гідроксилазних ензимів.



## REGULATION OF CHOLECALCIFEROL HYDROXYLATION PROCESS BY VITAMIN E IN D-HYPOVITAMINOSIS AND D-HYPERVITAMINOSIS CONDITIONS

*Veliky M.M., Apuhovska L.I., Donchenko G.V., Chomenko A.V.*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Degree provision of an organism by vitamin D<sub>3</sub> is determined by 25OHD<sub>3</sub> content in blood serum. At normal maintenance of an organism with vitamin D<sub>3</sub> the contents 25OH<sub>3</sub> in blood serum lays within 100-150 nmol/L (40-60 ng/mL). Reducing content 25OHD<sub>3</sub> in serum more low 40 ng/mL shows the development of D-hypovitaminosis state. Hypervitaminosis D and hypercalcemia are observed at level 25OH<sub>3</sub> in blood serum of more than 500 nmol/L (200 ng/mL). This occurs when using more than 40.000 IU daily of vitamin D<sub>3</sub>. Mechanism of participation of vitamin E in the regulation of mineral metabolism and status of bone tissue is realized by means of its influence on the exchange of vitamin D<sub>3</sub>, namely the regulation of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes and transport of vitamin to hepatocytes. The character and intensity of effects of vitamin E depends on its dose and duration of appointment.

The aim of researches was to investigate the mechanisms of regulatory effects of vitamin E on the intensity of 25OHD<sub>3</sub> synthesis and activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylated systems of hepatocytes under D-hypovitaminosis and D-hypervitaminosis conditions.

Experiments carried out on rats with models D-hypovitaminosis and D-hypervitaminosis. Vitamin E entered every day in doses: 0,726 IU, 7,26 IU and 36,3 IU throughout 20 days for D-hypovitaminosis and 9 days for D-hypervitaminosis. Contents 25OHD<sub>3</sub> in blood serum determined by a method of radio competitive binding with using [3H]-vitamin D<sub>3</sub>. Activity vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes determined in vitro by incubation of hepatocytes with 100 nmol of vitamin D<sub>3</sub>. Reaction stopped with a mixture of solvents: chloroform-methanol (2:1). Extraction, chromatography and quantitative definition of 25OHD<sub>3</sub> carried out as for blood serum.

It is established, that under a condition of D-hypovitaminosis, contents 25OHD<sub>3</sub> in blood serum reduced to 51,9% compared with hydroxycholecalciferol contents in control animals. This reflects a general lack of vitamin sufficiency of an organism. Activity vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes of rat hepatocytes increased under these conditions by 38%.

Injection of a physiological dose of vitamin D<sub>3</sub> (40 IU D<sub>3</sub>) was accompanied by increased content 25OHD<sub>3</sub> at 40,9 % compared with its level in animals with D-hypovitaminosis and decreased in vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes activity to the level of control. However level 25OHD<sub>3</sub> still remained on 32,2 % lower than in control animals. The simultaneous introduction of vitamin D<sub>3</sub> and physiological dose α-tocopherol (0,726 IU E) led to further increase 25OHD<sub>3</sub> content in the blood serum and activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes (at 25%) in hepatocytes. However, high doses of vitamin E (36.3 IU) significantly and dose-dependent manner inhibited 25OHD<sub>3</sub> formation. So vitamin E at physiological doses activated, and 10 times and higher doses inhibited synthesis 25OHD<sub>3</sub> under conditions of D-hypovitaminosis affecting the activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes. It is established that at D-hypovitaminosis there is a direct correlation between the quantities of synthesized 25OHD<sub>3</sub> and activities of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes.

Another pattern in the dynamics of changes of contents 25OHD<sub>3</sub> in blood serum and activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes in hepatocytes under the influence of these doses of vitamin E observed under conditions of D-hypervitaminosis. At D-hypervitaminosis the contents 25OHD<sub>3</sub> was more than in 3 times (on 250 %) exceeded its level in blood serum of control animals. Vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylated systems activity of hepatocytes was reduced on 50 % at injection of toxic doses of vitamin D<sub>3</sub>. Because of these conditions virtually no change in levels of hormone-active metabolite of vitamin D<sub>3</sub>, negative violations of mineral metabolism in various tissues are caused by increase content of 25OHD<sub>3</sub>. It is possible to assume, that decrease of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes activity by inhibition of the reaction product, is a protective mechanism directed on decrease of synthesis and the contents in tissues of 25OHD<sub>3</sub> under condition of excessive entry of vitamin D<sub>3</sub> in an organism.

Injection of physiological doses of vitamin E at D-hypervitaminosis conditions activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes decreased by 40% compared to the activity of enzyme systems for D-hypervitaminosis. Such changes correlate with the percent of decrease in contents 25OHD<sub>3</sub>. Vitamin E in a dose in 50 times higher than physiological (36.3 IU E), led to further decrease of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes activity however contents of 25OHD<sub>3</sub> increased.

Thus, one of the mechanisms of participation of vitamin E in the regulation of mineral metabolism is its influence on an exchange of vitamin D<sub>3</sub>. This influence is shown through regulation of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase enzymes activity.



## **КОРОТКИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГЛИПРОЛИНЫ (АНАЛОГИ КОРТИКОТРОПИНОВ): КЛЮЧЕВЫЕ МОМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПЕПТИДОВ**

*Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Шевченко А.А., Андреева Л.А., Безуглов В.В.\**

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия  
e-mail: p2@list.ru

\*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, Россия

Нейропептиды – универсальные регуляторы практически всех физиологических функций организма. Создание синтетических аналогов или искусственных модификаций эндогенных пептидов является одним из способов разработки основы для будущих лекарственных препаратов. Так, например, фрагмент АКТГ(4-7) с присоединенной Pro-Gly-Pro C-концевой последовательностью (названный семакс), является синтетическим регулятором функций центральной нервной системы, обладает уникальным набором физиологических эффектов (стимулирование когнитивных функций мозга, нейропротекция, офтальмологические и противовоспалительные эффекты, снижение болевой чувствительности и противоишемическое влияние), которые способны проявляться даже по истечении 12 и более часов. Несмотря на успешное применение препарата, механизм его действия до конца не ясен.

Были исследованы такие аспекты молекулярного механизма действия данного глипролина, как биодegradация в присутствии плазматических мембран различных отделов мозга крысы, а также специфическое связывание меченного тритием по C- концевому пролину гептапептида (MENFPG<sup>3</sup>H)P) и его метаболитов. Установлено, что под действием мембранных протеолитических ферментов из интактной молекулы гептапептида образуется набор коротких (преимущественно C- концевых) фрагментов, большая часть из которых обладает собственной биологической активностью. Определены характеристики мест специфического связывания семакса, пентапептида HFPGP и трипептида RGP на плазматических мембранах различных отделов мозга крысы. Предложена гипотеза возможного молекулярного механизма действия семакса, позволяющая рассматривать этот нейропептид в качестве предшественника своеобразного комплекса биологически активных молекул.



## **SYNTHETIC ANALOGS OF ACTH(4-10)PROGLYPRO: THE KEY MOMENTS OF MOLECULAR MECHANISM**

*V'unova T. V., Shevchenko K. V., Shevchenko A. A., Andreeva L. A., Bezuglov<sup>1</sup> V. V.*

Institute of Molecular Genetics RASciences, Moscow, Russia

e-mail: p2@list.ru

<sup>1</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Biorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Neuropeptides known as universal regulators of most physiological functions in living organisms. Artificial analogs or modifications of these endogenous molecules could become a good base for new effective drugs in future. Semax is a heptapeptide, synthetic analogue of an ACTH(4-10) fragment of corticotropin, of the following structure: Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro. It is characterized by wide spectrum of prolonged action (24 to 48 hours), and the absence of hormonal activity and side effects. Semax included into the therapy complex of optic nerve diseases, it can be used as a nootrop, for treatment of intellectual and mnestic disorders efficiently protects the nervous tissue from damage after-effects. The mechanism of Semax activity is still unclear.

Such important moments of molecular mechanism like biodegradation and specific binding with rat brain cells plasmatic membranes of semax and it's metabolites were investigated. It was shown that Semax exposing to P2 membranes of different brain structure cells undergoes fast proteolysis by membrane enzymes. Semax is actively cleaves to the biologically active HFPGP-pentapeptide, PGP-tripeptide and other non active fragments (C-terminal mainly). It was shown that binding of [<sup>3</sup>H]Semax, [<sup>3</sup>H]HFPGP and [<sup>3</sup>H]PGP is time-dependent, saturable and specific. All data presented let us to make suggestion that biological activity of Semax may be the result of molecular mechanism, including peptide biodegradation process and specific binding of Semax and its short derivative fragments.



## ВПЛИВУ НОВОГО ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ НА СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ПІСЛЯ ІНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ

Яблонська С.В., Філінська О.М., Островська Г.В., Харчук І.В., Артеменко О.Ю., Рибальченко В.К.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
e-mail: svitlana.yablonska@yahoo.com

Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка синтезовано 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі MI-1) [1]. MI-1 є високоселективним інгібітором протеїнази, проявляє цитостатичні властивості [2] та є перспективною сполукою для комплексної хіміотерапії злоякісних новоутворень в людей. Ця сполука може спричинити патологічні зміни, одним із проявів яких є порушення функціонування системи вільнорадикального перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи. Унікальну роль у формуванні резистентності організму до різних хімічних і фізичних впливів відіграє глутатіонова антиоксидантна система. До складу цієї системи, активність якої найвища у клітинах печінки, входять відновлений глутатіон (ВГ), глутатіон-S-трансфераза (ГТ), глутатіонпероксидаза (ГП). Метою роботи є дослідження стану глутатіонової антиоксидантної системи печінки щурів після одноразового і десятиденного інтрагастрального введення 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон та за умов оксидативного стресу, спричиненого CoCl<sub>2</sub>.

Дослідження проведені на 60 білих щурах-самцях, яким вводили одноразово або протягом 10 днів розчинений в соняшниковій олії MI-1 перорально (за допомогою зонду для годування) у дозі 5 мг/кг маси тіла; CoCl<sub>2</sub>, розчинений у 0,9% NaCl, вводили внутрішньочеревинно в дозі 15 мг/кг. Тварин було поділено на 4 групи: контрольна (№1), яким вводили перорально 0,2 мл соняшникової олії та внутрішньочеревинно 0,2 мл фізіологічного розчину, і три дослідні: №2 – MI-1 та фізіологічний розчин; №3 – CoCl<sub>2</sub> та олію; №4 – MI-1 та CoCl<sub>2</sub>. MI-1 та олію вводили за 2 години до введення CoCl<sub>2</sub>. Тварин декапітували через 24 год після останнього введення CoCl<sub>2</sub> та фізіологічного розчину. В цитозольній фракції клітин печінки щурів, яку виділяли за методом [3] визначали вміст ВГ, активність ГП та ГТ.

Після одноразового введення тваринам MI-1, CoCl<sub>2</sub> та їх сумісного застосування достовірних змін вмісту ВГ в цитозольній фракції печінки тварин не виявлено. Після десятиденного введення CoCl<sub>2</sub> вміст ВГ зменшується на 20% порівняно з контрольними значеннями, а в інших досліджуваних групах достовірних змін не спостерігається. Відновлений глутатіон є високочутливим індикатором функціонування та виживання клітин. Відсутність вірогідних змін вмісту ВГ в цитозольній фракції печінки тварин після впливу MI-1 є, безумовно, його позитивною характеристикою. Сумісне застосування MI-1 та CoCl<sub>2</sub> не викликає вірогідних змін вмісту ВГ. Не змінюється і активність ГП після одноразового впливу досліджуваних речовин. Після десятиденного введення MI-1 та його сумісного застосування з CoCl<sub>2</sub> вірогідних змін активності ГП також не відбувається, тоді як під впливом CoCl<sub>2</sub> активність ферменту знижується на 25% порівняно з контрольними значеннями. ГП каталізує реакцію відновлення гідроперекису за допомогою ВГ, ймовірно причиною зниження її активності є зменшення вмісту в клітині останнього під впливом CoCl<sub>2</sub>. Після одноразового введення тваринам MI-1 активність ГТ в цитозольній фракції печінки тварин зростає на 20% і на 15% при сумісному введенні з CoCl<sub>2</sub>. Найбільш вираже збільшення активності ГТ (на 40%) викликає CoCl<sub>2</sub>. Активність ферменту зростає і після десятиденного інтрагастрального введення досліджуваних сполук: так, під впливом MI-1 активність ГТ зростає на 18%, на 30% під впливом MI-1 сумісно з CoCl<sub>2</sub>, а під впливом самого CoCl<sub>2</sub> – на 33%. ГТ відіграє значну роль в детоксикації, деградації і виведенні із організму чужорідних органічних сполук, що представляють собою різні токсичні сполуки, лікарські препарати, цитостатики та ін. Помітна активація ферменту в клітинах печінки під впливом усіх досліджуваних нами речовин свідчить про їх активну детоксикацію. З індукцією ГТ дослідники пов'язують антиканцерогенний ефект низки сполук, тому можливо, що збільшення активності ГТ під впливом MI-1 є одним із шляхів його цитостатичної дії на ракові клітини.

Таким чином, новосинтезована сполука 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон не спричиняє вірогідних змін глутатіонової антиоксидантної системи печінки щурів після одноразового чи десятиденного інтрагастрального введення. Враховуючи отримані дані і дані гістологічних досліджень [4], ця сполука може бути рекомендована для доклінічних досліджень.

### Література:

1. Пат. № 22204 (Україна). Сполуки 1,4-двозаміщені 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-діон що мають протиракову активність / Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М. Опубл. 25.04.2007.
2. Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // Журнал орг. та фарм. хімії. – 2007. – Том 5, № 1. – С. 39-49.
3. Методы биохимических исследований. Учебное пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. Ун-та, 1982. – 272 с.
4. Харчук І.В., Островська Г.В., Яблонська С.В. та ін. Дослідження нефротоксичності похідного малеїмід 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону за умов оксидативного стресу// В цьому збірнику.



## THE INFLUENCE OF NOVEL MALEIMIDE DERIVATE ON LIVER GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM STATE AFTER INTRAGASTRIC TREATMENT

*Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G., Kharchuk I., Artemenko O., Rybalchenko V.*

National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
e-mail: svitlana.yablonska@yahoo.com

1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2.5-dione (MI-1) has been synthesized in National Taras Shevchenko University [1]. This is high selective protein kinases inhibitor that reveals cytostatic properties [2] and is prospective compound for complex chemotherapy of human malign tumors. This compound may cause pathological disturbances. One of its manifestation can be disorders in functioning of free radical lipid peroxidation and antioxidant system. Glutathione antioxidant system plays unique role in organisms resistance to different chemical and physical effects. The highest activity of this system is displayed in liver and consists of glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx). The aim of this work is to determine liver glutathione antioxidant system state after single-dose and 10-days intragastric treatment of 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2.5-dione and under condition of oxidative stress caused by CoCl<sub>2</sub>.

Investigation was carried out on 60 white male rats which have been treated with MI-1 dissolved in sunflower oil by intragastric (i.g.) way (with probe before feeding) in doze 5 mg/kg of body weight; CoCl<sub>2</sub> dissolved in 0,9% NaCl – subcutaneously (s.c.) in doze 15 mg/kg. Animals were divided in 4 groups: control (№1), treated with 0.2 ml sunflower oil i.g. and 0.2 ml physiologic saline s.c. and 3 experimental: №2 – MI-1 and physiologic saline; №3 – CoCl<sub>2</sub> and sunflower oil; №4 – MI-1 and CoCl<sub>2</sub>. MI-1 and sunflower oil was injected 2 hour before CoCl<sub>2</sub> treatment. Animals were decapitated after 24 hours of last CoCl<sub>2</sub> and physiologic saline treatment. In liver cells cytosol fraction prepared by ultracentrifugation method [3] GSH content, activity of GPx and GST were measured.

After single-dose administration of MI-1, CoCl<sub>2</sub> and its combined usage no significant changes of GSH content was revealed in cytosol fraction. After 10-days CoCl<sub>2</sub> injection GSH content decrease up to 20% in comparison to control values, in others experimental groups significant changes were not observed. GSH is high sensitive indicator of cells functioning and viability. The absence of reliable changes of GSH after MI-1 treatment in liver cytosol is its positive feature. Combined usage of MI-1 and CoCl<sub>2</sub> does not induce reliable changes of GSH content. GPx activity does not change after single-dose administration of studied compounds too. 10-days animal treatment with MI-1 and its combined application with CoCl<sub>2</sub> does not cause reliable changes of GPx activity but CoCl<sub>2</sub> causes enzyme activity decreasing up to 25% in comparison to control values. GPx catalyzes hydroperoxide recovery through the GSH. Probable reason of its decreasing is reduction of GSH content in cell after CoCl<sub>2</sub> injection. Single-dose treatment with MI-1 causes increasing GST activity up to 20% and up to 15% in case of its combined application with CoCl<sub>2</sub>. The most meaningful rise of GST activity (up to 40%) is induced by CoCl<sub>2</sub>. Enzymes activity rises after 10-days intragastric administration of studied compounds too: MI-1 causes increasing of GST activity up to 18%, MI-1 in combination with CoCl<sub>2</sub> – up to 30%, and CoCl<sub>2</sub> – up to 33%. GST plays considerable role in detoxification, degradation and excretion foreign organic compounds: toxic substances, medicine, cytostatic etc. Considerable enzyme activation in liver cells after treatment with studied compounds suggests about its detoxification. Induction of GST activity associated with anticarcinogenic effects number of compounds, therefore increasing of GST activity after MI-1 treatment might be one of its cytostatic actions to cancer cells.

Therefore novel compound 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2.5-dione does not cause significant disturbances of glutathione antioxidant system in liver cell after single-dose and 10-days intragastric administration. Considering those data and findings of histological researches [4] this compound can be recommended for preclinical investigation.

### References:

1. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko – 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
2. Dubinina, G.G., Golovach, S.M., Kozlovs'kii, V.O. et al. Antiproliferative action of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione. // Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry.–2007.– Vol. 5, N 1.–P. 39-49.
3. Methods of biochemical researches. Tutorial / edited by Prohorova M. – Leningrad: publishing house of Leningrad university, 1982. – 272 p.
4. Kharchuk I., Ostrovska G., Yablonska S. et al. Research of nephrotoxicity the maleimide derivate (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2.5-dione) under the oxidative stress conditions / in these digest.



## ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ ФЕНУГРЕКУ НА СТАН КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ У ЩУРІВ

*Якубцова І., Хілько Т., Преображенська Т., Остапченко Л., Макай Ш., Чехун В.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

e-mail e-mail: irinamaster@gmail.com

Університет Західної Угорщини, Угорщина

Протягом останніх років найбільш гостро постає проблема пошуку нових біологічно активних речовин (БАР), здатних підвищувати загальну резистентність організму та стимулювати розвиток захисних реакцій у відповідь на дію різноманітних пошкоджуючих чинників. В цьому аспекті особливу увагу привертають БАР рослинного походження. Саме екстракт фенугреку є потенційним джерелом комплексу БАР, який містить у своєму складі: галактоманани, амінокислоти, ліпіди, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, стероїдні сапогеніни, алкалоїди, флавоноїди, вітаміни, мікроелементи.

Метою даної роботи було: дослідити вплив екстракту фенугреку на стан клітин слизової оболонки дванадцятипалої кишки (ДПК) за умов цистеамінової моделі виразки у щурів. Досліди проводили на плазматичних мембранах (ПМ) клітин слизової оболонки (СО) ДПК, також вивчали вміст глікопротеїнів у пристінковому слизі ДПК. Для оцінки структурно-функціонального стану плазматичних мембран (ПМ) вивчали ліпідний склад та рівень активності мембранозв'язаних ферментів. Щурів розподіляли на групи: 1 – контрольна, 2 – тварини, у яких моделювали цистеамінову виразку, розвиток якої контролювали гістологічними дослідженнями; 3-я – група тварин отримувала екстракт фенугрека у кількості 50 мг/кг протягом 7 діб.

При цистеаміновій моделі відбувалося зниження рівня гексозамінів (3,0 рази), N-ацетилнейрамінової кислоти (2,4 рази), фукози (1,8 разів), а галактози збільшувалось (2,7 рази) по відношенню до контролю. За цих же умов у щурів спостерігалось зниження активності мембранозв'язаних ферментів (ПМ): 5'нуклеотидази,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази та  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази (1,5 - 2 рази), активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази збільшувалась в 2 рази відносно контролю. Встановлено зменшення сумарного вмісту ФЛ у 1,9 рази. Визначення вмісту індивідуальних ФЛ у ПМ клітин слизової оболонки (СО) ДПК показало, що найбільш суттєвим було зниження вмісту фосфатидилхоліну (1,9 рази), фосфатидилетаноламіну (1,8 рази), сфінгомієліну (2 рази) та фосфатидилінозитолу (1,5 рази), вміст холестеролу (Х) при цьому зростав у 2 рази. Відповідно співвідношення Х/ФЛ збільшувалось до 2,2 рази. Отримані результати можуть свідчити про дестабілізацію і структурно-функціональні порушення ПМ клітин СО ДПК за умов цистеамінової моделі виразки.

Враховуючи, що дія цистеаміну пригнічує слизоутворюючу здатність клітин СО ДПК, екстракт фенугреку стимулює цей процес, впливаючи на метаболічні та регенеративні процеси в СО.

Введення тваринам екстракту фенугрека на фоні розвитку цистеамінової виразки сприяло відновленню кількісного вмісту ФЛ, зниженню кількості холестеролу, нормалізації активності досліджуваних мембранозв'язаних ферментів майже до рівня контролю. Таким чином отримані результати дають підставу передбачати, що введення екстракту фенугрека може призводити до прискорення відновлювальних процесів, нормалізації структурно-функціонального стану ПМ клітин у пошкодженій слизовій оболонці дванадцятипалої кишки за умов розвитку виразки.

Робота виконувалась за підтримки гранту МОН України «Визначення біохімічних механізмів дії екстрактів лікарських рослин на організм для корекції різних патологічних процесів» та гранту НАН України «Разработка научных основ и биохимическое обоснование механизмов действия активных компонентов адаптогенов природного происхождения с целью коррекции патологических процессов».

**EFFECT OF FENUGREEK EXTRACT ON THE STATE OF DUODENUM  
MUCOSA CELLS IN RATS**

*Yakubtsova I., Khilko T., Preobrazhenska T., Ostapchenko L., Makay S., Chekhun V.*

Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine  
University of the West Hungary, Hungary  
e-mail irinamaster@gmail.com

Search for new biologically active substances (BAS), which could increase total resistance of the organism and stimulate development of protective reactions in response to the action of different disturbing factors, became last years an urgent problem. In this aspect, BAS of plant origin are of special importance. In particular, the fenugreek extract is a potential source of BAS complex, which contains galactomanans, amino acids, lipids, unsaturated fatty acids, polysaccharides, steroid sapogenins, alkaloids, flavonoids, vitamins, microelements.

The aim of this work was to study the effect of the fenugreek extract on the state of duodenum mucosa cells in conditions of cysteamine model ulcer in rats. Experiments were carried out on plasma membranes (PM) of duodenum mucosa cells; also, content of glycoproteins in parietal mucous of duodenum was evaluated. Lipid composition and the level of activity of membrane bounded enzymes were studied to estimate the structural and functional state of plasmatic membranes (PM). Rats were divided into the groups: 1 – control; 2 – animals with cysteamine model ulcer, which development was controlled by histological examinations; 3 – the group of animals that were given fenugreek extract in dose 50 mg/kg during 7 days.

As compared with control, cysteamine model caused lowered levels of hexosamines (3.0 times), acetylneuramine acid (2.4 times) and fucosa (1.8 times), and increased level of galactose (2.7 times). In the same conditions, there was observed lowered activity of membrane bounded enzymes (PM) – 5'-nucleotidase,  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPases and  $\text{H}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPases (1.5 to 2 times); activity of  $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase was increased two times comparing to control. Total content of phospholipids (PL) was 1.9 times lower. Determination of individual PL in PM cells of duodenum mucosa showed that most significant was decrease of phosphatidylcholine (1.9 times), phosphatidyl ethanolamine (1.8 times), sphingomyeline (2 times) and phosphatidyl inositol (1.5 times); at the same time, cholesterol (CH) increased two times. Accordingly, the ratio CH/ PL increased 2.2 times. The results may indicate destabilization and structural, functional disturbances of PM cells of duodenum mucosa at cysteamine model ulcer.

Taking into account that cysteamine inhibits mucus-producing ability of duodenum mucosa cells, fenugreek extract stimulates this process influencing metabolic and regenerative processes in mucosa cells.

Fenugreek extract introduced into animals with cysteamine ulcer resulted in recovery of PL content, decrease of cholesterol, normalization of the activity of the studied membrane bounded enzymes nearly the control level. Therefore, our results show that fenugreek extract may accelerate recovery processes and lead to normalization of structure-functional state of cells in damaged mucosa at the condition of duodenum at ulcer.

The work was carried out at the support of the Ministry of Education and Science of Ukraine grant "Determination of biochemical mechanisms of the action of medicinal plant extracts on the organism with the purpose to correct different pathological processes" and the National Academy of Science of Ukraine grant "Elaboration of scientific basis and biochemical substantiation of mechanisms of the action of adaptogen active components of natural origin with the purpose to correct pathological processes".





## **ВЛИЯНИЕ ТЕОФИЛЛИНА И ПАПАВЕРИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА**

*Янцев А.В.*

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, симферополь, Украина  
e-mail: shakataka@mail.ru

Для снятия спазмов гладких мышц внутренних органов используется широкий спектр фармакологических препаратов. Однако значительная часть из них, являющихся спазмолитиками нейротропной группы, вызывают ряд нежелательных побочных эффектов: сонливость, тахикардию, нарушение диуреза и т.д. В данном сообщении приводятся результаты исследований воздействия миотропных спазмолитиков, лишенных данных недостатков, на способность гладкой мускулатуры пищеварительного тракта к генерации медленных электрических волн и пиковых потенциалов.

Работа проводилась на 30 белых крысах обоего пола массой около 200 граммов. Аппликация растворов фармакологических препаратов на слизистую оболочку тонкой кишки производилась в условиях острого опыта. Для регистрации электрической активности гладких мышц применялись серебряные шариковые электроды.

В контрольных регистрациях средняя частота следования медленных электрических волн составила  $31 \pm 1,6$  ц/мин., с продолжительностью плато  $0,77 \pm 0,04$  с и средним количеством волн, несущих пиковые потенциалы -  $7 \pm 2,4$  в минуту. Введение теофиллина в дозе 5 мг/кг уже на пятой минуте снизило частоту волн основного электрического ритма до  $25 \pm 14,4$  ц/мин. Продолжительность плато увеличилась до  $1,09 \pm 0,06$  с, а количество волн несущих пиковые потенциалы, уменьшилось до  $4 \pm 0,9$  в минуту.

Использование критерия Фридмана показало, что достоверное угнетение активности гладких мышц продолжалось до 40-й минуты эксперимента.

Эффект аппликации спазмолитика папаверина зависел от исходного уровня электрической активности гладких мышц. При наличии пиковых потенциалов на плато медленных волн аппликация препарата уже к концу третьей минуты приводила к их полному исчезновению. В случае отсутствия пиковой активности на исходных электрограммах, влияние папаверина проявлялось в появлении быстрых потенциалов, регистрировавшихся на протяжении 10-25 минут с последующим развитием тормозного эффекта. В обоих случаях частота генерации медленных электрических волн достоверно не изменялась. Физиологические механизмы наблюдаемых реакций обсуждаются.



## **INFLUENCE OF THEOPHYLLINE AND PAPAVERINE ON ELECTRICAL ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES OF THE DIGESTIVE TRACT**

*Yantsev A.V.*

Vladimir Vernadsky Taurida National University, Simferopol, Ukraine  
e-mail: shakataka@mail.ru

To remove the spasm of smooth muscles of the internal organs it is used a wide range of pharmacological drugs. However, a significant part of them, presenting spasmolytics of neurotropic group, provoke a number of undesirable side effects: somnolence, tachycardia, disorder of diuresis, etc. This report contains the results of influence, caused by myotrophic spasmolytics (which haven't got such lacks), on the ability of smooth muscles of the digestive tract to generate slow electrical waves and peak potentials.

Work was conducted on 30 white rats of both sexes with the weight of about 200gr. Application of pharmacological drugs solutions for the mucous membrane of the small intestine was performed in the terms of acute experiment. To register the electrical activity of smooth muscles there were used silver ball electrodes. In the control registrations average frequency of the slow electrical waves was  $31 + 1,6$  cpm with the duration of the plateau  $0,77 + 0,04$  and with the average number of waves that carry peak potentials -  $7 + 2,4$  per minute. Adding of theophylline at a dose of 5 mg/kg at the fifth minute reduced the frequency of waves of the basic electrical rhythm up to  $25 + 14,4$  cpm. The duration of the plateau rose up to  $1,09 + 0,06$ s, and the number of waves that carry peak potentials/action potentials, was reduced up to  $4 + 0,9$  per minute. The usage of Friedman's test showed that accurate depression of smooth muscles activity lasted up to the 40<sup>th</sup> minute of the experiment. The effect of application of papaverine depended on the initial level of electric activity of smooth muscles. At presence of peak potentials on the plateau of slow waves the application of drug already by the end of the third minute resulted in their complete disappearance. In the case of absence of peak activity on initial electrogramms, influencing of papaverine showed up in appearance of rapid potentials, registered during 10-25 minutes with subsequent development of brake effect. In both the case frequency of generation of slow electric waves did not change for certain. In both the case frequency of generation of slow electric waves did not change for certain. The obtained results are discussed.



### БАКТЕРИЦИДНОЕ, ФУНГИЦИДНОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЕТЕРОБИМЕТАЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

Яворская Н.В.\*, Гарманчук Л.В.\*, Перепелицына Е.М.\*\*\*, Сенчило Н.В.\*, Фурзикова Т.М.\*,  
Нестерова О.В.\*, Козкозей В.Н.\*, Позур В.К.\*

\*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

\*\*Отделение биотехнических проблем диагностики Института криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
Киев, Украина

e-mail: samonina65@gmail.com

Перспективными среди химиопрепаратов являются комплексы металлов с органическими лигандами. Особенностью этих соединений есть их высокая реактивность и биодоступность, что обуславливает их терапевтическую эффективность. Для определения диапазона влияний ряда синтезированных гетеробиметаллических комплексов определяли бактерицидную, фунгицидную и цитотоксическую активность на модельных системах *in vitro*. Для исследований были использованы соединения меди с цинком или кадмием:  $[Cu(en)_2ZnCl_4] \cdot dmsO$  (PO 39),  $[Cu(en)_2ZnCl_4] \cdot dmf$  (PO 172),  $[Cu(en)_2Zn(CH_3COO)_4]$  (PO 80),  $[Cu(en)_2CdBr_4] \cdot dmsO$  (PO 252) и  $[Cu(en)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$  (PO 244), где *en* - этилендиамин, *dmsO* - диметилсульфоксид, *dmf* – диметилформамид. В качестве тест-культур использовали грамположительные (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) и грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) бактерии, а также грибы рода *Candida*. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемых комплексов определяли классическим методом серийных разведений. Для определения цитотоксического эффекта исследуемых агентов использовали линии опухолевых клеток: MCF-7, K562, Hela. После скрининга каждого из агентов в широком диапазоне концентраций цитотоксическое действие определяли по кривым выживаемости клеток по отношению к соответствующему контролю и по показателю  $IC_{50}$ .

В результате полученных данных было выявлено, что наибольшее бактерицидное и фунгицидное действие характерно для кадмий-содержащих соединений (PO252 и PO244). Их МПК составляло 0,02-1,25 мг/мл. Для цинк-содержащих агентов МПК составляло 0,08-2,5 мг/мл, что было в 2-4 раза выше ( $p < 0,01$ ), чем для кадмий-содержащих агентов.

Установлено, что из пяти исследуемых соединений наиболее выраженной цитотоксической активностью обладало соединение PO 244. Так показатель  $IC_{50}$  для соединения PO244 по отношению к клеткам линии K562 равнялся  $4,2 \pm 0,01 \times 10^{-5}$  М; к клеткам линии MCF-7 -  $1,1 \pm 0,004 \times 10^{-5}$  М, к клеткам линии Hela –  $0,9 \pm 0,002 \times 10^{-5}$  М. Что касается остальных исследуемых соединений, то показатели  $IC_{50}$  существенно превышали аналогичные для PO244 и были в диапазоне  $3,25-9,7 \times 10^{-4}$  М. Хотя, для соединения PO252 по отношению к клеткам Hela показатель  $IC_{50}$  был равен  $4,2 \pm 0,01 \times 10^{-5}$  М.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о высокой эффективности исследуемых соединений в качестве антимикробных, фунгицидных и цитотоксических агентов. Особенно, перспективным препаратом является кадмий содержащий агент  $[Cu(en)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$  (PO 244).



**BACTERICIDAL, FUNGICIDAL, AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF HETEROBIMETALLIC COMPLEXES**

Yavorska N.V.\*, Garmanchuk L.V.\*, Perepelitsyna E.M.\*\*\*, Senchylo N.V.\*, Furzikova T.M.\*,  
Nesterova O.V.\*, Kokozay V.N.\*, Pozur V.K.\*

\* Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine

\*\* Institute of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Department of Biotechnological Problems of Diagnostics, Kyiv, Ukraine  
e-mail: samonina65@gmail.com

Among chemotherapeutic agents, complexes of metals with organic ligands are very promising. These compounds are peculiar in their high reactivity and bioavailability, which makes for their therapeutic efficacy. In order to determine the range of action of a set of synthesized heterobimetallic complexes, we assessed their bactericidal, fungicidal, and cytotoxic activity in model systems *in vitro*. In this study we used the following compounds of copper with zinc or cadmium: [Cu(en)<sub>2</sub>ZnCl<sub>4</sub>]-dmsO (PO 39), [Cu(en)<sub>2</sub>ZnCl<sub>4</sub>]-dmf (PO 172), [Cu(en)<sub>2</sub>Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>4</sub>] (PO 80), [Cu(en)<sub>2</sub>CdBr<sub>4</sub>]-dmsO (PO 252) and [Cu(en)<sub>2</sub>][Cd<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>] (PO 244), where **en** stands for ethylenediamine, **dmsO** means dimethyl sulfoxide, and **dmf** means dimethyl formamide. We used gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) bacteria, as well as fungi of the genus *Candida*, as test cultures. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the studied complexes were determined using the classic method of serial dilutions. The tumor cell lines MCF-7, K562, and Hela were used to estimate the cytotoxic action of the tested agents. After screening each of the agents in a broad range of concentrations, the cytotoxic effect was determined with the help of cell survival curves juxtaposed against corresponding controls, as well as using the IC<sub>50</sub> value.

As a result, we have revealed that the most profound bactericidal and fungicidal effect is demonstrated by cadmium-containing compounds (PO252 and PO244). Their MIC constituted 0.02-1.25 mg/ml. The MIC for zinc-containing agents was 0.08-2.5 mg/ml, which was 2-4 ( $P < 0.01$ ) times as high as that of cadmium-containing agents.

Among the five tested compounds, PO244 was found to have the most pronounced cytotoxic effect. Thus, the IC<sub>50</sub> value for PO244 in relation to the cells of the line K562 was equal to  $4.2 \pm 0.01 \times 10^{-5}$  M, the cells of the line MCF-7 –  $1.1 \pm 0.004 \times 10^{-5}$  M, and the line Hela –  $0.9 \pm 0.002 \times 10^{-5}$  M. As for the other tested compounds, their IC<sub>50</sub> was considerably higher than that of PO244 and was found to range from  $3.25 \times 10^{-4}$  to  $9.7 \times 10^{-4}$  M. However, the IC<sub>50</sub> for PO244 in relation to Hela cells constituted  $4.2 \pm 0.01 \times 10^{-5}$  M.

Therefore, the results of the study suggest high efficiency of the tested compounds as antimicrobial, fungicidal, and cytotoxic agents. The cadmium-containing agent [Cu(en)<sub>2</sub>][Cd<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>] (PO 244) appears particularly promising.



## АДИТИВНИЙ ПРОТИПУХЛИННИЙ ЕФЕКТ ПОЛІФЕНОЛІВ ЗЕЛЕНОГО ЧАЮ І СИНТЕТИЧНОГО ІНГІБИТОРА ОБМІНУ ПОЛІАМІНІВ – ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ

Залеток С.П., Гоголь С.В., Самойленко О.А., Малицька І.В., Орловський О.А.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Вступ.** Відомо, що поліаміни (ПА) абсолютно необхідні для проліферації клітин. Тому специфічні інгібітори біосинтезу ПА здатні гальмувати ріст пухлин. Внутрішньоклітинний вміст ПА може зростати не лише завдяки їх біосинтезу *de novo*, але й шляхом інтерконверсії ацетильованих форм ПА за участі поліаміноксидази (ПАО). Тому, як показано в наших попередніх дослідженнях, інгібітори, що пригнічують не лише біосинтез ПА, але й їх інтерконверсію (наприклад, такі як полігексаметиленгуанідин, ПМГ), можуть гальмувати ріст пухлин більш ефективно, ніж такі, що впливають лише на біосинтез (як  $\alpha$ -дифторметилорнітин,  $\alpha$ -ДФМО). Оскільки ПА підвищують зв'язування фактора транскрипції NF- $\kappa$ B з відповідними ДНК-послідовностями, гальмування росту пухлин зазначеними інгібіторами може бути опосередковане і їх гальмуючим впливом на активність NF- $\kappa$ B та відповідними змінами експресії NF- $\kappa$ B-залежних онкогенів. Разом з тим, такі агенти, як ПМГ, досить токсичні і викликають в організмі низку побічних ефектів. Нарешті, наші попередні дослідження показали, що поліфеноли зеленого чаю (ПЗЧ) пригнічують ріст експериментальних пухлин молочної залози (карциноми Ca-755 мишей, карциносаркоми Уокер W-256 щурів та клітинної лінії MCF-7 раку молочної залози людини) і не мають побічної дії. Гальмування ними росту пухлин також супроводжувалось пригніченням як біосинтезу, так і інтерконверсії ПА, відповідними змінами активності NF- $\kappa$ B та експресії залежних від нього генів в пухлинних клітинах.

**Мета:** в'ясувати можливість підсилення протипухлинної дії інгібіторів метаболізму поліамінів поліфенолами зеленого чаю та дослідити їх спільну дію на активацію NF- $\kappa$ B і експресію білків, продуктів деяких онкогенів.

**Матеріали і методи.** Тварини з підшкірно перещепленими пухлинами (карцинома Ca-755 мишей та карциносаркома Уокер W-256 щурів) одержували розчин екстракту поліфенолів зеленого чаю в питній воді (1 мг/мл) з дня перещеплення по день забою. ПМГ або ДФМО вводили інтраперитонеально у водному розчині в дозах та режимі, попередньо відпрацьованих для застосування цих речовин. Тварин забивали під ефірним наркозом, пухлини видалляли, зважували, з пухлин готували ядерні та клітинні екстракти, в яких надалі за допомогою методів Вестерн-блотингу (ВБ) та поверхневого плазмонного резонансу (ППР) визначали білки NF- $\kappa$ B (p50 і p65), інгібіторні білки (I $\kappa$ B $\alpha$ ) та білкові продукти онкогенів (*odc*, *c-myc*, *bcl-xl*, *cox-2*, *inos* та *p53*).

**Результати.** Взаємне посилення протипухлинного ефекту ПМГ та ПЗЧ було одержане, коли курс ПМГ починали на ранніх термінах, до появи видимих пухлин. Отримані результати (для пухлин W-256) подані в таблиці.

Група тварин	Контроль	ПЗЧ	ПМГ	ПЗЧ + ПМГ
Маса пухлин (г, M $\pm$ m)	18.5 $\pm$ 2.4	12.3 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 1.4	4.2 $\pm$ 1.2

Як видно, кількісно цей ефект був адитивним. ПЗЧ, незалежно від того, на ранніх чи пізніх термінах вводили ДФМО, не посилював гальмівного ефекту останнього.

На фоні пригнічення росту пухлин при спільному застосуванні ПЗЧ і ПМГ в ядрах клітин карциносаркоми Уокер виявлено суттєве підвищення експресії субодиниць NF- $\kappa$ B (білків p50, p52, c-rel) і інгібіторних білків NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) та значне зменшення p65- субодиниці NF- $\kappa$ B. Аналогічний ефект ці агенти справляли і на експресію в ядрах фосфорильованої форми білка p65. Вплив ПМГ і ПЗЧ на експресію білків p65, p52 та c-rel при комбінованому їх введенні був адитивний, а на експресію I $\kappa$ B $\alpha$  – дещо слабший від адитивного. Наслідком цих змін може бути зниження активності класичного фактора NF- $\kappa$ B (p50/p65) та зменшення експресії залежних від нього генів. Дослідження експресії білків, продуктів NF- $\kappa$ B-залежних генів (*c-myc*, *bcl-xl*, *cox-2*, *inos*) в пухлинних клітинах, підтвердило ці припущення. Виявлено, що спільне застосування ПМГ та ПЗЧ призводить до більш суттєвого зменшення експресії білкових продуктів онкогенів *c-myc* та *bcl-xl*, а також білка ключового фермента біосинтезу ПА ОДК, ніж кожен з цих агентів, використаний окремо. Показано також, що при спільному застосуванні ПМГ та ПЗЧ, на відміну від використання лише ПМГ, знижується експресія білкових продуктів генів *cox-2* та *inos*. Разом з тим, комбіноване введення тваринам ПМГ і ПЗЧ призводило до більш значного зростання експресії білка p53, продукта гена-супресора пухлин p53.

**Висновки.** Таким чином, проведені дослідження показали, що ПЗЧ значно підсилюють протипухлинний ефект інгібітора синтезу і інтерконверсії поліамінів (ПМГ). Адитивність протипухлинної дії цих агентів опосередкована синергічним/адитивним їх ефектом на ПА-, NF- $\kappa$ B- та p53- залежні сигнальні шляхи. Отримані дані вказують на перспективність застосування поліфенолів зеленого чаю при лікуванні онкологічних хворих, зокрема, в комплексі з інгібіторами обміну ПА.



**ADDITIVE ANTITUMOR EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS AND A SYNTHETIC INHIBITOR OF POLYAMINES BIOSYNTHESIS – POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE**

Zaletok S.P., Gogol S.V., Samoylenko O.A., Malitska I.V., Orlovsky O.A

R.E. Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: orlovaleks@rambler.ru

**Preamble.** Polyamines (PA) are known to be obvious for cell proliferation. That's why specific inhibitors of PA biosynthesis can retard tumor growth. Intracellular PA content can be not only enhanced by *de novo* biosynthesis but also reconstituted by interconversion of the acetylated PA forms through polyamine oxidase (PAO). Because of this, as it was shown in our previous studies, the inhibitors affecting not only PA biosynthesis but also PA interconversion (such as polyhexamethyleneguanidine, PMG) can retard tumor growth more effectively than the inhibitors affecting only biosynthesis (such as  $\alpha$ -difluoromethylornithine,  $\alpha$ -DFMO). Since PA strengthen binding of the NF- $\kappa$ B transcription factor to the corresponding DNA-sequences, this retardation is mediated, in particular, by diminished NF- $\kappa$ B activity and by corresponding modulations of the NF- $\kappa$ B-dependent oncogenes expression. Although, the agents such is PMG are rather toxic and can induce several side effects in an organism. At last, our previous experiments show the green tea polyphenols (GTP) can inhibit both PA biosynthesis and (some weaker) interconversion in the cells of experimental grafted mammary tumors (mouse Ca-755 carcinoma and rat Walker W-256 carcinosarcoma) and in the cultured human breast cancer cells (MCF-7) and have not any side effects. Their retardation of tumor growth was also accompanied by inhibition of both PA biosynthesis and interconversion and by corresponding modulations of NF- $\kappa$ B activity and NF- $\kappa$ B-dependent oncogenes expression in the tumor cells.

**The aim:** to clarify whether GTP are able to strengthen antitumor activity of the inhibitors of PA metabolism and to study their combined effect on NF- $\kappa$ B activation and on expression of the protein products of certain oncogenes.

**Materials and methods.** The animals been grafted subcutaneously with corresponding tumors (mouse Ca-755 carcinoma and rat Walfer W-256 carcinosarcoma) obtained solution of GTP-containing green tea extract in drinking water (1 mg/ml) from the day of grafting up to the day of sacrifice. PMG or DFMO (in the doses and regimes have been find previously for these substances alone) was injected intraperitoneally in aqueous solution. After the animals have been sacrificed under ether narcosis, tumors were excised, weighted and then used to prepare nuclear and cytoplasm extracts. In these extracts, the NF- $\kappa$ B proteins (p50 i p65), inhibitory proteins (I $\kappa$ B $\alpha$ ) and the oncogenes' (*odc*, *c-myc*, *bcl-xl*, *cox-2*, *inos* та *p53*) protein products were determined by the methods of Western blotting (WB) and surface plasmon resonance (SPR).

**Results.** Mutual enhancement of GTP and PMG antitumor effect was obtained when the PMG course was started on early terms, far before visible tumors appearance. These results (as to W-256 tumors) are presented in a table. As it is can be seen, this effect was additive. GTP did not enhance  $\alpha$ -DFMO-induced retardation effect, regardless of  $\alpha$ -DFMO have been applied on early or late terms.

Group of animals	Control	GTP	PMG	GTP + PMG
Tumor mass (g, M $\pm$ m)	18.5 $\pm$ 2.4	12.3 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 1.4	4.2 $\pm$ 1.2

On a background of tumor growth retardation, combined GTP and PMG application led to essential increase of the NF- $\kappa$ B subunits (p50, p52, c-rel proteins) and I $\kappa$ B $\alpha$  expression in the nuclei of W-256 cells. At the same time, expression of the p65-subunit of NF- $\kappa$ B, as well as its phosphorylated form, was diminished. Combined effect of PMG and GTP on p65, p52 and c-rel expression was additive, and on I $\kappa$ B $\alpha$  expression – some less than additive. These modulations may lead to decrease of classic NF- $\kappa$ B (p50/p65) activity and diminish expression of the genes being dependent on this. Expression measurements of the NF- $\kappa$ B-dependent genes' (*c-myc*, *bcl-xl*, *cox-2*, *inos*) proteins in the tumor cells have confirmed this hypothesis. Combined PMG and GTP application was shown to cause more strong decrease of *c-myc* and *bcl-xl* oncogenes' proteins expression, as well as ODC (a key enzyme of PA biosynthesis) than each of these agents alone. Also, combined PMG and GTP application, in difference with PMG alone, led to diminished expression of *cox-2* and *inos* genes' proteins. At the same time, combined PMG and GTP application strengthened increase of p53 protein – a product of a tumor suppressor gene p53.

**Conclusion.** Thus, our studies show GTP essentially strengthen antitumor effect of an inhibitor of PA biosynthesis and interconversion (PMG). Their additive antitumor effect is mediated by their additive/synergic effect on the PA-, NF- $\kappa$ B- and p53-dependent signal pathways. These data show prospective GTP application to treatment of cancer patients, especially in combinations with the inhibitors of PA metabolism.



## ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБІНАНТНОГО БЕТА-ДЕФЕНСИН-2 ЛЮДИНИ (hBD-2) ТА ПОЛІКЛОНАЛЬНИХ АНТИ-hBD-2-АНТИТІЛ

*Зелений С.Б., Шестакова Т.С., Журавель О.В., Солдаткіна М.О., Погребний П.В.*

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.П.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна  
e-mail: pogrebnoy@onconet.kiev.ua

**Актуальність:** Бета-дефенсин-2 (hBD-2) – один з представників родини невеликих катіонних біологічно-активних пептидів, що володіють антимікробною та хемотактичною активностями та продукуються епітеліальними клітинами людини у відповідь на бактеріальну інфекцію. Експресія гена hBD-2 також індукується в деяких типах злоякісних пухлин, але біологічний зміст такої індукції та її механізми при злоякісній трансформації ще практично не досліджені. Для проведення досліджень ролі hBD-2 при інфекційних та онкологічних захворюваннях людини необхідним інструментом є рекомбінантний пептид hBD-2 та поліклональні анти-hBD-2-антитіла.

**Мета:** Отримати рекомбінантний hBD-2, оптимізувати умови його продукції, розробити методи його очистки та отримати анти-hBD-2-антитіла, використовуючи рекомбінантний пептид в якості антигена.

**Методичні підходи:** молекулярно-біологічні методи - полімеразна ланцюгова реакція, клонування, експресія в бактеріальній культурі; методи препаративної біохімії; імунологічні та імунохімічні методи.

**Результати:** Для отримання рекомбінантної молекули hBD-2 було обрано метод експресії пептиду у вигляді злитого білку з глутатіон-S-трансферазою. Клонування фрагмента кДНК, що кодує активну молекулу hBD-2, було проведено в вектор pGEX-2T по сайтах BamHI та EcoRI. Для цього було ампліфіковано фрагмент кДНК з 93 по 218 нуклеотид мРНК [gb|Z71389]. Ця послідовність мРНК кодує активний пептид hBD-2 та містить стоп-кодон (215-218). Після обробки рестриктазами BamHI та EcoRI фрагмент кДНК hBD-2 було лігровано в pGEX-2T вектор в позиції 931 (BamHI) та 941 (EcoRI) послідовності вектора. Отриманою конструкцією було трансформовано клітини *E. coli* штаму XL-Gold. Відбір рекомбінантних клонів проводився за допомогою рестриктного аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції Scal. В ряді експериментів оптимізовано умови продукції рекомбінантного злитого білку. Очистку злитого білку проводили згідно протоколу GST-fusion system з використанням афінної хроматографії на GST-сефарозі, з наступним протеолізом злитого білка тромбіном та очисткою дефенсина шляхом зворотньофазової хроматографії на носії SepPackC18. Ступінь чистоти білка визначали електрофоретично методом SDS гель-електрофореза в градієнті ПААГ. Вихід очищеного рекомбінантного білка складав 200 мкг з 100 мл вихідної бактеріальної культури. Встановлено, що рекомбінантний пептид володіє антимікробною активністю проти грам-негативних (*Pseudomonas aeruginosa*) та грам-позитивних бактерій (*Bacillus subtilis*) та має властивості хемотактика для лейкоцитів людини. Для отримання поліклональних анти-hBD-2-антитіл було отримано зшиті молекули дефенсину між собою з метою підвищення імуногенності hBD-2. Для цього було використано метод аутокон'югації з застосуванням диметілацетаміда і малеїмідного ефіра. Імунізацію лабораторних тварин таким кон'югованим пептидом проводили за загальноприйнятною схемою. Методом ELISA було встановлено фінальний титр сироватки крові (1:4000), потім була отримана сироватка крові, з якої було виділено поліклональні антитіла до hBD-2 з використанням стандартної методики висолування насиченим розчином  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та афінної хроматографії на носії Protein G Sepharose. Активність антитіл на кожній стадії очищення контролювали методом ELISA. Дослідження специфічності та можливостей застосування отриманих антитіл показали наступне: 1) їх робоча концентрація складає 1,00  $\mu\text{g}/\text{мл}$ ; 2) антитіла впізнають як рекомбінантний бета-дефенсин-2 людини, так і нативний дефенсин (виділений біохімічними методами з середовища інкубації клітин лінії A431, індукованих ліпополісахаридом *P.aeruginosa* чи ЕФР); 3) антитіла можуть бути застосованими в імуноферментному методі (ELISA) та Вестерн-блот-аналізі; 4) антитіла є специфічними і не впізнають інші антигени (наприклад, рекомбінантний бета-дефенсин-2 миші).

**Висновки:** Таким чином, нами було отримано продуцент рекомбінантного бета-дефенсина-2 людини, розроблено схему очистки дефенсина зі збереженням його біологічної активності та отримано специфічні поліклональні анти- hBD-2-антитіла, що можуть бути використаними в лабораторних дослідженнях для оцінки вмісту дефенсину в біологічних розчинах.



## **PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT HUMAN BETA-DEFENSIN-2 (hBD-2) AND POLYCLONAL ANTI-hBD-2-ANTIBODIES**

*Zeleniy S.B., Shestakova T.S., Zhuravel O.V., Soldatkina M.O., Pogribniy P.V.*

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
e-mail: pogrebnoy@onconet.kiev.ua

**Background:** Human beta-defensin-2 (hBD-2) is a representative of a large family of small cationic biologically active peptides possessing antimicrobial and chemotactic activities that is produced by human epithelial cells in a response to bacterial infection. Also, expression of hBD-2 gene is induced in some types of malignant tumors, but the role and the mechanisms of hBD-2 expression in cancer tissues remains poorly studied yet. To analyze the role of hBD-2 during infectious diseases and cancer, recombinant peptide and specific anti-hBD-2-antibodies are considered as important instrument of research.

**Aim:** The aim of the work was to produce recombinant hBD-2, optimize its production, develop the methods of its purification and generate anti-hBD-2-antibodies.

**Methods:** Cloning, expression in bacterial system, PCR; biochemical methods; immunological and immunochemical methods.

**Results:** hBD-2 was expressed as a fusion protein with glutathione-S-transferase (GST), after cloning in pGEX-2T vector and transformation of *E. coli* XL-Gold cells. Recombinant clones were selected with the use of restriction analysis, and the production of fusion protein was optimized. Recombinant defensin was purified by affine chromatography on GST-sepharose, proteolysis of fusion protein with thrombin and separation of proteolytic products on reverse phase carrier SepPack C18. The purity of hBD-2 was analyzed by SDS-electrophoresis; its production yields 200 µg per 100 ml of bacterial culture. We have shown that recombinant protein is active against gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) and gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*) and possesses chemotactic activity for human leucocytes. For generation of anti-hBD-2 polyclonal antibodies, hBD-2 molecules were autoconjugated with the use of dimethylacetamide and maleimide ester, and used for immunization of laboratory animals. The final titers of blood serum were 1:4000, then antibodies were purified from blood serum by standard scheme with the use of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation and affine chromatography on Protein G Sepharose. Characteristics of anti-hBD-2-antibodies were as follow: 1) their working concentration is 1.00 µg/мл; 2) antibodies recognize recombinant hBD-2 and also native beta-defensin-2 isolated from culture medium of A431 cells induced by LPS of *P.aeruginosa* or EGF; 3) antibodies may be used in ELISA and Western-blot analysis; 4) antibodies are specific and possess no cross-reactivity with other antigens (in particular, recombinant murine beta-defensin-2).

**Conclusion:** Producer of recombinant hBD-2 was obtained, the method of purification of biologically active hBD-2 has been developed, and specific polyclonal anti-hBD-2 antibodies appropriate for use in laboratory studies are generated.





## МЕЛАМИНОВАЯ СОЛЬ БИС(ОКСИМЕТИЛ)ФОСФИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Жигачева И.В.<sup>1</sup>, Евсеенко Л.С.<sup>1</sup>, Бурлакова Е.Б.<sup>1</sup>, Фаттахов С.Г.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Казанского научного центра Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия  
e-mail: zhigacheva@mail.ru

В настоящее время регуляторы роста растений широко применяются в сельскохозяйственном производстве. Их применение способствует предотвращению полегания зерновых культур, ускоряет прорастание семян и созревание плодов, повышает устойчивость растений к абиотическому стрессу [1,2]. Одним из таких регуляторов роста является меламинавая соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты. Обработка семян с/х растений (рожь, пшеница, горох, картофель, просо и др.)  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-8}$  % водным раствором препарата приводит к значительному повышению энергии прорастания (5 – 25%) семян, способствует увеличению урожайности и вегетативной массы растений. Кроме того, предпосевная обработка семян препаратом на 15-25% повышает биосинтез хлорофилла и каротиноидов [3].

Синтетические процессы требуют значительных энергозатрат, которые напрямую связаны с активацией энергетического обмена и в первую очередь с изменением энергетики митохондрий. В связи с этим исследовали влияние препарата на энергетику митохондрий, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы. Опыты по изучению антистрессовых свойств меламинавой соли бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты проводили на проростках гороха.

Введение меламинавой соли бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты в среду инкубации приводит к изменению энергетики митохондрий, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы. При этом наиболее эффективными являются концентрации препарата  $4 \times 10^{-12}$ ,  $4 \times 10^{-18}$  –  $4 \times 10^{-21}$  М. В этих концентрациях препарат стимулирует скорости окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии АДФ на 36-44%. Величина дыхательного контроля по Чансу при этом возрастает с  $2.3 \pm 0.1$  до  $2.95 \pm 0.02$ . Препарат во всех исследуемых концентрациях не влияет ни на максимальные скорости, ни на величину дыхательного контроля по Чансу при окислении сукцината что, вероятно, свидетельствует об адаптивном характере его действия.

Митохондрии запасующих органов характеризуются довольно низкими скоростями окисления NAD-зависимых субстратов [4]. Стимулируя рост активности NAD-зависимых дегидрогеназ, меламинавая соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты, по-видимому, способствует активации энергетических процессов в клетке, обеспечивает высокую энергию прорастания семян и антистрессовые свойства препарата, которые проявляются в опытах на целых растениях. Обработка семян гороха  $1 \times 10^{-8}$  % водным раствором препарата приводит к стимуляции роста побегов (18--24%) как у растений контрольной группы, так и у растений, находящихся в условиях недостаточного увлажнения, но всхожесть обработанных меламинавой солью бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты, и необработанных семян сильно отличается. Так, в условиях недостаточного увлажнения на 46% снижается всхожесть семян контрольной группы растений, в то время как всхожесть семян, обработанных водным раствором бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты почти не меняется. Более того, препарат стимулирует рост корней проростков в условиях недостаточного увлажнения, что имеет большое приспособительное значение.

На основании приведенных данных можно предположить, что антистрессовые свойства препарата обусловлены активацией энергетических процессов в клетке. Его действие зависит от функционального состояния митохондрий. Возможно, стимулируются те участки дыхательной цепи, активность которых была несколько снижена по ряду причин. В случае митохондрий из корнеплодов сахарной свеклы снижение скоростей окисления малата, возможно, обусловлено высокой концентрацией сахаров в клетке

### Литература:

1. Чалова Л.И., Озерецковская О.Л. В кн. «Биохимия иммунитета, покоя, старения растений» / Ред. И.В. Березин. М.: Наука, 1984. С.41–57.
2. Король В.В., Кириллова И.Г., Пузина Т.И. . Изменение гормонального баланса и физиологических процессов растения картофеля при обработке регуляторами роста и микроэлементами // Вестник Башкирского университета. 2001. №2. С.84–86.
3. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. в сб «13 Международная конференция по химии соединений фосфора. Тезисы докладов» С.Петербург, 2002., 80
4. Шугаев А.Г., Выскребенцева Э.И. Влияние ротенона и экзогенного НАД на окисление малата митохондриями, выделенными из корнеплодов сахарной свеклы на различных этапах онтогенеза растений // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 259--267.



## MELAMINE SALT OF BIS(OXYMETHYL)PHOSPHONIC ACID AND ENERGY STATUS OF PLANT CELL

Zhigacheva<sup>1</sup> I.V., Evseenko<sup>1</sup> L.S., Burlakova<sup>1</sup> E.B., Fattakhov<sup>2</sup> S.G.

<sup>1</sup> Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Research Center, Russian Academy of Science, Kazan, Russia  
e-mail:zhigacheva@mail.ru

At present, plant growth regulators are widely used in agriculture. The use of plant growth regulators prevents grain crops from lodging, promotes seed germination and fruit ripening, enhances the resistance of plants to the abiotic stress [1, 2]. Melamine salt of bis(oxyethyl)-phosphonic acid is one of the plant growth regulators. The treatment of seeds of agricultural plants (rye, wheat, peas, potatoes, millet and others) with a  $1 \times 10^{-8}\%$  aqueous solution of the preparation results in a significant increase in the energy of germination (by 5 to 25%) and in enhancement of crop yield and a vegetative mass of plants. Also, the preseedling processing of seeds with the preparation increases the biosynthesis of chlorophyll and carotenoids by 15-25% [3].

Processes of synthesis require considerable energy expenditures that are directly associated with activation of the energy exchange and, first of all, with changes in the energy of mitochondria. Therefore, we studied the effect of the preparation on the energy of mitochondria isolated from sugar beet roots. To study the antistress properties of melamine salt of bis(oxyethyl)-phosphonic acid, the experiments were performed in pea germs.

The introduction of melamine salt of bis(oxyethyl)-phosphonic acid into the incubation medium results in changes in the energy of mitochondria isolated from sugar beet roots. The most effective concentrations are  $4 \times 10^{-12}$ ,  $4 \times 10^{-18}$  –  $4 \times 10^{-21}$  M. Within this concentration range, the preparation promotes the oxidation rate of NAD-dependent substrates in the presence of ADP by 36-44%. The Chance respiratory control value increases from  $2.3 \pm 0.1$  to  $2.95 \pm 0.02$ . Within the entire concentration range, the preparation has no effect on the maximum rate nor on the Chance respiratory control value upon the oxidation of the succinate, which fact is evidence for an adaptive character of the effect thereof.

Mitochondria of storage organs are characterized in sufficiently low oxidation rates of NAD-dependent substrates [4]. By promoting the growth of activity of NAD-dependent dehydrogenases, melamine salt of bis(oxyethyl)-phosphonic acid evidently promotes the activation of the energy processes in cell and provides for a high energy of seed germination and the antistress properties of the preparation; these properties manifest themselves in the experiments in whole plants. The treatment of pea seeds with a  $1 \times 10^{-8}\%$  aqueous solution of the preparation promotes the growth of shoots (by 18-24%) both of plants of the control group and of plants grown under conditions of inadequate watering; however, the germination of seeds treated with melamine salt of bis(oxyethyl)-phosphonic acid and of those untreated differs significantly. In particular, under conditions of inadequate watering, the germination of control seeds decreases by 46%, whereas the germination of seeds treated with an aqueous solution of bis(oxyethyl)-phosphonic acid is nearly unchanged. Moreover, the preparation promotes the growth of germ roots under conditions of inadequate watering, which fact is of great adaptive importance.

In view of the above data, it is safe to conclude that the antistress properties of the preparation are accounted for by activation of the energy processes in cell. The effect of the preparation depends on the functional status of mitochondria. Evidently, stimulation is provided in those portions of the respiratory chain, wherein the activity was decreased for some reasons. For sugar beet root mitochondria, the decrease in the malate oxidation rate may be due to a high concentration of sugars in cell.

### References:

1. Chalova L.I., Ozeretskova O.L. In "Biokhimiya immuniteta, pokoya, stareniya rastenii" [Biochemistry of plant immunity, dormancy, and ageing]/ Ed. I.V. Berezin, M.: Nauka, 1984, pp. 41-57.
2. Korol V.V., Kirillova I.G., Puzina T.I. "Izmenenie gormonalnogo balansa i fiziologicheskikh protsessov rasteniya kartofelya pri obrabotke regulyatorami rosta i mikroelementami" [Changes in hormonal balance and physiological processes of potato plants upon treatment with growth regulators and microelements]/Vestnik Bashkirskogo universiteta, 2001, no. 2, pp. 84-86.
3. Fattakhov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. In "13 Intern. Conf. on Chemistry of Phosphorus Compounds: Abstracts", St.-Petersburg, 2002, 80.
4. Shugaev A.G., Vyskrebentseva E.I., "Vliyanie of rotenone i ekzogennogo NAD na okislenie malata mitokhondriami, vydelennymi iz korneplodov sakharnoi svekly nf razlichnykh etapakh ontogeneza rastenii" {Effect of rotenone and exogenic NAD on oxidation of malate by mitochondria isolated from sugar beet roots in various stages of ontogenesis of plants} // Fiziologiya rastenii, 1985, vol. 32, p. 259-267.



## ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ТИРЕОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА МОДИФИЦИРУЕТ УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ У КРЫС

<sup>a</sup> Жуков Д.А., <sup>b</sup> Виноградова Е.П., <sup>b</sup> Каргин А.В., <sup>b</sup> Марков А.Г.

<sup>a</sup> Институт Физиологии им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: katvinog@yahoo.com

<sup>b</sup> Биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Тиреотропин-релизинг-гормон (ТРГ) является гипоталамическим трипептидом pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>. ТРГ стимулирует синтез и секрецию тиреотропина в аденогипофизе, кроме того, известно, что ТРГ оказывает влияние на целый ряд функций в ЦНС. Показано, что ТРГ оказывает анти депрессивное влияние и на человека и на животных (Szuba et al., 2005). У мышей с нарушением гена отвечающего за рецепцию ТРГ наблюдается повышение уровня депрессии и тревоги (Zeng et al., 2007). Внутрижелудочное введение ТРГ уменьшает тревогу и вызванное стрессом повышение уровня кортикостерона (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). Поскольку в настоящий момент неизвестно влияния ультранизких концентраций ТРГ (10<sup>-10</sup> М) на тревожность при интраназальном введении целью нашей работы было изучение таких влияний на уровень тревожности с использованием приподнятого крестообразного лабиринта у крыс после стресса. Интраназальное введение является наиболее удобным методом для введения нейропептидов, которые при других способах введения не проникают через гематоэнцефалический барьер (Illum, 2002).

Раствор ТРГ в концентрации 10<sup>-10</sup> М вводили интраназально в объеме 20 мкл самцам крыс (n=30), животным контрольной группы (n=30) вводили 0,9% NaCl в таком же объеме. Через 15 минут после введения животных подвергали действию 5-ти ударов электрического тока длительностью 3 секунды. Через 4 часа животных тестировали в ПКЛ, уровень тревожности оценивался по времени пребывания в открытых рукавах. Уровень тревожности у животных опытной группы был достоверно ниже по сравнению с контролем. Введение ТРГ не повлияло на двигательную и исследовательскую активность. Через 24 часа животные были протестированы в приподнятом круговом лабиринте, никаких достоверных различий ни по уровню тревожности, ни по локомоторной активности не было выявлено при сравнении крыс опытной и контрольной группы. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что интраназальное введение ТРГ в ультранизких дозах имеет анксиолитический эффект.

### Литература:

1. Gutiérrez-Mariscal, M., de Gortari, P., López-Rubalcava, C., Martínez, A., Joseph-Bravo, P., 2008. Analysis of the anxiety-like effect of TRH and the responses of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 33, 198-313.
2. Illum, L., 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 1-18.
3. Szuba, M.P., Amsterdam, J.D., Fernando, A.T. 3rd, Gary, K.A., Whybrow, P.C., Winokur, A., 2005. Rapid antidepressant response after nocturnal TRH administration in patients with bipolar type I and bipolar type II major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 25,325-30.
4. Zeng, H., Schimpf, B.A., Rohde, A.D., Pavlova, M.N., Gragerov, A., Bergmann, J.E., 2007. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. *Molec. Endocrinol.* 21, 2795-2804.



**INTRANASAL APPLICATION OF A THYROTROPIN-RELEASING HORMONE ATTENUATES STATE-ANXIETY OF THE RATS**

Zhukov D. A.<sup>b</sup>, Vinogradova E. P.<sup>a</sup>, Kargin A. V.<sup>a</sup>, Markov A. G.

<sup>a</sup> Biology Department, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia.  
e-mail: katvinog@yahoo.com

<sup>b</sup> Pavlov Institute of Physiology, Saint-Petersburg, Russia.

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is a hypothalamic tripeptide pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>. TRH stimulates synthesis and secretion of thyrotropin in anterior pituitary. In addition TRH influences many CNS functions. TRH has pronounced acute antidepressive effects in both humans and animals (Szuba et al., 2005). In certain paradigms TRH reduces fear and anxiety behaviors. A strain of mice with targeted deletion of the TRH-receptor gene displayed increased anxiety and depression levels (Zeng et al., 2007). Administration of TRH in cerebral ventriculi reduced anxiety behavior and stress-induced corticosterone rise (Gutierrez-Mariscal et al., 2008). To our knowledge, no studies have been performed to assess the efficacy of ultralow concentrations (10<sup>-10</sup> M) of TRH in treatment of anxiety using the intranasal route of delivery. To address this question, we tested anxiety using an elevated-plus maze (EPM) in rats with TRH intranasal application. Intranasal delivery represents a feasible method for neuropeptides that are not otherwise bioavailable to bypass the blood-brain barrier and exert therapeutic effects in the central nervous system (Illum, 2002).

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) solution (10<sup>-10</sup> M) was administered intranasally in a volume of 20  $\mu$ l to the rats (n=30), in control group (n=30) 0.9% NaCl the same value. 15 minutes after application rats were exposed to five short electric foot-shocks. Four hours later animals were tested in the elevated plus-maze. Anxiety level is inverted time of time spent in open arms. Time spent in open arms was significantly higher in TRH-treated rats compared to vehicle-treated ones. Locomotor activity were unaffected by TRH administration. 24 hours later all animals were tested in elevated zero maze, no significant differences were observed in anxiety and locomotor's activity comparing control and experimental groups. Present results suggest the intranasal administration of TRH in ultralow dose has an anxiolytic effect.

**References:**

1. Gutiérrez-Mariscal, M., de Gortari, P., López-Rubalcava, C., Martínez, A., Joseph-Bravo, P., 2008. Analysis of the anxiety-like effect of TRH and the responses of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 33, 198-313.
2. Illum, L., 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 1-18.
3. Szuba, M.P., Amsterdam, J.D., Fernando, A.T. 3rd, Gary, K.A., Whybrow, P.C., Winokur, A., 2005. Rapid antidepressant response after nocturnal TRH administration in patients with bipolar type I and bipolar type II major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 25,325-30.
4. Zeng, H., Schimpf, B.A., Rohde, A.D., Pavlova, M.N., Gragerov, A., Bergmann, J.E., 2007. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. *Molec. Endocrinol.* 21, 2795-2804.



## ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ СРЕДСТВ

<sup>1,2</sup>Зобов В.В., <sup>1</sup>Резник В.С.

<sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук; Российская Федерация, Казань  
e-mail: zobov@iopc.knc.ru

<sup>2</sup>Казанский государственный университет, Казань, Российская Федерация

Среди более 300 синтезированных четвертичноаммониевых производных урацила, ксантина, хиनाзолидинона и аллоксанина выявлен новый класс высокоактивных ( $pl_{50}=9,0-11,0$ ), «псевдонеобратимых» (неравновесный блок) и высокоизбирательных ингибиторов ацетилхолинэстеразы млекопитающих (АХЭ; соотношение констант ингибирования АХЭ/бутирилхолинэстераза достигает 100.000 крат) с необычно высокой терапевтической безопасностью ( $LD_{50}/ED_{50}=20,0-200,0$  при  $LD_{50}=1,0-1,5$  мг/кг). По избирательности некоторые соединения существенно превосходят BW284c51 - коммерческий эталонный ингибитор АХЭ (Sigma-Aldrich). Для одновременного проявления высокой антиацетилхолинэстеразной активности и терапевтической безопасности необходимы следующие особенности структуры N-гетероциклов (рис. 1): (1) наличие 2,4-диоксо-фрагмента; (2) плоский характер N-гетероцикла и связанные с этим ароматические свойства; (3) пять метиленовых групп между атомами азота N-гетероцикла и аммониевыми группами. Также имеет значение характер заместителей при «аммониевых головках» и при 5-м положении N-гетероциклического фрагмента. Установлено, что концентрация соединения № 547 (рис. 1), вызывающая увеличение постоянной времени спада миниатюрных токов концевой пластинки, характерное для практически полного ингибирования функционального пула АХЭ, в синапсах диафрагмы в 20-100 раз больше, чем в синапсах локомоторных мышц (*m.Extensor Digitorum Longus* и *m.Soleus*; крысы). Внутренние межреберные мышцы крысы, отвечающие преимущественно за выдох, также демонстрируют значительно большую устойчивость к действию соед. № 547, чем локомоторные мышцы и даже диафрагма. Соед. № 547 практически не влияет на АХЭ сердца - разница в константах ингибирования АХЭ гомогенатов сердечной мышцы и *m.EDL* крысы достигает 10.000 крат. У соед. № 547 отсутствует способность к индукции генных мутаций в тестах Эймса «*Salmonella*/микросомы» и «ДНК-репарация». Наиболее активные соединения (рис. 1) на дафниях, коловратках, простейших и одноклеточных водорослях (*Daphnia magna* S., *Thamnocephalus platyurus* - *Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>*, *Heterocypris incongruens* - *Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>*; *Brachionus calyciflorus* - *Rotoxkit F<sup>TM</sup>*, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena thermophila* - *Protoxkit F<sup>TM</sup>*, *Selenastrum capricornutum* - *Algotoxkit F<sup>TM</sup>*) соответствуют категориям «малотоксичных» или «практически нетоксичных» веществ ( $PK_{50}$ дафнии=20-700 мг/л при  $pl_{50}=3,72$  на гомогенатах дафний), что свидетельствует о необычно высокой для ингибиторов АХЭ экологической безопасности; эти биотестеры не могут быть использованы для экстренной биодетекции отравления воды соединениями данного типа. Таким образом, впервые показана принципиальная возможность разработки в классе избирательных ингибиторов АХЭ средств, действующих по механизму синапс-специфического ингибирования АХЭ с минимумом поражающих эффектов на жизненно-важные (дыхание, работа сердца, мозга) и репродуктивно-важные функции. Сферы возможного применения новых соединений включают в себя медицину (средства для диагностики/лечения миастений), ветеринарию (средства для временной и безопасной иммобилизации диких и домашних животных), нейрохимию и нейрофизиологию (эталонные вещества-анализаторы). В частности, начаты работы по изучению возможности формирования на основе соединений типа № 547: (1) пектиновых производных, (2) клатратов с циклодекстринами, глицирризиновой, бетулиновой, бетулоновой кислотами и иными природными соединениями с целью получения нового лекарственного средства для диагностики и лечения миастении, обладающего повышенной терапевтической безопасностью.

соединение № 547:

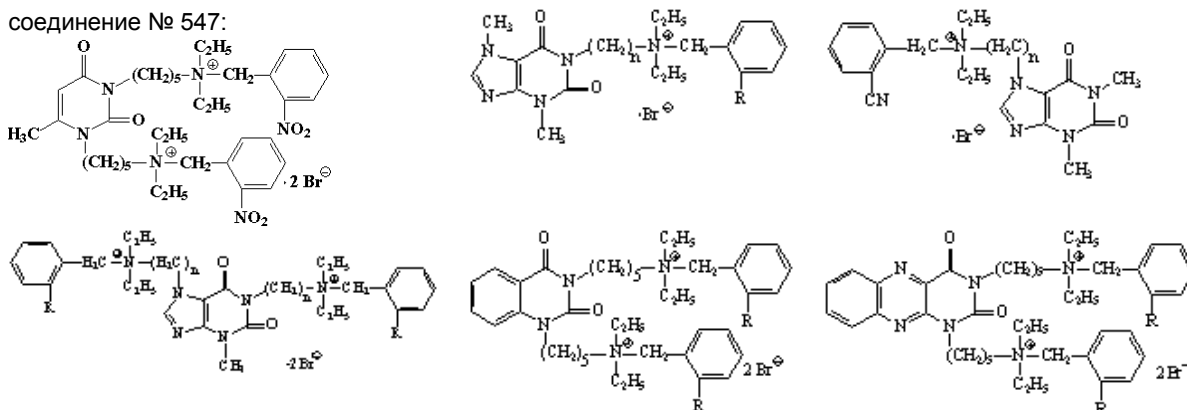


Рис. 1. Структуры соединений ( $n=5,6$ ;  $R=NO_2, CN$ )

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-01137-а, № 07-04-12097-офи, грантом Президента РФ «Ведущая научная школа» НШ-4177.2008.4, Программы № 5 и № 19 ОХНМ РАН.



THE APPROACHES TO THE INCREASE OF SELECTIVITY AND SAFETY  
OF THE ANTICHOLINESTERASE AGENTS

<sup>1,2</sup>Zobov V.V., <sup>1</sup>Reznik V.S.

<sup>1</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation e-mail: zobov@iopc.knc.ru

<sup>2</sup>Kazan State University, Kazan, Russian Federation, zobov@iopc.knc.ru

A new class of highly active ( $pI_{50}=9,0-11,0$ ), "pseudo nonreversible" (unbalanced block) and highly selective mammalian acetylcholinesterase inhibitors (AChE; correlation of inhibition constants AChE/butrylcholinesterase is up to 100.000 times) with unusually high therapeutic safety ( $DL_{50}/DE_{50}=20,0-200,0$  with  $DL_{50}=1,0-1,5$  mg/kg) is found among more than 300 synthesized quaternary-ammonium derivatives of uracil. Some compounds are significantly surpass BW284c51 – commercial etalon inhibitor of AChE (Sigma-Aldrich) in the selectivity properties. For simultaneous display of high antiacetylcholinesterase activity and therapeutic safety the following features of structure N-heterocycle are necessary (Scheme 1): (1) presence 2,4-dioxo-fragment; (2) flat character N-heterocycle and the aromatic properties connected to it; (3) five methyl groups between atoms of nitrogen N-heterocycle and ammonium groups. We have found that the concentration of agent No 547 (Scheme 1), which causes an enhancement of time constant of decrease of miniature endplate current – it is characteristic to practically full inhibition of functional AChE pool –, in diaphragm synapses is 20-100 times bigger than in synapses of locomotory muscles (m.Extensor Digitorum Longus, m.Soleus; rats). The inner intercostal muscles of rats, that are responsible mainly for expiration, also demonstrate a considerably bigger stability to agent No 547 action than locomotory muscles and diaphragm. Agent No 547 doesn't influence practically AChE of heart – the difference between the constants of AChE inhibition in homogenates of cardiac muscle and m.EDL of rats is up to 10.000. Agent No 547 doesn't show an ability to induce gene mutations in Ames tests "Salmonella/microsomes" and "DNA-repair". The most active compounds (Scheme 1) on daphnia, rotifers, protozoa and unicellular algae (*Daphnia magna* S., *Thamnocephalus platyurus* – Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, *Heterocypris incongruens* - Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>; *Brachionus calyciflorus* - Rotoxkit F<sup>TM</sup>, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena thermophila* - Prottoxkit F<sup>TM</sup>, *Selenastrum capricornutum* - Algotoxkit F<sup>TM</sup>) correspond to categories "slightly toxic" or "practically non-toxic" compounds ( $CL_{50}$ daphnia=20-700 mg/l with  $pI_{50}=3,72$  on daphnia homogenates) - this is the evidence of unusually high ecological safety among the AChE inhibitors; these biotesters can't be used for an urgent detection of water poisoning by this type of compounds. Thereby, the principal potential of new compounds development in a class of selective AChE inhibitors which function by the mechanism of synapse-specific inhibition of AChE with minimum of affects on life essential (inspiration, work of heart, brain) and reproduction essential functions is shown at first. A potential scope of the new compounds includes medicine (remedies for diagnostics/therapy of miasthenia), veterinary (compounds for a temporary and safe immobilization of wild and domestic animals), neurochemistry and neurophysiology (etalon-analyzer compounds). In particular, the works on the study of the possibility of formation of: (1) pectine derivatives, (2) clathrates with cyclodextrines, glycyrrhizic, betulinic, betulonic acids and other natural compounds on the basis of agent of No 547 type are started, aimed at the obtaining of new drug for the myasthenia diagnostics and therapy, with increased therapeutic safety.

agent No 547:

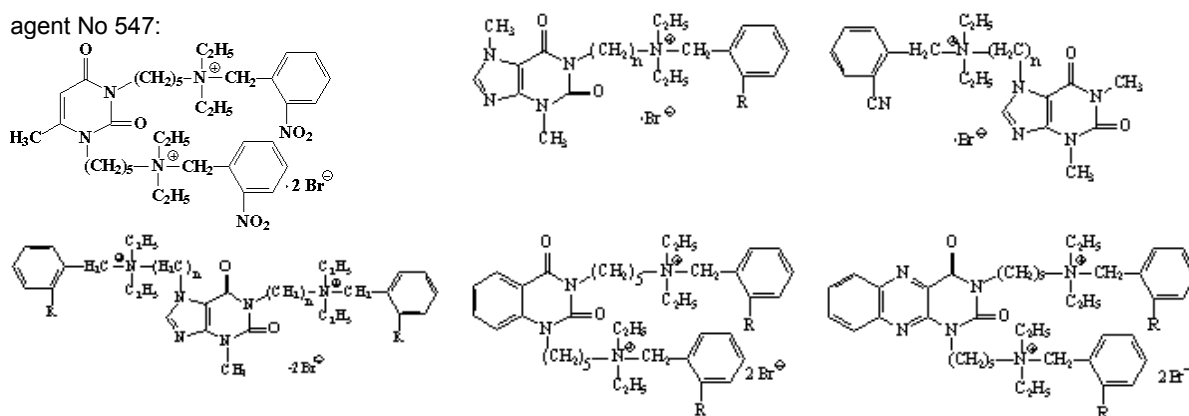


Fig. 1. Structures of chemical compounds ( $n=5,6$ ;  $R=NO_2,CN$ )

The research is supported with grants RFBR No 07-04-01137-a, No 07-04-12097-ofi, with grant of Russian Federation President "The leading scientific school" SS-4177.2008.4, Programs No 5 and No 19 Branch of General and Technical Chemistry of the Russian Academy of Sciences.



## ВИКОРИСТАННЯ ФОТОЛАБІЛЬНИХ ЗАХИСНИХ ГРУП В БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Федоряк О. Д.<sup>1</sup>., Федоряк Д. М.<sup>1</sup>., Дор Т. М.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна  
e-mail: fedoryak\_1@bpcci.kiev.ua

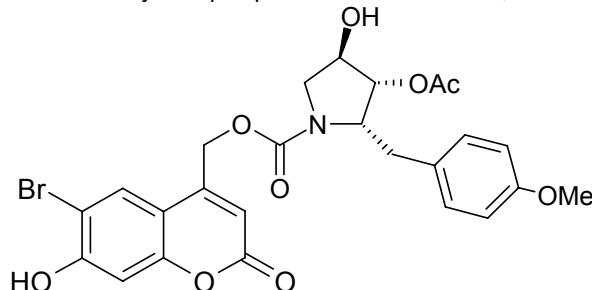
<sup>2</sup>University of Georgia, Athens, GA, USA, e-mail: tdore@uga.edu

При вивченні біологічних процесів на молекулярному рівні необхідний точний зовнішній контроль за цими процесами. Світло представляє собою ідеальний зовнішній контрольний елемент, тому що опромінення можна легко контролювати просторово та в часі, до того ж це неагресивна техніка, яка не завдає шкоди живим клітинам.

Швидке вивільнення біологічно активної сполуки з фотолабільного прекурсора під дією світла в клітині стало стандартним методом, за допомогою якого фізіологи, нейробіологи, біохіміки, клітинні біологи та генетики „включають” той процес, що вивчають. Ідея полягає в тому, що фотолабільна захисна група, ковалентно приєднуючись до біологічних месенджерів, дезактивує їх, після чого такий кон'югат потрапляє в біологічну культуру, або тварину, та вивільняє активну форму ефектора в бажаний час та в бажаному місці після опромінення світлом. Фотолабільні захисні групи використовуються для блокування нейротрансмітерів, іонів кальцію та інших вторинних месенджерів, а також біологічних макромолекул (ДНК, РНК та протеїнів). Такі сполуки широко застосовуються для моніторингу відповіді клітин на різноманітні стимуляції завдяки можливості вивчати швидкі клітинні процеси без втручання дифузійного фактору. Це дуже зручний метод для вивчення кінетики швидких процесів, або просторової гетерогенності біохімічних відповідей в клітині або культурі тканин [1, 2]. За допомогою фотолабільних захисних груп можна здійснювати контроль за активацією дії ліків та фотоактивувати флуорофори. В наш час швидко розвивається нова область досліджень - фотохімічна регуляція функції генів [3].

З метою досягнення часового та просторового контролю за синтезом протеїнів в нейронах ми запропонували блоковану версію відомого інгібітора синтезу протеїнів – анізоміцину. Як фотолабільну захисну групу використали 6-бромо-7-гідроксикумарин [4].

Вивчені фотохімічні властивості синтезованої сполуки та показано, що вивільнений під дією світла анізоміцин може інгібувати синтез білка просторово обмежено, тобто тільки в тій області, що підпадає під дію світла. Ефективність блокованої сполуки перевірена на CHO-клітинах, клітинах HEK293 та нейронах.



Отже, використання N-([6-бромо-7-гідроксикумарин-4-ил]метилоксикарбоніл)-анізоміцину дає можливість проводити специфічне інгібування процесу синтезу білка в наборі клітин з часовою та просторовою точністю.

### Література:

1. McCray J.A., Trentham D.R. Properties and users of photoreactive caged compounds // Annu. Rev. Biophys. Chem.- 1989.- 18.- P. 239-270.
2. Brown E.B, Shear J.B., Adams S.R., Tsien R.Y., Webb W.W. Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation // Biophys. J.- 1999.- 76.- P. 489-499.
3. Young D.D., Deiters A. Photochemical control of biological processes // Org. Biomol. Chem.- 2007.- 5.- P. 999-1005.
4. Goard M., Aakalu G., Fedoryak O.D., Quinonez C., Julien J.St., Poteet S.J., Shuman E.M., Dore T. M. Light-Mediated Inhibition of Protein Synthesis // Chem. Biol.- 2005.- 12.- P. 685-693.



## Biologically Active Substances: fundamental and applied problems

May 25 - 30, 2009, Novy Svet, AR Crimea, Ukraine



### BIOLOGICAL APPLICATION OF PHOTOLABILE PROTECTING GROUPS.

*Fedoryak<sup>1</sup> O.D., Fedoryak<sup>1</sup> D.M., Dore<sup>2</sup> T. M.*

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: fedoryak\_1@bpcci.kiev.ua

<sup>2</sup>University of Georgia, Athens, GA, USA

e-mail: tdore@uga.edu

In order to study biological processes on a molecular level, precise external control over these processes is required. Light represents an ideal external control element because light irradiation can be easily controlled in a spatial and a temporal fashion and this technique is a non-invasive that does not hurt cells.

Photochemically initiated release of biologically active molecule from photolabile precursor in cells is now a standard technique by which physiologists, neuroscientists, biochemists and cell biologists switch on the biological process they study. The idea is that photolabile protecting group covalently coupled to biological messengers, inactivate or "cage" them and then release an active form ("uncage") with a flash of light. Photolabile protecting groups are used to block neurotransmitters, Ca<sup>2+</sup>, nucleotides, proteins etc. This is the excellent way to achieve temporal control over messenger release and examine the fast kinetics or spatial heterogeneity of biochemical responses in cell or tissue culture.

To inhibit protein synthesis with spatial and temporal control, we have developed a photo-releasable anisomycin compound, N-([6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl]methyloxycarbonyl)anisomy-

cin (Bhc-Aniso), that can be removed through exposure to UV light. We have tested the compound's effectiveness with an in vitro protein-translation system, CHO cells, HEK293 cells, and neurons. The photo-released anisomycin can inhibit protein synthesis in a spatially restricted manner, which will enable the specific inhibition of protein synthesis in subset of cells with temporal and spatial precision.





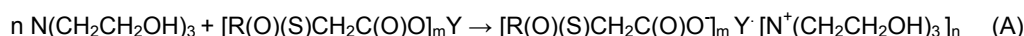
## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЛИ ТРИС-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)АММОНИЯ - ПРОТАТРАНЫ И МАТАЛЛОАТРАНЫ

Адамович С. Н., Мирскова А. Н., Колесникова О. П. \*, Воронков М. Г.

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения Российской Академии наук,  
Иркутск, Россия. e-mail: mirskova@iriocch.irk.ru

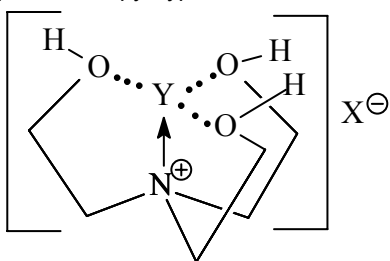
\* ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Реакцией биогенного амина - триэтанолamina с биологически активными арил(гетерил)-(окси)(сульфанил)уксусными кислотами или их солями с макро- и микробиогенными металлами ("элементами жизни") синтезирован новый тип биологически активных веществ - протатраны и металлоатраны (А):



R = замещенные бензол или индол; Y = H, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Fe, Co, Ni, Rh; n = 1, 2; m = 1-3

Соединения такого типа имеют трициклическую атрановую структуру (рис.), установленную методом рентгеноструктурного анализа.



X=R(O)(S)CH<sub>2</sub>C(O)O

Индацетамин снижает содержание провоспалительных цитокинов, атерогенных липопротеидов низкой плотности, пероксидацию липидов, агрегацию тромбоцитов, усиливает репаративные и пластические процессы (снижает на 30-40% язвенные поражения желудка.).

Трис-(2-гидроксиэтил)аммоний 2-метил-феноксиацетат ("трекрезан") является адаптогеном широкого спектра действия. Наряду с этим он проявляет иммуноактивные, противовирусные, противовоспалительные и интерферогенные свойства. С помощью трекрезана на экспериментальных моделях иммунопатологии достигается нормализации иммунитета и кроветворения при аутоиммунных и иммунодефицитных нарушениях. Близкие структурные аналоги трекрезана обладают выраженной канцеростатической и протекто-адаптационной активностью.

Исследована иммунотропная и противоопухолевая активность бикомпонентных комплексов  $\text{MX}_m[(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}]_n$ , n=1,2; m=1-3, полученных на основе солей биомикроэлементов  $\text{MX}_m$  (M=Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Fe, Co, Ni, Cd, Rh, X = Cl, CH<sub>3</sub>COO) и триэтанолamina, а также внутрикомплексных производных триэтанолamina - 1-оксованадатран, боратран, 1-оксо-1-гидроксимолибдатран. С помощью скрининга *in vitro* и *in vivo* выявлены малотоксичные (LD<sub>50</sub> 675-4000, LD<sub>100</sub> 2000-6000 мг/кг внутривенно) высокоэффективные соединения, влияющие на интегральные показатели иммунного ответа - антителообразование, клеточный иммунитет (реакцию гиперчувствительности замедленного типа) и антипролиферативные свойства. Комплексные соединения родия и кобальта проявляют наиболее выраженные избирательные иммуноактивные свойства - способность стимулировать либо гуморальный, либо клеточный иммунный ответ в тестах IgM- антителообразования, ГЗТ на тимусзависимый антиген (эритроцитов барана) у интактных мышей CBF1. В культуре *in vitro* отмечено ингибирование спонтанной, ConA-, PWM-индуцированной пролиферации клеток селезенки интактных мышей. 1-Оксованадатран проявляет антипролиферативную активность в отношении лимфоидных клеток иммунной системы от интактных мышей, в отношении клеток опухолей меланомы B16 и лимфолейкоза L1210.

### Литература:

1. Воронков М.Г., Колесникова О.П., Расулов М.М., Мирскова А.Н. // Хим.-фарм.Ж.2007.Т. 41. № 5. С. 13.
2. Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Мирсков Р. Г., Воронков М.Г. // ЖорХ 2008. Т. 44. Вып. 10. С. 1501.
3. Колесникова О. П., Мирскова А. Н., Адамович С. Н., Мирсков Р. Г., Кудяева О.Т., Воронков М.Г. // Докл. РАН. 2009. Т. 45. № 4. С.556.
4. Козлов В. А., Колесникова О.П., Тузова М.Н., Мирскова А. Н., Левковская Г.Г. Иммуномодулятор. Пат. 2108100 РФ. (1997) РФ // Б.И. 1998. №10.



ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
3-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)-3А,4,6,6А-ТЕТРАГИДРО-5Н-5Л6-ТИЕНО[3,4-Д]ИЗОКСАЗОЛ-5,5-ДИОНА

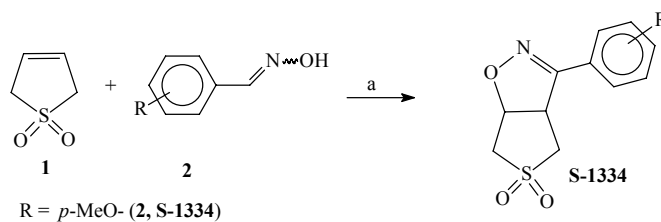
Ермолаева Н. А., Макара Н. С., Цыпышева И. П., Басченко Н. Ж.,  
Зарудий Ф. С., Юнусов М. С.

Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Российская федерация  
e-mail: tsipisheva@anrb.ru

Воспаление представляет собой основной патогенетический компонент большого числа заболеваний и является важнейшей проблемой общей патологии и клиники. С целью коррекции этой реакции организма в настоящее время широко применяются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). Основной проблемой, ограничивающей применение НПВС, являются побочные эффекты, ухудшающие качество жизни больного и иногда значительно повышающие стоимость лечения. В связи с этим актуальной задачей является синтез и фармакологические исследования новых противовоспалительных средств, которые обладают большей эффективностью, избирательностью и имеют наименьшие побочные явления.

Имеющиеся литературные данные о высокой противовоспалительной активности гетероциклических систем, содержащих сульфоксидный и сульфоновый фрагменты [1] послужили основанием для проведения исследовательских работ по разработке методов синтеза аннелированных с изоксазольным фрагментом бициклических производных тиолана.

Синтез аннелированных бициклических структур на базе тиолен-1,1-диоксидов обычно осуществляют в несколько стадий, исходя из соответствующих галоидпроизводных [2]. Мы предлагаем одностадийный метод, основанный на 1,3-диполярном циклоприсоединении нитрилоксида **2** к тиолен-1,1-диоксиду **1** [3], приводящий к получению 3-(4-метоксифенил)-3а,4,6,6а-тетрагидро-5н-5л6-тиено[3,4-д]изоксазол-5,5-диона **S-1334**.



a) 0.8 М водный раствор NaOCl, ультразвуковое диспергирование, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5° С

Исследование противовоспалительной активности образца **S-1334** проводили на каррагениновой модели воспаления на 18 беспородных белых мышах (трех группах по 6 голов в каждой). Одна группа животных была контрольной. Суспензию исследуемого вещества в смеси вода-ДМСО в дозе 1.85 г/кг и препарат сравнения (ортофен) в дозе 8 мг/кг вводили зондом в желудок. Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3 часа после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически).

Противовоспалительный эффект в % для образца **S-1334** составил 53.3 ± 4.2, для ортофена – 44.2 ± 1.7 и для группы контроля – 71.2 ± 2.1. Таким образом, при использовании образца **S-1334** воспалительный эффект менее выражен, чем у контроля и сравним с ортофеном.

Выраженность отека, %	S-1334	Ортофен	Контроль
	53,3 ± 4,2	44,2 ± 1,7	71,2 ± 2,1
Угнетение воспаления, %	13,9	27,5	-

Также определен класс токсичности образца **S-1334**. В эксперименте на беспородных белых мышах (10 голов) в дозе 8000 мг/кг, вводимой зондом в желудок, образец **S-1334** не вызывает гибели животных через 24 часа. По степени действия на организм образец **S-1334** относится к четвертому классу опасности – малоопасное вещество по ГОСТ 12.1.007-76 (1999).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что исследуемое вещество **S-1334** в дозе 1,85 г/кг обладает выраженной противовоспалительной активностью. Воспалительная реакция при применении **S-1334** на 25% менее выражена, чем у контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для Ведущих научных школ № 1725.2008.3.

**Литература:**

- Gupta S. P., Babu M. S., Sowmya S. // Bioorg. Med. Chem. – 1998. – V. 6. – P. 2185.
- Chou T.-S., Tsai C.-Y., Lee S.-J. // J. Chinese Chem. Soc. – 1997. –V. 44. – P. 299.
- Ермолаева Н.А., Ямилева З.З., Гайзетдинов Р.Ю., Цыпышева И.П., Юнусов М.С. // Современные тенденции в органическом синтезе и проблемы химического образования: тез. докл. IV международной молодежной конференции по органическому синтезу. – СПб. - 2005. – С. III-76.



## НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА И ПЛАТИНЫ, БИОКОНЬЮГАТЫ И НАНОКОМПОЗИТЫ НА ИХ ОСНОВЕ УБИВАЮТ КЛЕТКИ РАКА ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Эстрела-Льопис<sup>1</sup> В.Р. \*, Бородинова<sup>1</sup> Т.И., Трегубова<sup>2</sup> Н.А., Чевичалова<sup>1</sup> А.В., Олейник<sup>1</sup> А.И.

<sup>1</sup> Институт биокolloидной химии им. Ф.Д.Овчаренко НАН Украины, Киев, Украина

<sup>2</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: victorio.estrela@gmail.com

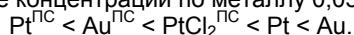
Представлены результаты исследований применения наночастиц (НЧ) и нанокристаллов золота, наночастиц платины и нанокристаллов хлорида платины как основы для создания новых лекарственных форм в онкотерапии.

Разработаны методы синтеза и созданы биоконъюгаты (БК) золото-полисахариды ( $Au^{ПС}$ ), платина-полисахариды ( $Pt^{ПС}$ ), нанокристаллы хлорида платины с адсорбционным слоем ПС, а также наноконпозиты (НК) на основе НЧ золота и платины с лекарственным препаратом доксорубицином (DOX) и полисахаридами *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3.

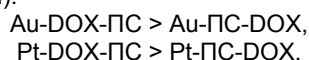
Впервые показано, что наночастицы золота и платины, нанокристаллы  $PtCl_2$  и созданные на их основе биоконъюгаты и наноконпозиты при малых концентрациях инактивируют раковые клетки (на примере клеток рака яичника человека A2780S).

Предложен комплекс исследований эффективности агрегации наночастиц, БК и НК с онкоклетками, включающий в себя методы определения коллоидпоглощения, кинетики гетерокоагуляции и кинетики цитотоксического эффекта. Показано, что с поверхностью одной клетки рака яичника человека A2780S агрегируют  $1,2 \cdot 10^3 \div 2,5 \cdot 10^4$  частиц  $Au^{ПС}$  (при изменении концентрации нанозоля золота в интервале  $C_{Au} < 0,023 \div 0,185 >$  мМ) и  $6,9 \cdot 10^4 \div 1 \cdot 10^6$  частиц  $Pt^{ПС}$  (при изменении концентрации нанозоля платины в интервале  $C_{Pt} < 0,185 \div 0,65 >$  мМ). Показано, что характерное время агрегации опухолевых клеток с НЧ  $Au^{ПС}$  составляет 10-15 мин., с НЧ  $Pt^{ПС}$  – 20-25 мин. Показана тождественность морфологических изменений при 30- и 60-минутных экспозициях нанокристаллов  $PtCl_2$  с такими клетками, выраженный цитотоксический эффект обеспечивается за 30 мин. контакта. Цитотоксический эффект для НЧ  $Au^{ПС}$  непрерывно возрастает в течение первого часа контакта, а для НЧ  $Pt^{ПС}$  достигает насыщения за первые 25 мин.

В опытах *in vitro* исследован индекс токсичности  $IC_{50}$  (концентрация, при которой погибает не менее 50% онкоклеток) синтезированных биоконъюгатов и наноконпозитов. Показано, что  $IC_{50}$  наночастиц и биоконъюгатов находятся в интервале концентраций по металлу  $0,05 \div 0,2$  мМ и возрастают в ряду:



Для наноконпозитов на основе наночастиц золота или платины, а также доксорубицина и полисахаридов показано (контроль – изменение ультраструктуры клетки A2780S, электронная микроскопия), что НК с доксорубицином во внутреннем адсорбционном слое (под внешним слоем полисахаридов) более токсичны, чем аналогичные НК с доксорубицином во внешнем адсорбционном слое (поверх адсорбционного слоя ПС на НЧ):



При сопоставимых по токсичности эффектах концентрация доксорубицина, вводимого с НК, примерно на два порядка меньше, чем при обычном его введении.

Получено экспериментальное (просвечивающая электронная микроскопия - ПЭМ) подтверждение проникновения НЧ и нанокристаллов  $PtCl_2^{ПС}$  в клетку путем эндоцитоза. По данным ПЭМ установлены характерные признаки патологических изменений в ультраструктуре клеток A2780S, под влиянием синтезированных биоконъюгатов и наноконпозитов: образование в подкортимальном слое цитоплазмы многочисленных вторичных лизосом (фаголизосом) и вакуолей, расширение мембран комплекса Гольджи и канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума, разрушение клеточной поверхности вследствие деполимеризации актинового цитоскелета.

Впервые показана возможность применения нанокристаллов золота для визуализации раковых клеток простым методом оптической (темное поле) микроскопии.



## КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ПОВЕСЕП» (КРЕМ, 6%) ПРИ МЕСТНОМ ЛЕЧЕНИИ У БОЛЬНЫХ С ПОВЕРХНОСТНЫМИ ДЕРМАЛЬНЫМИ ОЖОГАМИ

Козинец Г.П., Осадчая О.И., Боярская А.М., Цыганков В.П., Назаренко В.Н.

Национальная Медицинская Академия последипломного образования им. П.Л. Шупика  
Городская клиническая больница №2, Киев, Украина

Основной причиной летальности при тяжелых ожогах являются гнойно-септические осложнения в сочетании с эндогенной интоксикацией гистогенного и микробного происхождения, основным источником которых является зона термического поражения. При этом риск развития раннего сепсиса (на 4-5 сутки после травмы) резко возрастает при ожогах свыше 10-15% поверхности тела. Характерной является высокая стойкость высеваемой из ожоговых ран микрофлоры к распространенным антибиотикам. При этом по мере длительности применения препаратов, которые содержат антибиотики, резистентность микрофлоры к ним растет. В этой связи, применение адекватного местного лечения ожогов определяет возможность снижения большого количества осложнений ожоговой болезни.

В связи с этим, целью работы было изучение клинической эффективности препарата "Повисеп" в лечении больных с поверхностными дермальными ожогами

«Повисеп» является препаратом в состав которого входит повидон-йодный комплекс (0,06 г на 1г крема), который представляет собой водорастворимое, комплексное соединение йода с синтетическим нетоксичным полимером поливинилпирролидона. При этом в соединении с кожей из комплекса выделяется ионизированный йод, который обуславливает высокую бактерицидную и окислительную активность данного препарата. Широкий спектр действия препарата «Повисеп» характеризуется выраженным бактерицидным эффектом относительно грам-положительной, грам-отрицательной и анаэробной микрофлоры и вирусов. Препарат применялся для местного лечения в составе комплексной терапии острого периода ожоговой болезни.

Основную группу составили 15 больных с ожогами от 3 до 12% поверхности тела II степени в возрасте от 16 до 55 лет. Для исследования были отобраны больные с поверхностными дермальными ожогами, которым по различным причинам не было выполнено раннее хирургическое лечение. Препарат "Повисеп" применялся с 1-2 суток после травмы до полной эпителизации ожоговых ран. 4 больным препарат был применен с 4-5 суток при развитии инфекционно-воспалительного раневого процесса. Контрольную группу составили 10 больных с поверхностными дермальными ожогами от 5 до 11% поверхности тела в возрасте от 18 до 50 лет, которым также не было выполнено раннее хирургическое лечение и для местного лечения использовался препарат "Иодобак".

В качестве специальных методов исследования были использованы: НСТ-тест для нейтрофильных гранулоцитов капиллярной крови из зоны ожога и периферической крови как показатель их функциональной активности, метод раневых отпечатков по Покровской-Штейнберг как показатель течения раневого процесса, показатели цитолитической активности аутологичной сыворотки периферической крови по отношению к собственным лейкоцитам.

Местное лечение ожоговых ран препаратом «Повисеп» (крем, 6%) обеспечивает благоприятное развитие клеточно-опосредованных реакций сосудистой фазы воспалительной реакции по фагоцитарному типу с изменением цитологического составляющего раневого секрета, который оказывается в снижении дегенеративно измененных нейтрофильных гранулоцитов.

Применение препарата "Повисеп" (крем, 6%) предопределяет значительное уменьшение уровня микробной обсемененности ожоговых ран со снижением резистентности раневой микрофлоры к антибиотикам, что создает условия для сохранения функциональной активности фагоцитирующих клеток в зоне поражения. На 12-16 сутки определенно снижение количества микробных тел на 1 грамм ткани до  $10^3$  относительно исходных значений ( $10^4$ - $10^5$  микробных тел на 1 грамм ткани).

Установлено изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической и капиллярной крови зоны ожоговой раны, которое было связано со снижением спонтанного и увеличением стимулированного липополисахаридом *E.coli* НСТ-теста. Полученные результаты свидетельствуют, что применение исследуемого препарата способствует сохранению активности фагоцитирующих клеток на субкомпенсированном уровне, определяя повышение их целенаправленности функционирования и снижение риска развития и генерализации инфекционных осложнений.

Препарат не проявлял токсические свойства, что подтверждалось лабораторными исследованиями цитолитической активности аутологичной сыворотки крови по отношению к собственным лейкоцитам.

Таким образом, препарат "Повисеп" (крем, 6%) рекомендуется для местного лечения дермальных поверхностных ожогов площадью до 10 – 12% поверхности тела при контаминации ран условно патогенной микрофлорой и госпитальными штаммами, стойкими к антибиотикам. Исследование препарата "Повисеп" (крем, 6%) показали, что он является эффективным антисептическим средством при местном лечении пострадавших с поверхностными дермальными ожогами, характеризуется хорошей переносимостью больными, отсутствием побочных эффектов и осложнений, способствует сохранению факторов местной антимикробной резистентности и благоприятному течению раневого процесса. При использовании препарата "Повисеп" побочных проявлений не наблюдалось. Использование его для местного лечения позволяет обеспечить улучшение течения раневого процесса, уменьшения количества местных инфекционных осложнений, сократить длительность заживления ран на 35%.



## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ В КУПИРОВАНИИ ОСТРОЙ БОЛИ В НИЖНЕЙ ЧАСТИ СПИНЫ (БНС) КОМБИНАЦИЕЙ ДИКЛОФЕНАКА С ВИТАМИНАМИ ГРУППЫ В В СРАВНЕНИИ С МОНОТЕРАПИЕЙ ДИКЛОФЕНАКОМ

*Шуба Н.М., Воронова Т.Д., Калугина А.А., Турманидзе Д.Г.*

Национальная Медицинская Академия последипломного образования им. Л.П.Щурика

Среди пациентов обращающихся за помощью к врачам различного профиля – терапевтам, невропатологам, ревматологам большое место занимает группа больных с различными формами дорсопатий (патологии позвоночника на всех его уровнях – от шейного до крестцового). Наиболее часто встречающимся вариантом дорсопатий на сегодняшний день – синдром боли в нижней части спины (ЛОН ВАСК РАИИ, люмбалгия). Под синдромом боли в нижней части спины (БНС) понимают боль, локализованную между 12 парой ребер и ягодичными складками. Говоря о распространенности данного синдрома можно сказать, что она достигла уровня эпидемии в странах с высоким экономическим уровнем. Популяционные исследования выявили связь БНС с такими факторами, как пол, возраст, осанка, мышечная сила, подвижность позвоночника. Широкое распространение БНС, в том числе у лиц молодого и среднего трудоспособного возраста, обуславливает большое социально-экономическое значение данной проблемы. В связи с этим было проведено исследование, целью которого явилось изучить эффективность и переносимость диклофенака с витаминами группы В у больных с БНС в сравнении с монотерапией диклофенаком.

В данное исследование было включено 60 пациентов с первичным острым БНС, из них 35 женщин и 25 мужчин в возрасте от 23 до 75 лет. Всем больным были проведены рентгенографическое исследование пояснично-крестцового отдела позвоночника, общий анализ крови и мочи. С целью верификации диагноза использовали критерии, предложенные американским колледжем ревматологов (Нью-Йорские критерии).

Все пациенты были разделены на 2 группы по 30 человек в каждой: I группа получала МЕГАФЕН ПЛЮС (диклофенак 75 мг с лидокаином 20 мг) и НЕРВИПЛЕКС (витамины группы В - тиамин гидрохлорида (В1) 100мг, пиридоксин гидрохлорида (В6) 50 мг, цианкобаламина (В12) 1000мкг) в/м 1 раз в сутки 3 дня (препараты фирмы Jaysons Pharmaceuticals LTD.) II группа (контрольная) получала только МЕГАФЕН ПЛЮС в/м 1 раз в сутки в течение 3-х дней. Оценка эффективности терапии проводилась с использованием визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) боли до и после лечения и Мак-Гилловский болевой опросник (МРQ).

В результате проведенного исследования было установлено, что интенсивность спонтанной боли в I группе до лечения составляла 58,1 мм, а после - 48,4 мм, т.е. на 9,7 мм (17,1%) меньше, чем до лечения. Индуцированная боль до лечения составляла 73,8мм, после лечения она уменьшилась до 54,8 мм, т.е. на 19 мм (25,7%). Интенсивность боли, как спонтанной, так и индуцированной, в I группе пациентов после лечения значительно уменьшилась. Оценка результатов по данным Мак-Гилловского болевого опросника в I группе показала, что боль на сенсорном, эмоциональном и силовом уровне до лечения составляла 68,6 балла, после - 14,03 балла, т.е., в этой группе больных наблюдалось значительное улучшение психоэмоционального состояния больных (уменьшение силы боли на 54,6 балла, 82,1%). В II группе интенсивность спонтанной боли до лечения составляла 57,3 мм, после - 47,0 мм, т.е. на 10,3мм (17,0%) меньше, чем до лечения. Индуцированная боль до лечения составляла 73,4 мм, после она уменьшилась до 63,4 мм, т.е. на 10мм (13,6%).

Оценка результатов по Мак-Гилловскому болевому опроснику в II группе показала, что боль на сенсорном, эмоциональном и силовом уровне до лечения составляла 67,0 балла, после - 23,8 балла. В этой группе больных уменьшение силы боли составило 43,2 балла (62,4%). Можно считать, что качество жизни исследуемых пациентов улучшилось за счет уменьшения интенсивности индуцированной боли, что приводило к увеличению двигательной активности пациентов и их трудоспособности.

Были отмечены следующие особенности. В I группе интенсивность индуцированной боли снижалась до уровня умеренной боли, в то время как в контрольной она оставалась на уровне сильной боли и после применения лечения. Разницы в изменении интенсивности спонтанной боли после лечения в обеих группах не отмечалось. Интенсивность индуцированной боли в I группе значительно больше снижалась (статистически достоверная разница) больше снижалась, чем в контрольной группой. Говоря о психоэмоциональном состоянии пациентов после лечения, следует отметить, что оно у больных I группы значительно больше улучшалось по сравнению с пациентами II группы ( $P < 0,05$ ) после лечения.

Анализ результатов интенсивности боли в зависимости от ее силы показал, что эффективность применяемой терапии как в I, так и в II группах не зависела от степени выраженности боли. Была отмечена хорошая переносимость препаратов диклофенака с лидокаином и витаминов группы В для купирования острой боли в нижней части спины. Наличие лидокаина и количество раствора препарата (2,0, а не 3,0) обеспечивает его хорошую переносимость и отсутствие болезненности в месте инъекции. Для купирования острой БНС эффективны и комбинация МЕГАФЕН ПЛЮС с НЕРВИПЛЕКСОМ, и монотерапия МЕГАФЕН ПЛЮС. Однако, применение МЕГАФЕН ПЛЮС совместно с НЕРВИПЛЕКСОМ позволили получить более значительное уменьшение индуцированной боли и более значительное улучшение психоэмоционального состояния и трудоспособности пациентов. Следовательно, для купирования острой БНС предпочтительнее применять комбинацию МЕГАФЕН ПЛЮС с НЕРВИПЛЕКСОМ, учитывая их более высокую эффективность в купировании боли и улучшение психоэмоционального состояния больных и их трудоспособности.



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ $\alpha$ -ИФН В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРА, СТИМУЛИРУЮЩЕГО ДОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ IN VITRO

*Храновская Н.Н., Швец Ю.В., Скачкова О.В., Ситыко В.В.*

ГУ "Национальный институт рака", Киев, Украина  
e-mail: khranovska\_natalia@yahoo.com

Применение вакцин на основе дендритных клеток (ДК) является одним из перспективных направлений современной иммунотерапии онкологических больных. Известно, что ДК относятся к одним из основных антигенпрезентирующих клеток человеческого организма. Доказано, что только эти клетки, способны одновременно активировать как первичный, так и вторичный иммунные ответы, в том числе и инициировать формирование эффективного противоопухолевого иммунитета. При этом одним из главных показателей использования ДК, для создания вакцин, является их зрелость и функциональная активность. На зрелость ДК влияют различные факторы: цитокиновое окружение, особенности поглощаемого опухолевого антигена, взаимодействие с иммунокомпетентными клетками, влияние различных факторов бактериального происхождения. Так, на сегодняшний день продолжают исследования по изучению наиболее оптимальных условий культивирования *in vitro* предшественников ДК, способствующих дифференциации их в зрелые клетки, которые способны процессировать и презентировать опухолевый антиген лимфоцитам. Известно, что цитокины определяют тип и длительность иммунного ответа, стимуляцию или подавление роста клеток-участников, их дифференцировку, функциональную активность. Зная способность интерферона индуцировать экспрессию представляющих антиген молекул МНС-1 можно предположить его позитивное влияние на дозревание ДК.

Цель. Изучить влияние различных концентраций  $\alpha$ -ИФН ("Лаферон") и его комбинаций с липополисахаридом (ЛПС) на экспрессию CD86 и HLA-DR-маркеров, фагоцитарную активность ДК и их активность в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) с алогенными лимфоцитами и ДК моноцитарного происхождения доноров.

Методы. ДК получали из мононуклеаров периферической крови, выделенных на градиенте плотности фиколла ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ) с помощью культивирования в среде RPMI - 1640 в присутствии Г-КСФ и ИЛ-4. Известно, что добавление  $\alpha$ -ИФН на ранних этапах культивирования культуры мононуклеаров способствует их дифференцировке в макрофаги. В наших исследованиях  $\alpha$ -ИФН добавляли в культуральную среду незрелых ДК на 7 –е сутки их культивирования.  $\alpha$ -ИФН использовали в концентрациях 10 тыс.МЕ/мл либо 100 тыс.МЕ/мл. С целью изучения эффективности  $\alpha$ -ИФН в сочетании со стандартным стимулятором ДК –ЛПС, использовали данные вещества в комбинации ( $\alpha$ -ИФН в концентрации 10 тыс.МЕ/мл + ЛПС в концентрации 100 нг/мл). На 8-е сутки культивирования оценивали фенотипические и функциональные свойства ДК с использованием метода проточной цитометрии.

Результаты. Установлено, что наиболее высокий уровень экспрессии молекул CD86 и HLA-DR на поверхности ДК наблюдается при комбинации  $\alpha$ -ИФН (100 тыс.МЕ/мл) и ЛПС (93,01 %) при контрольных значениях (63,77 %). При этом фагоцитарная активность ДК и активность в реакции СКЛ практически не изменяется. Это может быть свидетельством того, что интенсивное дозревание ДК под действием сильных стимулов является не долго действующим и негативно сказывается на функциональных свойствах ДК.

При использовании  $\alpha$ -ИФН в концентрации 100 тыс.МЕ/мл наблюдается увеличение активности ДК в реакции СКЛ, количество пролиферирующих алогенных лимфоцитов (G2/M+S – фазы клеточного цикла) составляет 18,91% при контрольных значениях 11,55%. У культивированных в присутствии  $\alpha$ -ИФН в концентрации 100 тыс.МЕ/мл ДК отсутствует фагоцитарная активность, а фенотипические характеристики находятся на уровне контрольных значений.

Наиболее эффективным оказывается использование  $\alpha$ -ИФН в концентрации 10 тыс.МЕ/мл. При этом уровень экспрессии молекул CD86 и HLA-DR повышается до 72 %, фагоцитарная активность отсутствует, что является свидетельством зрелости ДК. Пролиферативная активность аллогенных лимфоцитов в СКЛ в присутствии таких ДК увеличивается в 2,5 раза (количество клеток в S-фазе клеточного цикла составляет 8,62 % против 3,81 % в контроле).

Выводы:  $\alpha$ -ИФН оказывает позитивное влияние на процесс дозревания ДК, т.е. способствует повышению уровня экспрессии поверхностных маркеров и усилению функциональной активности. Выраженность данного эффекта зависит от концентрации  $\alpha$ -ИФН в культуральной среде.  $\alpha$ -ИФН в концентрации 10 тыс.МЕ/мл может быть использован как дополнительный фактор, способствующий дозреванию ДК при изготовлении противоопухолевых вакцин.



## МЕМБРАНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ДОБАВКИ FLP-MD

Хижняк<sup>1</sup> С.В., Грищенко<sup>2</sup> В.А., Бичко<sup>1</sup> А.В., Войціцький<sup>1</sup> В.М., Мельничук<sup>2</sup> Д.О.

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ, Україна)

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування (Київ, Україна)

e-mail: vmv@biocc.univ.kiev.ua

При захворюваннях шлунково-кишкового тракту, печінки, нервової та серцево-судинної систем активно використовуються препарати репаративної дії на основі фосфоліпідів (ФЛ) рослинного походження та морепродуктів. Вони мають властивість стимулювати регенеративні процеси у мембранах клітин, що обумовлює їх лікувально-профілактичний ефект при патологіях різного етіопатогенезу. Проте за своїм хімічним складом зазначені сполуки істотно відрізняються від тих, які властиві клітинним мембранам організму ссавців, оскільки переважно містять есенційні жирні кислоти. Створено лікувальний засіб на основі ФЛ тваринного походження, а саме із маслянки (побічного продукту переробки молока на масло) – БАД FLP-MD, який є природними для організму ссавців і може мати кращу відновлюючу ефективність при структурно-функціональних розладах клітинних мембран, що показано за розвитку запальних і дистрофічних процесів у тканинах *in vivo*. До складу ліпосомальної форми БАД FLP-MD входять фосфоліпіди (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, сфінгомієлін, фосфатидилінозитол), а також додатково комплекс ненасичених жирних кислот (серед яких переважно ліноленова, ліолева, олеїнова) та жиророзчинні вітаміни ( $\alpha$ -токоферол і ретинол ацетату).

Мета роботи дослідити взаємодію БАД FLP-MD із штучними ліпідними мембранами для оцінки шляхів її впливу на біологічні мембрани. При дослідженні взаємодії різних речовин із мембранами використовуються найрізноманітніші модельні системи, які мають просту структурну організацію та характеризуються певними функціональними властивостями. Серед таких моделей – штучно створена ліпідна моношарова мембрана та штучні бімолекулярні ліпідні мембрани.

В основі моделі штучно створеної ліпідної моношарової мембрани покладено принцип формування на поверхні розчину електроліт - ліпід плівки товщиною в одну ліпідну молекулу. Для створення модельних моношарових мембран, використовували азолектин (із соєвих бобів "Sigma", США), розчинений у хлороформі. За результатами вимірювання параметрів поверхневої і мембранотропної активності (поверхневого тиску (ПТ) та граничного електричного потенціалу (ГП)) зроблено висновок про мембранотропну активність препарату БАД. Виявлені зміни величини ПТ та ГП свідчать про його здатність як взаємодіяти з полярними "голівками" моношару ліпідів, так і "вбудовуватися" в нього. Подальші дослідження проведено за використання штучних бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ) – структури більш високого ступеня організації у порівнянні із моношарами. Це дає можливість дослідити дію екзогенних ліпідів та ліофільних речовин саме на ліпідний бішар мембран. Для формування БЛМ використовували азолектин, а вихідні параметри БЛМ наступні: питома електропровідність ( $G_0$ )  $16,67 \pm 1,22$  нСм/см<sup>2</sup> та питома електроємність ( $C_0$ )  $0,50 \pm 0,06$  мкФ/см<sup>2</sup>. Електроємність мембран визначається як їх діелектричними показниками, так і її товщиною. Встановлене зменшення цього показника за дії БАД свідчить про "вбудовування" та/ або часткове "заміщення" ліпідів штучної БЛМ компонентами БАД. Азолектин містить 39 % фосфатидилхоліну, а жирові глобули маслянки – 30%, відповідно фосфатидилетаноламіну – 29 % і 35 %, фосфатидилсерину – 3% і 11% та ін. Тобто склад ФЛ азолектину та маслянки дещо відрізняється, що і призводить до зміни показника діелектричної ємності БЛМ із якою взаємодіють компоненти БАД. Це узгоджується із результатами отриманими на моношарових ліпідних структурах. З урахуванням, що показник електроємності БЛМ обернено пропорційний товщині мембрани, показано, що взаємодія БАД, яка не містила додатково комплексу жиророзчинних вітамінів, може призводити до зниження її товщини. Крім того, показано, що електричний опір БЛМ при внесенні препарату БАД, який не містив додатково комплексу жиророзчинних вітамінів, також не змінюється. Отже, модифікація БЛМ компонентами цієї БАД в значній мірі обумовлена не скільки "вбудовуванням", а "заміщенням" їх компонентами бішару, що не впливає на електричний опір БЛМ. Якщо препарати окрім ліпідів маслянки містять додатково тільки жиророзчинні вітаміни то спостерігається зниження показника електропровідності БЛМ, що може свідчити про більш виражену модифікацію поверхні мембрани.

Проведені дослідження взаємодії препаратів БАД, які відрізнялися за вмістом добавок, з ліпідними моношарами та бішаровими ліпідними мембранами свідчать, що вони проявляють поверхневу та мембранотропну дію, тобто окрім модифікації мембрани у зоні полярних "голівок" ліпідів також може бути "вбудовування" компонентів БАД до ліпідного шару модельних мембран. Це, ймовірно, зумовлюється наявністю в БАД ФЛ. Водночас мембранотропна дія препаратів БАД, які окрім ліпідів маслянки додатково містили жирні кислоти, у більшій мірі обумовлена проникненням у гідрофобну зону компонентів цих БАД та "заміщення" ними бішару. На противагу цьому, мембранотропна дія БАД, які окрім ліпідів маслянки додатково містили лише вітаміни, у більшій мірі обумовлює модифікацію мембрани у зоні полярних голівок ліпідів. Особливість мембранотропного ефекту препаратів БАД, у залежності від їх складу, необхідно враховувати при їх застосуванні.

**ИММУНОТРОПНАЯ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДОЛ-3-ИЛСУЛЬФАНИЛАЦЕТАТА ТРИС-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)АММОНИЯ**

*Колесникова О.П., \* Мирскова А.Н., \* Левковская Г.Г., Кудалева О.Т., Гойман Е.В.,  
Гаврилова Е.Д., Козлов В.А.*

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

\*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения Российской Академии наук, Иркутск, Россия  
e-mail: mirskova@irioch.irk.ru

Иммунные механизмы играют определяющую роль в развитии и исходе таких общепатологических процессов, как воспаление, регенерация, пролиферация, метаплазия, склерогенез. Актуальным является создание новых фармацевтических средств, обладающих способностью регулировать клеточные механизмы иммунной системы. В настоящее время существуют данные о том, что одним из ведущих механизмов развития аутоиммунных нарушений является активация Th2 клеток, сопровождающаяся увеличением ростовых факторов для В-клеток, синтезом аутоантител, развитием иммунокомплексных нарушений в органах. Целенаправленная иммунокоррекция аутоиммунного синдрома должна быть связана с нормализацией функций Th2 лимфоцитов. Применяемые в медицине для лечения иммунных заболеваний препараты либо обладают ограниченной сферой применения, либо вызывают побочные эффекты и осложнения, труднодоступны, дороги, не производятся в России.

В литературе практически отсутствуют сведения о синтетических лекарственных средствах из класса производных гетерилсульфанилалканкарбоновых кислот, между тем эти соединения представляют интерес как потенциальные иммуноактивные вещества вследствие их близости к фитогормонам.

В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН синтезирован индол-3-илсульфанилацетат трис-(2-гидроксиэтил)аммония (соединение ВМ-2-84), обладающее широким спектром биологической активности: иммуно- и гемопозмодулирующей, противовоспалительной, антибактериальной, гипохолестеринемической; защитным действием при кардиогенном шоке и токсическом стрессе.

Соединение ВМ-2-84 практически не токсично: LD<sub>50</sub> при внутривенном введении – 3000 мг/кг, при введении через рот LD<sub>50</sub> - 4460 мг/кг, не обладает кожно-нарывным и кожно-резорбтивным действием. В хроническом опыте при введении соединения в дозе 10 мг/кг не выявлено отклонений в тканях органов животных. Оно сочетает высокий терапевтический эффект в низких дозах с безвредностью, не обладает аллергенными, мутагенными, цитотоксическими и тератогенными свойствами.

Исследование иммуностропной активности соединения ВМ-2-84 *in vivo* у интактных мышей выявило, что трехкратное в/б введение его в дозе 50 мг/кг приводит к снижению массы тимуса на 20% и увеличению массы селезенки на 14%. Введение соединения в такой же дозе и режиме приводит к достоверной стимуляции первичного IgM и вторичного IgG гуморального иммунного ответа на тимус-зависимый антиген, но достоверному подавлению клеточного иммунного ответа у интактных мышей. Установлено, что стимулирование первичного гуморального иммунного ответа не является дозозависимым. В дозе 5 мг/кг соединение достоверно стимулирует первичный гуморальный иммунный ответ в модели пострадиационной иммунодепрессии, не оказывая влияния в других моделях ингибции гуморального иммунного ответа (постциклофосфановой, РТПХ-индуцированной иммуносупрессии).

Соединение ВМ-2-84 обладает выраженными антипролиферативными свойствами в культуре *in vitro* при спонтанной, митоген- и антиген-стимулированной пролиферации Т-клеток. В экспериментальной модели иммунокомплексного гломерулонефрита *in vivo* соединение ВМ-2-84 оказывает разнообразные выраженные эффекты: повышает сниженную массу тела, снижает повышенную СОЭ, стойко снижает протеинурию, тормозит развитие мезангиального пролиферативного гломерулонефрита, устраняет анемию в периферической крови (нормализация показателей гематокрита, гемоглобина), подавляет гиперплазию эритропоэза в костном мозге (нормализация количества ретикулоцитов, эритрокариоцитов, БОЕ-э), подавляет стимулированную спонтанную и ЛПС-индуцированную продукцию ИЛ-1.

Таким образом, наличие у соединения ВМ-2-84 Т-лимфотропных, иммуно- и эритропоэзмодулирующих, противовоспалительных свойств в сочетании с низкой токсичностью, отсутствием митостатических и лимфотоксических свойств свидетельствует о возможности создания иммуномодулятора нового класса для лечения аутоиммунных, иммунокомплексных, иммунодефицитных поражений, протекающих с анемией.





## ИММУНОДЕПРЕССИВНЫЕ, АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ 1-БЕНЗИЛИНДОЛ-3-ИЛСУЛЬФАНИЛАЦЕТАТА ТРИС-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)АММОНИЯ

*Колесникова О.П., \* Мирскова А.Н., \* Левковская Г.Г., Кудяева О.Т., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д., Гайдунь К.В., Козлов В.А.*

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

\*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

e-mail: mirskova@irioch.irk.ru

При скрининге иммуноактивных свойств ряда новых соединений, синтезированных в Иркутском институте химии им. А.Е.Фаворского СО РАН, выделен 1-бензилиндол-3-илсульфанилацетат трис-(2-гидроксиэтил)аммония (соединение ВМ-7-02), способное селективно ингибировать активность Th2 клеток, подавлять рост злокачественных новообразований.

Целью настоящего исследования является изучение иммунодепрессивных, антиметастатических свойств соединения ВМ-7-02 в готовой лекарственной форме (ГЛФ) (разработана Новокузнецким научно-исследовательским химико-фармацевтическим институтом в виде капсул по 0,1 г действующего начала для проведения клинических испытаний).

Установлено, что введение ГЛФ ВМ-7-02 в индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа (одновременно с антигеном и далее в течение 3-х суток ежедневно) приводит к достоверному подавлению IgM ответа: у ♂ гибридов СBF1 на 27%, у ♀ гибридов ВDF1 в трех сериях опытов на 33%-37%. Иммунодепрессивный эффект ГЛФ сравним с эффектом субстанции соединения ВМ-7-02 (при одинаковой дозе содержания действующего вещества).

Изучение антиметастатических свойств готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 в модели метастазирования клеток гепатомы Г27 выявило эффективное ингибирование процесса метастазирования клеток опухоли в легкие: при дозе 25 мг/кг число метастазов снижается в 3,4 раза, при дозе 50 мг/кг – в 2 раза.

Изучение иммунодепрессивных свойств ГЛФ ВМ-7-02 в модели аутоиммунного заболевания – иммунокомплексного гломерулонефрита оценивали по его влиянию на уровень белка в моче. Установлено, что курсовое введение ГЛФ ВМ-7-02 приводит к достоверному снижению количества белка в моче: исходно протеинурия составляла 5,3мг/мл, через неделю от начала лечения – 4,4мг/мл, по окончании курса – 3,7мг/мл. При использовании препарата сравнения - азатиоприна наблюдается аналогичная картина: исходно протеинурия была 5,2мг/мл, через неделю от начала лечения – 4,4мг/мл, по окончании курса – 4,0мг/мл. Таким образом, ГЛФ ВМ-7-02 оказывает иммунодепрессивный эффект у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом, сравнимый с лекарственным препаратом азатиоприном. При этом ВМ-7-02 не вызывает нарушений в составе периферической крови, тогда как азатиоприн в этой дозе угнетает функцию костного мозга, подавляет пролиферацию гранулоцитов, вызывает лейкопению, то есть является значительно более токсичным препаратом.

Известно, что хроническая РТПХ развивается при доминирующей активации Th2-клеток, что сопровождается повышенной продукцией IL-4 и, как следствие, возрастанием уровня IgE. При хронической РТПХ (DВА→В6D2F1) наблюдается повышение уровня IgE уже через неделю, через 6 недель уровень повышается в 200 раз (Doutrelepont JM et al., 1991). Показано, что введение антагонистов IL-4 - иммуносупрессивных препаратов (рапамидина, FK 506, циклоспорина А) снижает выраженность проявлений хронической РТПХ и приводит к снижению уровня IgE (Umland S.P. et al., 1992). Установлено, что у интактных мышей самок В6D2F1 в сыворотке уровень IgE составляет 26,5 мкг/мл, у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом 156,8 мкг/мл, в то время как у мышей с гломерулонефритом после курсового введения ГЛФ ВМ-7-02 уровень IgE снижается до 56,0 мкг/мл.

Таким образом, соединение ВМ-7-02 в ГЛФ проявляет иммунодепрессивные свойства у мышей-гибридов разных видов в модели гуморального иммунного ответа, оказывает выраженный антиметастатический эффект в отношении клеток гепатомы Г27. В модели аутоиммунного заболевания (иммунокомплексный гломерулонефрит) иммунодепрессивный эффект ГЛФ сравним с азатиоприном, который нередко вызывает серьезные побочные реакции и имеет ряд противопоказаний к применению. ГЛФ ВМ-7-02 существенно подавляет выработку IgE у мышей с гломерулонефритом в модели хронической РТПХ (DВА→В6D2F1).



## **NEURONAL GLUTAMATE TRANSPORTERS CONTROL EXCITATORY NEUROTRANSMISSION IN CA1 HIPPOCAMPAL NEURONS**

*Kondratskaya Elena <sup>1,2</sup>, Akaike Norio <sup>2</sup>, Krishtal Oleg <sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> Research Division For Life Sciences, Kumamoto Health Science University, Kumamoto, Japan.

<sup>2</sup> Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine.

e-mail: leo@biph.kiev.ua

Glutamate is the major excitatory transmitter in CNS although it causes severe brain damage by pathologic excitotoxicity. Efficient neurotransmission is controlled by powerful protection and support afforded by specific high-affinity glutamate transporters in neurons and glia, clearing synaptic glutamate. While the role of glial cells in glutamate uptake is well defined, the role of neuronal transporters remains poorly understood. The evaluation of the impact on pre- and postsynaptic uptake to spontaneous and evoked EPSC in hippocampal CA1 neurons within a model 'single bouton preparation' was addressed. In whole-cell patch clamp experiments the influence of blocking pre- or both pre- and post-synaptic glutamate transporters on spontaneous and evoked postsynaptic currents, such as spontaneous EPSC (sEPSC) and evoked EPSC (eEPSC), was examined by manipulating the content of intracellular solution. By suppressing alternately GluT by non-transportable inhibitor TBOA (10 microM), the role of glutamate uptake on synaptic currents was evaluated. With Cs<sup>+</sup>-based internal solution (postsynaptic GluTs are non-functional a priori), the deficient of presynaptic glutamate transporters affected the occurrence of synaptic event and thus involved in the regulation of transmitter release. eEPSCs were generally suppressed both in amplitude (to 48,73 % vs. control) and in success rate (R<sub>suc</sub>) by TBOA (from 91,1 % in control to 79,57%). In contrast, with K<sup>+</sup>-based internal solution (pre- and postsynaptic GluT are intact), amplitude of eEPSC was substantially potentiated by pre-treatment with TBOA (up to 150%), whereas (R<sub>suc</sub>) was reduced to 79.8% in average. The identical reduction of event success rate as well as increased PPF ratio for eEPSC in both cases indicates the effect of TBOA on pre-synaptic uptake. sEPSCs simultaneously recorded from neurons, showed the same pattern of regulation but with less potency, indicating the similar processes in most of excitatory synapses. In conclusion, presynaptic transporters are suggested to act mainly as negative feedback signal on presynaptic release and/or referred to vesicle refilling processes. The postsynaptically located transporters are supposed to shape postsynaptic events.



## ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРОГЕННЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ ЛЕКТИНОВ

Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Манько В.Г., Пивень О.А., Лукаш Л.Л.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина  
e-mail: lukash@imbg.org.ua; vlylo@mail.ru

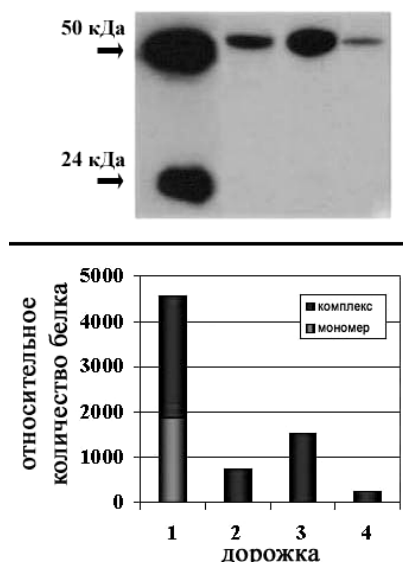
Репарация повреждений ДНК, индуцированных внешними и внутренними факторами, играет важную роль в поддержании целостности генома. Алкилирующие соединения, широко применяемые на производстве и в медицине, являются одним из наиболее опасных мутагенов. В восстановлении первичных повреждений, вызванных такими соединениями, решающую роль играет уникальный репаративный фермент Об-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (АГТ).

Важное практическое значение имеет разработка подходов к регуляции повреждающего действия различных факторов в клетках с помощью ингибиторов и индукторов активности репарационных белков, в том числе АГТ. Разными авторами было показано, что основными индукторами АГТ являются алкилирующие агенты, а также неспецифические факторы, вызывающие разрывы ДНК. Некоторые белки, например, лектины, которые влияют на клеточный цикл, потенциально могут оказывать влияние также и на протекание репарационных процессов.

Лектины представляют собой углеводсвязывающие белки неиммунной природы. Они широко распространены в природе, и обнаружены у представителей самых различных таксономических групп.

В представленной работе изучалось влияние лектинов на индукцию разрывов ДНК, а также на уровень экспрессии репаративного фермента АГТ. Исследование проводилось на модели культивируемых клеток млекопитающих *in vitro*. Использовалась культура первичных мезенхимальноподобных клеток человека, полученных из периферической крови, и на клетках китайского хомячка, производных от линии B10d-ii-FAF28 C1127. Изучалось действие лектина коры бузины черной (*Sambucus nigra*) и лектина семян чечевицы (*Lens culinaris*). Экспрессию АГТ на уровне белка изучали с помощью Western-blot анализа с использованием первичных антител к АГТ. Изменения количества разрывов ДНК определяли с помощью comet-анализа.

В результате проведенных исследований было показано, что исследуемые лектины обладают индуцибельным действием относительно репаративного фермента АГТ. Было также показано, что лектин коры бузины черной может вызывать разрывы ДНК. При этом количество таких разрывов в используемой тест-системе с увеличением действующей концентрации белка нелинейно возрастает.



**Рис.2.** Влияние растительных лектинов на экспрессию АГТ в клетках человека *in vitro* (результаты Western blot-анализа)

1 – Нер 2, позитивный контроль

2 – ВКФ, контроль, 11 пассаж.

3 – ВКФ + лектин *S. nigra* (20 мкг/мл), 11 пассаж. 4 – ВКФ, среда M1, 7 пассаж.

5 – ВКФ + лектин *L. culinaris* (20 мкг/мл), среда M1, 7 пассаж.



## ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА ЗМІНИ ПОВЕДІНКИ, ОБУМОВЛЕНІ СТРЕСОМ

*Макарчук М.Ю., Тубальцева І.І., Тукалеєнко Е.В., Пахомова А.О.*

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
e-mail: nikmak@biocc.univ.kiev.ua

Вивчення ролі процесів вільнорадикального окиснення у стрес-індукованій поведінці та перспективність застосування антиоксидантів для корекції постстресових змін функціонального стану вищої нервової діяльності залишаються актуальними питаннями для сучасної науки. Оксидантний стрес вважається універсальною ланкою розвитку багатьох патологічних станів за впливу на організм різноманітних стресових факторів. Вважається, що антиоксидантна терапія здатна запобігати стрес-пов'язаним окисним пошкодженням та покращувати поведінковий та когнітивний статус стресованого організму, хоча вплив антиоксидантів не є остаточно доведеним. При цьому, слід відмітити перспективність застосування біофлавоноїдів, обумовлену їх прямими антиокисними властивостями, низькою токсичністю, широким спектром терапевтичної дії. Метою роботи було встановлення основних закономірностей змін вищої нервової діяльності щурів за різних форм стресу та з'ясування можливості корекції стрес-індукованих порушень сполуками з антиоксидантними властивостями.

Дослідження спонтанної та умовнорефлекторної поведінки щурів та рівня інтенсивності вільнорадикальних процесів проводили за одноразового (у деяких випадках і хронічного) стресу – іммобілізаційного, емоційно-больового, радіаційного, токсичного (алкоголізація). Як засіб з антиоксидантними властивостями використовували кверцетин. Показано, що поведінковий статус тварин, підданих дії різних форм стресу, визначається гетерогенністю проявів, коливаючись від інгібування до гіперактивності в залежності від умов досліду. Застосування кверцетину впродовж дії стресу призводило до збільшення рівня дослідницької активності у щурів, у деяких випадках поліпшувалися показники інструментальної діяльності. Також досліджено та виявлено найбільш ефективні дози та схеми застосування кверцетину. Водночас застосування кверцетину без фактора стресу проявляло різноспрямований вплив на поведінку.



## ГОМОПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ

Мойсеенок А.Г.

ГУ «НПЦ»Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, Беларусь  
e-mail: val@biochem.unibel.by; vgurinovich@ Rambler.ru

D-гомопантотеновая кислота (ГПК) исследовалась как биологически и фармакологически активное соединение с выраженной нейротропной активностью с начала 70-х годов [ 1 ] в нескольких научных коллективах Украины, Беларуси и России. Итоги разностороннего изучения ГПК (препарат «ПАНТОГАМ» - Са соль ГПК) были подведены на представительной конференции в 1998г. [ 2 ]. Клинический опыт применения пантогама в психоневрологии показал его высокую эффективность при нарушении высших мозговых функций различного генеза за счет его ноотропных и, вероятно, ноотрофных свойств, реализуемых преимущественно через ГАМК-эргическую систему (ГПК является аналогом пантотеновой кислоты в которой β-аланин замещен на ГАМК) [ 3]. За последнее десятилетие получены новые экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о возможном вмешательстве ГПК (через систему КоА и митохондриальный метаболизм) в процесс иницирования нейродегенеративной патологии, о возможности моделирования путем введения ГПК синдрома «пантотенаткиназо-ассоциированной нейродегенерации» [ 4], а также об эффективности пантогама в коррекции когнитивных нарушений и других нервно-психических расстройств, в т.ч. в детской неврологии. В обстоятельном исследовании американских ученых высказано опасение, что ГПК как ксенобиотическое соединение, способно вызывать КоА-опосредованное нарушение функции митохондрий, блокируя глюконеогенез, окисление субстратов ЦТК и жирных кислот, включая одновременно альтернативные механизмы стабилизации внутримитохондриального КоА [ 5].

В нашей лаборатории на протяжении 2008 г. были проведены 3 серии экспериментов по изучению системного действия ГПК в условиях ее хронического введения на показатели обмена КоА, глутатиона, глутамина в структурах ЦНС и печени, в т.ч. на фоне моделирования нейродегенеративной патологии путем введения хлорида алюминия. Для моделирования возможных аграммационных или протекторных эффектов ГПК использовали курсовое введение D-пантенола, L-карнитина, сукцината. Во всех сериях исследований контролировали развитие окислительного стресса.

Установлено, что хроническое и субхроническое введение белым крысам WISTAR ГПК внутривенно в дозе 100-300 мг/кг массы тела не оказывает воздействия на уровень кислоторастворимого КоА и его фракций в печени, больших полушариях мозга, гиппокампе, стволе мозга, мозжечке. Падение КоASH наблюдали при алюминиевом нейротоксикозе (иницированном на фоне ГПК), что устранялось назначением пантенола. Не выявлено потенцирующих эффектов гомопантотената на проявление токсических эффектов алюминия. Установлено, что ГПК стабилизирует структуру фракций глутатиона и его редокс-статус. Положительные эффекты гомопантотената в ряде случаев усиливались пантенолом и карнитином. Выявлена функциональная связь систем КоА и глутатиона в стабилизации их фракций и вовлеченность тиол-содержащих белков в нейроструктурах в обеспечение их редокс-статуса и, вероятно, процессов, редокс-сигналирования. Выявлены новые механизмы реализации биологической активности ГПК через циклическую систему «глутамат-ГАМК-глутамин», в т.ч. способность активировать глутаминсинтетазную реакцию.

В эксперименте с 4-х недельным назначением ГПК (100 мг/кг) и воспроизведении алюминиевого нейротоксикоза установлено, что ГПК не приводит к манифестации окислительного стресса и нарушению функции печени (по показателям ферментемии) и не препятствует активирующему действию D-пантенола на биосинтез КоА как в печени, так и в нейроструктурах ЦНС. В стволе головного мозга животных, длительно получавших ГПК, соотношение фракций глутатиона сохранялось стабильным, однако, препарат активировал глутатионредуктазу, не изменяя активности глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы.

Субхроническое введение ГПК (7 дней, 200 мг/кг) оказывало (на фоне стабильного состояния фракций КоА) выраженное модулирующее действие на систему глутатиона, снижая ее редокс-потенциал в печени и увеличивая в гиппокампе (но не в больших полушариях). Полученные данные указывают, что использование ГПК как конкурентного ингибитора системы КоА [2, 5] является эффективным фармакотерапевтическим подходом для изучения редокс-процессов в ЦНС, моделирования нейродегенеративной патологии и оценки возможностей совместного медицинского применения ГПК и предшественников биосинтеза КоА.

### Литература:

1. Мойсеенок А.Г., Копелевич В.М. и др. // Фармакология и токсикология. – 1973. – Т. 36, № 4. – С. 489-494.
2. Ноотропные препараты. Пантогам. Двадцатилетний опыт применения в психоневрологии. Сборник статей. – 1998. – 170 с.
3. Розанов В.А. // Нейрохимия. – 1982. – Т.1, № 4. – С. 406-418.
4. Nauflck S. // Curr. Opin. Pediatr. – 2003. – Vol. 15, № 6. – P.572-577.
5. Zhang Y.M. et al. // Chem. Biol. – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 291-302.



## **АВЕРКОМ – КОМПЛЕКС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *STREPTOMYCES AVEMITILIS* УКМ АС-2179**

*Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Белявская Л.А., Петрук Т.В., Иутинская Г.А.*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина  
E-mail: cenoz@serv.imv.kiev.ua; bilyuvskal@ukr.net

Известно, что стрептомицеты способны синтезировать комплекс биологически активных веществ (аминокислоты, витамины группы В, ферменты, иммуномодуляторы и др.). Особое внимание исследователей привлекает эта группа микроорганизмов как продуценты антибиотиков

В последние десятилетия стало известно о способности стрептомицетов синтезировать макролидный антибиотик авермектин. Это комплекс из восьми близкородственных компонентов: четырех мажорных (А<sub>1а</sub>, А<sub>2а</sub>, В<sub>1а</sub>, В<sub>2а</sub>) и четырех минорных (А<sub>1в</sub>, А<sub>2в</sub>, В<sub>1в</sub>, В<sub>2в</sub>). Для авермектинового комплекса свойственен широкий спектр инсектицидной, акарицидной и нематоцидной активностей. Продуцентом этого комплексного антибиотика является *Streptomyces avermitilis* (1).

Учитывая то, что сельское хозяйство Украины испытывает острую необходимость в антипаразитарных биопрепаратах сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины был проведенный скрининг культур стрептомицетов, выделенных из различных типов почв. Выявлен штамм *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2161, способный к синтезу авермектина, который был выделен из чернозема Украины. В результате изучения спонтанной изменчивости культуры и проведения индуцированного мутагенеза получен вариант *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 авермектинсинтезирующая активность которого превышает активность природного изолята в 13,3 раза. Культура синтезирует полный комплекс авермектинов, фракция В в котором составляет до 40% (2). Создан новый биопрепарат аверком с содержанием авермектина 1400-1800 мкг в 1 мл этанольного экстракта и разработана биотехнология его получения.

Изучение комплекса биологически активных веществ аверкома показало, что в состав препарата, кроме авермектина, входят аминокислоты, витамины группы В, ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновая, которая является биогенным элиситором и может стимулировать защитные реакции растения. Высокая ростстимулирующая активность аверкома обусловлена также присутствием в его составе фитогормонов: ауксинов (индолилуксусная кислота – 217нг/мл препарата), гибберелинов (гиббереловая кислота – 4500 нг/мл), цитокининов (зеатин – 149 нг/мл, зеатинрибозид – 118 нг/мл, изопентиладенин – 428 нг/мл)(3).

Как показали исследования аверкома, проведенные в лабораторных, вегетационных и полевых опытах препарат проявляет не только высокую нематоцидную активность, но и обладает фиторегуляторными свойствами. В условиях закрытого грунта препарат увеличивал продолжительность продуктивного периода вегетации растений огурца. Площадь листьев опытных растений увеличивалась на 17,2%. Аверком стимулировал развитие генеративных органов, что способствовало повышению урожая, который за три месяца вегетации увеличился на 36% по сравнению с контролем. (4).

Таким образом, на основе *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, в Украине создан новый биопрепарат аверком с нематоцидной и фитостимулирующей активностью, который представляет собой комплекс биологически активных веществ.

### **Литература:**

1. Burg R.W., Miller B.M., Baker E.E. et al. Avermectin, new family of potent anthelmintic agents, producing organism and fermentation // *Antimicrob/ Agents and Chemother.* – 1979. –а 15.-p.361-367.
2. Пат. 69639 UA, МПК С12N 1/20, С12Р 17/02, С12Р 17/18, С12Р 19/62 (2006.01), С12R 1/465 (2006.10). Штамм *Streptomyces avermitilis* – продуцент авермектинів, речовин антипаразитарної дії / Іутинська Г.О., Козирицька В.Є., Валагурова О.В., Муквич М.С., Білявська Л.О., Петрук Т.В. // *Опубл.2006. Бюл.№8.*
3. Білявська Л.О. Біосинтез антипаразитарних і фітостимулюючих речовин *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179. Автореф.дис.канд.біол.наук. Київ.:2008.22с.
4. Білявська Л.О., Калмикова Н.О., Козирицька В.Є., Валагурова О.В., Іутинська Г.О. Вплив *Streptomyces avermitilis* та його авермектинового комплексу на мікроорганізми та вищі рослини // *Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія.*:36.наук.праць. – Київ: ДАУ, 2005. – 252-257.



## ОЦЕНКА СУММЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФИТОМАТЕРИАЛОВ ПО ВЕЛИЧИНЕ ИХ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

*Цюпко Т.Г., Темердашев З.А., Воронова О.Б., Николаева Н.А., Фролова Н.А.*

Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия  
e-mail: tsypko@inbox.ru

Процессу самоокисления, протекающему по радикальной реакции с участием пероксидных радикалов, противодействуют природные БАВ фитоматериалов, такие как замещенные фенолы, флавоноиды, токоферолы, витамины, органические кислоты. Поэтому актуальной является задача определения суммы этих веществ, то есть оценка интегральной характеристики – антиоксидантной активности.

Проведена классификация растительного сырья, основанная на выделении вещества, отвечающего за качество фитоматериала и являющегося наиболее «уязвимым» на всех стадиях вегетации. Это позволило установить ряд индивидуальных восстановителей органической природы, характерных для многих растений: рутин, танин, кверцетин, галловая и аскорбиновая кислоты. Их отдельное определение часто является нецелесообразным и проблематичным, в то время как суммарное содержание в них восстановителей, характеризуемое величиной антиоксидантной активности определяется экспрессно, не трудоемко и позволяет оценить качество растительных материалов.

Принимая во внимание, что антиоксидантное действие большинства биологически активных соединений связано с их способностью легко окисляться, отдавая электрон или атом водорода, в основу определения антиоксидантной активности положена оценка воздействия восстановителей органической природы на окислительно-восстановительную систему, содержащую комплексные соединения ионов переходных металлов. Для определения суммарного показателя – антиоксидантной активности биологически активных соединений фитоматериалов использовали индикаторную систему Fe(III)/Fe(II)-*o*-фенантролин, предложенную нами ранее [1]. Выбор данного органического реагента обусловлен тем, что реакция комплексообразования лиганда с восстановленной формой железа является высокочувствительной и специфичной. Кроме того, полуреакция Fe(III)/Fe(II) – *o*-фенантролин характеризуется значительным стандартным окислительно-восстановительным потенциалом ( $E^0 = 1,19\text{В}$ ), обеспечивающим полноту окисления фенольных и полифенольных соединений.

Установлено, что по уменьшению антиоксидантной активности изученные индивидуальные восстановители можно расположить в следующей последовательности: галловая кислота > кверцетин > гидрохинон > аскорбиновая кислота > танин > рутин > цистеин > глутатион.

Для корректного обсуждения получаемых результатов величину антиоксидантной активности целесообразно выражать количеством вещества-стандарта, как принято для многих известных суммарных показателей. Нами в качестве вещества-стандарта при определении антиоксидантной активности фитоматериалов предложено использовать аскорбиновую кислоту, поскольку она не является доминирующим восстановителем, содержится в малом количестве и по антиоксидантной активности занимает промежуточное положение среди изучаемых восстановителей.

Отработана и опробована на реальных образцах методика определения антиоксидантной активности растительных материалов. Установлена взаимосвязь между величиной антиоксидантной активности и суммой дубильных веществ.

Для целей индивидуального определения восстановителей органической природы, содержащихся в растительном материале, модифицирован способ их детектирования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Используя разработанную методику, которая характеризуется высокими аналитическими характеристиками, определено содержание преобладающих БАВ в ряде растений (подорожник, зверобой, календула и др.). При фитохимическом исследовании подорожника продырявленного была установлена зависимость содержания феруловой и протокатеховой кислот и антиоксидантной активности от условий интразональности. Показано, что неблагоприятные условия произрастания, связанные с загрязнением почв тяжелыми металлами и нефтепродуктами, сказываются на содержании рассматриваемых индивидуальных восстановителей. Так содержание феруловой кислоты увеличивается, а протокатеховой незначительно уменьшается, в то время как суммарный показатель – антиоксидантная активность – уменьшается. Подобная картина (по показателю антиоксидантная активность) наблюдается и для образцов крапивы двудомной.

В результате проведенных исследований разработаны и опробованы методики определения индивидуальных биологически активных веществ фитоматериалов и суммарного показателя – антиоксидантной активности. Методика спектрофотометрического определения антиоксидантной активности фитоматериалов имеет низкую себестоимость и не требует сложного аппаратного оформления, что может обеспечить возможность ее широкого применения в аналитических лабораториях при проведении технологического контроля и оценке качества растительного лекарственного сырья.

### **Литература:**

1. Патент 2282851 Российская Федерация., МПК<sup>7</sup> G01N33/02. Способ определения суммарной антиоксидантной активности / Цюпко Т.Г., Темердашев З.А., Воронова О.Б., Храпко Н.В. – № 2004138188/13; заявл. 27.12.2004; опубл. 27.08.2006, Бюл. № 24. С. 523.



## СПИСОК АВТОРОВ

Абакумова Е.С. ....	291	Бобык В. ....	231	Галушко Н.А. ....	363
Абдувалиев А.А. ....	227	Богданова Е.В. ....	85, 91	Гальченко С.Е. ....	45, 281, 417
Абдуллаева Л.К. ....	429	Богун Л.И. ....	299	Гальченко С.Е. ....	45
Абрамова Л.С. ....	149	Богушевич С.Е. ....	19	Гамма Т.В. ....	103, 283
Аванесян С.С. ....	187	Боева Н.П. ....	147	Ганусевич И.И. ....	243
Аврорин В.В. ....	169	Бойко И.И. ....	169	Гарманчук Л. В. ....	251, 285, 379, 451
Азабалаев А.А. ....	105	Бойко О.В. ....	233	Гафуров Ю.М. ....	385
Агеев С.А. ....	275	Бойко Ю. А. ....	349	Генега А.Б. ....	241
Агуреев А.П. ....	5	Болдескул И.Е. ....	21, 403	Георгиевский Г.В. ....	47
Адамович С. Н. ....	465	Бондаренко Н.А. ....	69	Гершунская В. В. ....	149
Азарова О.В. ....	221	Бондаренко Н.С. ....	321	Гидаспов А.А. ....	273
Айзенберг В.Л. ....	7	Бондаренко О.Б. ....	235, 265	Гильдиева М.С. ....	227
Айххофф У. ....	171	Бондаренко С.П. ....	23	Гильманова А.Г. ....	79
Албулов А.И. ....	317	Борисенко А.В. ....	7	Гиниятуллин Р.Х. ....	165
Александрова Г. А. ....	169	Борисов О.Ю. ....	287	Гиниятуллина Г.В. ....	15
Алексеева О.М. ....	207	Бородин В.В. ....	115	Гладких А.И. ....	115
Алексеева И.В. ....	371, 379	Бординова Т.И. ....	467	Глотова Т.И. ....	193
Альфонсов В.А. ....	9, 135, 391	Бошков Л. З. ....	81	Глушков А.Н. ....	11
Амельянчик Ю.С. ....	387	Боярскан А.М. ....	468	Говоруха М. О. ....	29
Андреева Л.А. ....	443	Бредихин А.А. ....	25, 27	Гоголь С.В. ....	367, 453
Андрянова Ю.М. ....	209	Бредихина З.А. ....	25, 27	Гойман Е.В. ....	472, 473
Андронатти С.А. ....	211, 213	Броварец В.С. ....	405	Головина М.Э. ....	119
Андроник О. ....	55	Брюханов В.М. ....	221	Гололобов Ю.Г. ....	49
Андрусишина И.М. ....	219, 257	Бузыка Т.В. ....	255	Голощапов А.Н. ....	207
Аникина Л.В. ....	101, 215	Буко В.У. ....	237, 343	Голубева Е.А. ....	209
Анисимов А.П. ....	275	Буланцева Е.А. ....	239	Голубина О.А. ....	59
Анисович М.В. ....	217, 359	Бульмага В. ....	37	Голубков А.М. ....	261
Анкудинов И.В. ....	119	Бура М.В. ....	241	Гончарук В.М. ....	151
Антоненко С.В. ....	401	Бурлака А.П. ....	243	Горбачевский А.Н. ....	333
Апалько С.В. ....	11	Бурлакова Е.Б. ....	207, 457	Горбенко Н.И. ....	287
Апарин П.Г. ....	119	Бурцева С.А. ....	75, 425	Горбик Г.В. ....	423
Апихтина О.Л. ....	219	Буряк И.А. ....	265	Горбуленко Н.В. ....	51
Апуховська Л. І. ....	375, 441	Бушувее А.С. ....	102	Горбунова Н.И. ....	229
Артамонова С.Д. ....	13	Быркэ М. ....	55	Горина О.Л. ....	291
Артеменко О.Ю. ....	445	Быховец А.И. ....	151	Горячая И.П. ....	265
Артюков А. А. ....	331	Бычкова А.А. ....	17	Грабельных В.А. ....	111
Афонин В.Ю. ....	205, 407	Валагурова Е.В. ....	478	Григор'ева М.В. ....	289
Ахатова Ф.С. ....	27	Варфоломеев С.Д. ....	107	Гришин Е.В. ....	139
Бадун Г.А. ....	169	Василевский Д.А. ....	137	Грищенко В.А. ....	471
Баевский А.М. ....	283	Василевский С.В. ....	101	Гроза Н. В. ....	53
Баевский М.Ю. ....	283	Васильева Н. В. ....	143	Гулевский А.К. ....	291
Байбулатова Н.З. ....	303	Веклич Т.О. ....	439	Гуля А. ....	37, 55
Байкова И. П. ....	15	Великий М.М. ....	441	Гулякевич О.В. ....	57
Байсалова Г.Ж. ....	140	Вендило А.Г. ....	69	Гусакова Н.Н. ....	209
Балаева-Тихомирова О.М. ....	343	Вервее С.В. ....	179	Гусева А.А. ....	321
Баранов В.В. ....	101	Верхуша В.В. ....	355	Давлетханов И.Н. ....	391
Баранова Г.В. ....	63	Вешкурова О.Н. ....	139	Давыдова Н.К. ....	31
Барачевский В.А. ....	107	Виноградова Е.П. ....	351, 459	Данилович Г.В. ....	249, 439
Бардадим И.И. ....	361	Вислоух А.А. ....	365	Данилович Ю.В. ....	249
Барышева Т.С. ....	437	Вихарев Ю.Б. ....	101, 215	Дариенко А.М. ....	211
Басченко Н.Ж. ....	303, 381, 466	Войццкий В.М. ....	471	Дасюкевич О.И. ....	251
Батыр Л. ....	37	Воловенко Ю.М. ....	71	Дворщенко Е.В. ....	271
Бахарев В.В. ....	273	Волошина А.Д. ....	165	Декуша Г.В. ....	427
Башилов А.В. ....	223	Вольхина В.Е. ....	407	Делеменчук Н.В. ....	243
Безверха И.С. ....	23	Воробйова Т.В. ....	333	Демина О.В. ....	107
Безуглов В.В. ....	443	Воробьева О.В. ....	187	Демченко В.Ф. ....	307
Бей М.П. ....	157	Воронина О.К. ....	255	Демченко П.И. ....	253
Беликов Н.Е. ....	107	Воронков М. Г. ....	465	Денисенко О.В. ....	255
Белых И.А. ....	265	Воронова О.Б. ....	479	Дентовская С.В. ....	275
Бельтюкова С.В. ....	17	Воронова Т.Д. ....	469	Дикусар Е.А. ....	33, 157
Беляевская Л.А. ....	478	Вьюнова Т.В. ....	443	Дитченко Т.И. ....	339
Берегова Т.В. ....	225	Габдрахманова С.Ф. ....	117	Дмитриева Е.А. ....	67
Береговая Т.В. ....	271, 393	Гаврилова Е.Д. ....	472, 473	Дмитруха Н.М. ....	219, 257
Береснева Ю.В. ....	227	Газиева Г.А. ....	101	Докичев В.А. ....	117, 189, 381
Бивол Ч. ....	37	Гайдуль К.В. ....	473	Дони В.А. ....	155
Бичко А.В. ....	471	Галатенко Н.А. ....	43, 289	Донцов А.Е. ....	261
Блажевский Н.Е. ....	229	Галстян А.Г. ....	102	Донченко Г.В. ....	35, 243, 259, 373,
Блохин Д. Ю. ....	277	Галстян С.Г. ....	40	.....	375, 383, 441
Блохина С.В. ....	273	Галстян Т.М. ....	40	Дор Т.М. ....	463





Дубей И. ....	231	Ищенко В.В. ....	61	Коренюк И.И. ....	103, 283, 395
Дудок К.П. ....	263	Иванова О.В. ....	287	Коркач Ю.П. ....	219
Дюбко Т.С. ....	45, 265	Иванська Н.В. ....	401	Короленко Т.К. ....	323
Дядюн С.Т. ....	401	Кабанова Т.А. ....	213	Короткий А.Г. ....	225, 245, 393
Евсеев Л.С. ....	457	Казаков В. П. ....	65	Короткий О.Г. ....	325
Евстропов Н.А. ....	193	Казакова О. Б. ....	15, 175	Корчевин Н.А. ....	111
Егоренкова И.В. ....	267	Калугина А.А. ....	469	Костерин С.А. ....	327
Егоров Ц.А. ....	139	Кандыбын Н.В. ....	377	Костіна В.Г. ....	371
Егорова А.Ю. ....	209	Канищев О.С. ....	63	Костянюк М.В. ...	..11
Еленчук Д. ....	37	Капичон А.П. ....	7	Косяк Т.Ю. ....	.. 263
Епишкин И.В. ....	283	Каргин А.В. ....	459	Котельникова И.М. ...	.. 93
Еремеев В.Н. ....	39	Карножицкая Т.М. ....	115	Котик А. ....	309
Ермакова Е. ....	269	Карлов Л.М. ....	255	Котовая А. ....	55
Ермакова Е.А. ....	123	Карповец Т.П. ....	325	Коцюрuba А.В. ....	219
Ермолаева Н. А. ....	466	Касьян О.В. ....	297	Кошевой О.Н. ....	97
Ерохин В.Е. ....	39	Катаева О.Н. ....	135	Кравченко А.Н. ....	101, 215, 335
Ефремова Н. ....	37	Качала В.В. ....	141, 153	Кравченко И.А. ....	211, 349
Евгелевский О. ....	295	Качанов А.В. ....	385	Кравченко О.О. ....	325
Ересью В.А. ....	263	Каюмова Р. Р. ....	65	Краснокутская Л.М. ....	341
Жаркова Л.Д. ....	371, 389	Кельменчук В.Б. ....	155	Красова Н.С. ....	115
Желдакова Р.А. ....	33, 137, 145, 157	Ким Ю.А. ....	207	Кривошапко О.Н. ....	331
Желтухина Г.А. ....	195	Кирияк Т. В. ....	37, 73	Кришталь О. ....	295
Жеребкер К. Я. ....	173, 197	Кирсенко В.В. ....	307	Кузаева З.И. ....	105
Жигачева И.В. ....	457	Киселёв А.С. ....	161	Кудаева О.Т. ....	472, 473
Жохова Н.И. ....	177	Киселица Н.Н. ....	77, 185	Кузнецов О.Е. ....	275
Жуков Д.А. ....	459	Киселица О.А. ....	77, 185	Кучменко О.Б. ....	243
Жуковская Н.А. ....	33	Кисель М.А. ....	75, 167	Кулик Н.В. ....	165
Жукотский Е.К. ....	367, 427	Кірсєва С.С. ....	395	Куликов А.Ю. ....	47
Журавель О.В. ....	455	Клевета Г. ....	309	Кульчиков А.Е. ....	347
Журомский В.С. ....	415	Клен Е.Э. ....	65, 79	Курман П.В. ....	57
Заботин А.И. ....	437	Кленов О.О. ....	367	Курченко В.П. ....	83
Завелевич М.П. ....	277, 279, 371, 389, 401	Климочкин Ю.Н. ....	201	Курьянов В.О. ....	103, 395
Заводовский Д.О. ....	361	Книрель Ю.А. ....	119, 275	Кухаренко О.П. ....	405
Загородня С.Д. ....	63	Князев А.В. ....	311	Кущевская Н.Ф. ....	333
Закашун Т.Ю. ....	289	Князева О.А. ....	311	Кущевский А.Е. ....	333
Заковаршин В.С. ....	193	Коберник А.А. ....	211	Кишинский К. ....	265
Залеток С.П. ....	365	Ковалева А.М. ....	97	Кюн Х. ....	53
Залеток С.П. ....	367, 353	Ковалева М.В. ....	205	Лаврова К.В. ....	245
Запорожченко А. В. ....	313	Коваленко В.Ф. ....	307	Лампатов В.В. ....	221
Зарудий Ф.С. ....	466	Ковалькова М.В. ....	187	Лаптев А.В. ....	107
Зарудий Ф.А. ....	381	Ковальова А. М. ....	95	Ларкина Е.А. ....	109
Звездин К.В. ....	107	Ковальова В.А. ....	299	Ларская И.А. ....	437
Зверев Я.Ф. ....	221	Кожокаръ А.И. ....	99, 155	Лебедев О.В. ....	335
Зверева Т.Д. ....	157	Козак В.В. ....	369	Леванова Е.П. ....	111
Звягина Т.С. ....	287	Козак М.М. ....	427	Левківська Л.В. ....	337
Зеленый С.Б. ....	455	Козин Ю.И. ....	265	Левковская Г.Г. ....	472, 473
Земирова И.А. ....	111	Козинец Г.П. ....	468	Ледов В.А. ....	119
Земцов Р.В. ....	107	Козлов А. ....	157, 231	Леоненко Н.С. ....	307
Зинченко В.Д. ....	265	Козлов В.А. ....	472, 473	Леонова Е.С. ....	121
Зобов В.В. ....	165, 461	Козлов К.П. ....	329	Лесие А. В. ....	163
Золотарь Р.М. ....	151	Козлов Н.Г. ....	157	Лещенко Ж.А. ....	115
Зосим Л. ....	37	Козырицкая В.Е. ....	478	Линчак О.В. ....	345
Зубенко Ю.С. ....	151	Кокзей В.Н. ....	451	Липина О.В. ....	113
Зуев Ю. ....	269	Кокешкина О. А. ....	313	Липсон В.В. ....	115
Зыков А.В. ....	87, 89	Колесник Д.Л. ....	251	Логвина А.О. ....	339
Зыкова С.И. ....	173, 199	Колесникова О. П. ...	465, 472, 473	Ложкин С.С. ....	117
Ибрагимов Б.Т. ....	431	Коломийчук С. Г. ....	81	Лохматов А.В. ....	109
Ибрагимов Ф.А. ....	227	Коломийчук Т.В. ....	315	Лубенець В.І. ....	241
Иванов А. ....	7	Комаров Б.А. ....	317	Лубянова И.П. ....	341
Иванов Е.Г. ....	291	Комиссаренко А.Н. ....	97	Лук'янчук Є.В. ....	243
Иванов И.В. ....	53	Компанецъ І.В. ....	325	Лукаш Л.Л. ....	475
Иващенко Е.В. ....	333	Кондакова А.Н. ....	119, 275	Лукаш Т.А. ....	365
Ившина Т.Н. ....	13	Кондратська О. ....	295	Лукивская О.Я. ....	237, 343
Иванатов В.В. ....	267	Конкина И.Г. ....	311	Лукин А.Ю. ....	107
Иловайский А.И. ....	125, 127, 129	Коннов Н.П. ....	275	Лукьяненко И.В. ....	353
Ильина Т.В. ....	97	Коннова С.А. ....	267	Лунько О. ....	295
Инишева Л.И. ....	59	Коновалов А.И. ....	207, 319	Лупашко А. ....	55
Иоффе С. Л. ....	163	Коновалова Н.П. ....	273	Лыло В.В. ....	475
Исак-Гуцул Т. ....	55	Копылова Г.Н. ....	321	Лысак В.В. ....	137
Иутинская Г.А. ....	478	Кораблева Н.П. ....	239	Львов В.Л. ....	119
		Коренева А. А. ....	131	Мадзиевская Т.А. ....	205
		Коренман Я.И. ....	85, 87, 89, 91	Мазур И.А. ....	47



Макай Ш. ....	447	Нефедов О.М. ....	117, 381	Погорельская Л.В. ....	317
Макара Н. С. ....	466	Нехорошеев М.В. ....	279	Погребной П. ....	231
Макаренко А.Н. ....	347	Никитина К.А. ....	135	Погрибний П.В. ....	455
Макаров М.В. ....	121	Никишин Г.И. ....	125, 127, 129	Позур В.К. ....	347, 451
Макарова Н.Н. ....	79	Николаев А.Е. ....	165	Полтораки В.В. ....	115
Макарчук М.Ю. ....	476	Николаева Н.А. ....	479	Попов А. М. ....	331, 385
Максименко С.И. ....	349	Николаевич Л.Н. ....	217, 359	Попова Н.И. ....	75
Макшакова О.Н. ....	123	Никольченко А.Ю. ....	291	Поповски Л. ....	37
Малей Л.П. ....	205	Нифталеев С.И. ....	85	Постолакий О.М. ....	75
Малиновская Л.А. ....	59	Новикова В.Г. ....	27	Поткин В.И. ....	33, 151, 157
Малицька І.В. ....	367, 453	Новикова Н.С. ....	349	Потопальский А.И. ....	389
Малышев О.А. ....	215	Новиков В.П. ....	241	Поцелуева М.М. ....	357
Мамалига В.К. ....	433	Ноздренко Д.М. ....	337, 361	Почерняев А.К. ....	115
Мамедова В.Л. ....	135	Остахов С.С. ....	65	Поярков О.С. ....	401
Мамыкин А.В. ....	65	Огурицова С.Э. ....	205	Преображенська Т. ....	447
Мандзинець С.М. ....	241	Одинец И.Л. ....	121	Проколюк О.С. ....	113
Манько В.Г. ....	475	Окороченков С.А. ....	195	Протасова З.С. ....	373
Маркина А.А. ....	119	Оксененко С.В. ....	287	Проценко М.А. ....	239
Марков А.Г. ....	351, 459	Олан О. ....	37	Пунегова Л.Н. ....	391
Мартиросова В.Г. ....	341	Олейник А.И. ....	467	Пшеничная Э.Н. ....	187
Мартынюк В.С. ....	353	Олефиренко А.А. ....	417	Пясковская О.Н. ....	251
Маслова Л.К. ....	159	Ольховик В.К. ....	137, 145	Раваева М.Ю. ....	103, 395
Матвеева В.А. ....	11	Омельчук Е.А. ....	7	Радчук О.М. ....	225, 393
Матвеевко Ю.В. ....	137, 145	Орлова И.Г. ....	363	Раецька Я.Б. ....	397
Матвейчук С.В. ....	19	Орловский А.А. ....	365, 369	Растимешина И.О. ....	433
Махмудов Р.Р. ....	169	Орловський О.А. ....	367, 453	Рахмадиева С.Б. ....	140
Махова Н.Н. ....	101	Осадчая О.И. ....	468	Резник В.С. ....	165, 461
Махонина М.М. ....	247	Осипов А.Н. ....	109	Резников А.Н. ....	201
Мацевич Л.Л. ....	475	Осипова Е.Ю. ....	141	Речицкий О.Н. ....	263
Мачнева Т.В. ....	109	Остапченко Л.И. ....	255, 285	Рибалко С.Л. ....	371, 401
Мельникова Е.И. ....	85, 91	Остапченко Л.І. ....	325, 397, 447	Рибальченко В.К. ....	301, 345, 445
Мельничук Д.О. ....	471	Островская Л.А. ....	199	Рогожин Е.А. ....	139
Меркулова В.М. ....	125, 127, 129	Островский М.А. ....	261	Родионов А.Н. ....	141, 153, 197
Мещерякова С. А. ....	65	Островська Г.В. ....	301, 345, 445	Рожнова Р.А. ....	43
Мирскова А.Н. ....	465, 472, 473	Отрошенко В.А. ....	143	Ромашко С.Н. ....	83, 399
Миску В.Г. ....	99	Ощепкова Ю.И. ....	139	Рошаль А.Д. ....	265
Мисюра А.Г. ....	411	П'ятчаніна Т.В. ....	421	Рудаков Д.А. ....	157
Михайлов А.С. ....	165	Павлинова Л.И. ....	293	Рудик В. ....	37, 73, 99
Михальчук А.Л. ....	57	Павловский В.И. ....	211, 213	Рудниченко Е.С. ....	85, 91
Мищенко Н.П. ....	221	Палигин О. ....	295	Рудь Л.Б. ....	99, 155
Мілохов Д.С. ....	71	Пальчиковська Л.Г. ....	371, 379	Руссаевская Н.В. ....	111
Мірошніченко М.С. ....	337	Панов Д.А. ....	191	Рыбалкина Е.Ю. ....	121
Міщенко Л.Т. ....	131	Панова Э.П. ....	191	Рыбалко С.Л. ....	389
Моисеева Н.Н. ....	291	Панькина Л.Н. ....	275	Рыбальченко В.К. ....	393
Мойсеенок А.Г. ....	477	Папуниди К.Х. ....	391	Рыжкина И.С. ....	319
Мокрушин А.А. ....	293	Парфенова В.В. ....	41, 183	Рыжов А.Н. ....	159, 177
Мокшина Н.Я. ....	87, 89	Пархач М.Е. ....	145	Рябенко Д. ....	231
Молдовяну Т.Г. ....	185	Пархоменко Н.А. ....	191, 373, 441	Рябушко В.И. ....	39, 191
Молодой Е.В. ....	77, 185	Пархоменко Ю.М. ....	373	Савостина Е.П. ....	275
Моложаева О.С. ....	347	Пасична Е. П. ....	375	Савосько С.И. ....	347
Молчан О.В. ....	83, 399	Пасмурцева Н.А. ....	403	Садовник Д. К. ....	73
Морозова Е.В. ....	217, 359	Патыка В.Ф. ....	377	Сакина Н.Л. ....	261
Морозова Е.С. ....	355	Патыка Т.И. ....	377	Салахутдинов Б.А. ....	139
Морозова Л. ....	231	Пахомова А.О. ....	476	Салихов Ш.И. ....	139
Морозова Р.П. ....	375	Пахомова О.А. ....	89	Саліенко І.А. ....	45
Москвіна В.С. ....	133	Пашагин А.В. ....	27	Самет А.В. ....	161
Московкина Т.В. ....	385	Перепелица О.М. ....	379	Самойленко О.А. ....	367, 453
Мотин В.Л. ....	275	Перепелицына Е.М. ....	285, 451	Самойленко В.А. ....	401
Музичка Л.В. ....	179	Перепелов А.В. ....	119	Самонина Г.Е. ....	271, 321
Муртазина Л.И. ....	319	Перский Е.Э. ....	355	Самченко Ю.М. ....	21, 403
Мусатова И.Б. ....	113	Петкевич С.К. ....	33, 151	Санагурский Д.І. ....	241
Мягкова Г.И. ....	53	Петров Д.В. ....	117, 189, 381	Сатыго А.Н. ....	83
Назаренко В.Н. ....	468	Петрова Г. В. ....	383	Сашенкова Т.Е. ....	273
Нарута Е.Е. ....	343	Петрова М.С. ....	147	Саяпина Л.В. ....	275
Наумов А.А. ....	357	Петровицева С.Е. ....	385	Светличная Н.В. ....	115
Небесна Т. Ю. ....	29	Петрук Т.В. ....	478	Святецкая В.Н. ....	347
Небольсин В.Е. ....	195	Петруханова А.В. ....	149	Семакин А. Н. ....	163
Негруцкий Б.С. ....	365	Петухов Д.М. ....	243	Семишина Е.А. ....	211
Непийвода К.Д. ....	285	Петушок В.Г. ....	137	Семёнов В.В. ....	161
Несмелова И. ....	269	Пивень О.А. ....	475	Семенов В.Э. ....	165
Нестерова Н.В. ....	63	Пилпчук С.Ю. ....	373	Семёнова М.Н. ....	161
Нестерова О.В. ....	451	Плэчинтэ Н.С. ....	99	Семерня Л.Г. ....	109



Семик Л. И. ....	255	Третьяков В.В. ....	193	Чеховская Л.И. ....	373
Сенчило Н.В. ....	451	Третьякова Е.В. ....	175	Чехун В.Ф. ....	367, 447
Серебрякова М.В. ....	401	Трифопова А.В. ....	291	Чижевский В.В. ....	113
Сибірна Н.О. ....	263, 309	Трофимова О.И. ....	437	Чинчлей А.Г. ....	433
Сидоренко М.В. ....	285, 379	Тубальцева І.І. ....	476	Чирва В.Я. ....	103
Сидорик Є.П. ....	243	Тукалеенко Е.В. ....	476	Чиркин А.А. ....	343
Сидорик Л. ....	231	Турманидзе Д.Г. ....	469	Чуваева И.В. ....	159
Сильников В.В. ....	193	Тыжненко Т.В. ....	115	Чувылкин Н.Д. ....	177
Сименел А.А. ....	141, 153, 173, 197, 199	Тюпало Н.Ф. ....	40	Чупахина Т.А. ....	103, 395
Синяшин О.Г. ....	391	Умарова Б.А. ....	321	Чурин С.И. ....	391
Ситько В.В. ....	470	Усатый А.С. ....	77, 185	Чуян Е.Н. ....	247
Сілонов С. Б. ....	35	Фадеев М.А. ....	273	Шаблюкин О.В. ....	405
Скачкова О.В. ....	470	Файзуллин Д.А. ....	123	Шаблыкшина О.В. ....	61
Скибицька М. ....	309	Фалалеева Т.М. ....	271	Шайхутдинова Р.З. ....	275
Склярів О. Я. ....	413, 415	Фалько О.В. ....	113	Шамцян М.М. ....	297
Скопенко О.В. ....	379	Фаттахов С.Г. ....	207, 457	Шаповалова А.А. ....	103
Скриннік М.М. ....	401	Федорев С.А. ....	221	Шарабура Л.Б. ....	23
Сластья Є.А. ....	421, 423	Федоров Б.С. ....	273	Шарко О.Л. ....	75, 167
Слета І.В. ....	417	Федорова А.В. ....	115, 183	Шаркова Н.О. ....	367, 427
Смирнов Л.Д. ....	261	Федорова В.А. ....	275	Шарнина Ф.Ф. ....	13
Смирнова І.Е. ....	175	Федорова Г.А. ....	41	Шаталин Ю.В. ....	357, 409
Смоленский Е.А. ....	159, 177	Федорченко Д.Б. ....	371, 401	Шафрановская Е.В. ....	205, 407
Смолий О.Б. ....	179	Федорчук О.Г. ....	423	Швед А.Д. ....	371
Снегур Л.В. ....	199, 419	Федоряк Д.М. ....	463	Швец В.И. ....	107
Собко В.М. ....	353	Федоряк О. Д. ....	463	Швец Ю.В. ....	470
Соболевская М.П. ....	183	Федотова О.В. ....	209	Шевченко А.А. ....	443
Соколик О.А. ....	265	Филипенко М.Л. ....	11	Шевченко Є.А. ....	379
Солдаткіна М.О. ....	455	Филицова Г.Г. ....	387	Шевченко И.Н. ....	411
Соляник Г.І. ....	251, 421, 423	Фильченков А.А. ....	277, 279, 389	Шевченко К.В. ....	443
Сорокіна Л.В. ....	421	Філінська О.М. ....	301, 345, 445	Шермолович Ю.Г. ....	63
Спиріхін Л. В. ....	15, 175	Фомина А.А. ....	267	Шестакова Т.С. ....	455
Станев А. И. ....	313	Фрасинюк М.С. ....	23	Шехт М.А. ....	119
Старикович Л.С. ....	263	Фролова Н.А. ....	479	Шилай А.Г. ....	151
Степаненко С.П. ....	373	Фурзикова Т.М. ....	451	Шилов В.В. ....	205
Степанова А.В. ....	287	Халиуллин Ф.А. ....	65, 79	Шиндер А.В. ....	45
Степина І. Е. ....	143	Хама-Мурад А.Х. ....	293	Широбокова М.Г. ....	115
Стойко В.И. ....	7	Харенко Е.Н. ....	67	Широкий В.Л. ....	33
Стряпан Н.В. ....	433	Харламов А.В. ....	69	Шитова Т.С. ....	391
Суходуб Л.Ф. ....	21, 181	Харченко В. ....	231	Шишкин Д.В. ....	303
Суходуб Л.Б. ....	403	Харченко О.І. ....	299	Шкаволяк А.В. ....	263
Сухоруков А.Ю. ....	163	Харчук І.В. ....	301, 345, 445	Шкрабак О.А. ....	439
Сырбу Т.Ф. ....	425	Хижняк С.В. ....	471	Шкрыль Ю.Н. ....	221
Сытова М.В. ....	67	Хиля В.П. ....	23, 51, 61, 133	Шмарев А.Н. ....	409
Тагиль І.И. ....	205	Хиля О.В. ....	71	Шпрауль М. ....	171
Талипов С.А. ....	431	Хисамутдинова Р.Ю. ....	303	Шуба Н.М. ....	469
Таловер М. В. ....	413	Хілько Т. ....	447	Шеняевский И.И. ....	291
Таран К.В. ....	287	Ховака В.В. ....	131	Щепина Н.Е. ....	169
Таран О.П. ....	131	Ходонов А.А. ....	107	Эдеева С.Е. ....	321
Тарасенко А.И. ....	102	Хоменко А.В. ....	441	Элинсон М.Н. ....	125, 127, 129
Твердохлеб И.А. ....	7	Храновская Н.Н. ....	470	Эстрела-Льопис В.Р. ....	467
Темердашев З.А. ....	479	Храпов Е.А. ....	11	Ювченко А.П. ....	33, 157
Темурьянц Н.А. ....	353	Хусаинов Д.Р. ....	283	Юлдашев А.М. ....	431
Теркина И.А. ....	41, 183	Цапков В. ....	55	Юнусов М. С. ....	466
Терлецька Я.Т. ....	367, 427	Цейслер Ю.В. ....	353	Юрин В.М. ....	399
Тиябаев К.З. ....	429, 431	Цирюк Е.И. ....	393	Юркова И.Н. ....	191
Тимофеева Т.В. ....	121	Цирюк О.І. ....	225	Яблонська С.В. ....	301, 345, 445
Тихонов В.Л. ....	193	Цыганков В.П. ....	468	Яворская Н.В. ....	451
Тишковский Р.Б. ....	61	Цыпышева И. П. ....	466	Яковенко І.Н. ....	405
Ткачевская Е. П. ....	109, 143	Цюпко Т.Г. ....	479	Яковлев К.В. ....	189
Толочкина С.А. ....	433	Чайка В.О. ....	245, 299	Якубова І. ....	447
Толстанова Г.М. ....	225	Чайка Я. ....	309	Якшибаева Ю.Р. ....	423
Толстиков Г. А. ....	15, 175	Чевичалова А.В. ....	467	Яниш Ю.В. ....	369
Томилов Ю.В. ....	117, 381	Чекман І. С. ....	29	Янцев А.В. ....	449
Топалз Л.И. ....	77	Челой Л.Е. ....	99, 155	Яременко Ф.Г. ....	287
Торгалю Є.О. ....	397	Червинец В.М. ....	317	Яремкевич О.С. ....	241
Тороп В.В. ....	131	Червінська Т.М. ....	225	Ярмолюк С.М. ....	405
Торопкина А.С. ....	239	Чердынцева Т.А. ....	69	Яструб Т.А. ....	307
Трахтенберг І.М. ....	435	Черницына С.М. ....	183	Яцко Ю.А. ....	73
Трегубова К.В. ....	267	Черно Н.К. ....	315		
Трегубова Н.А. ....	467	Чернова Т.А. ....	57		
Трескунов К.А. ....	317	Чернодод Г.К. ....	221		
		Честных Д. А. ....	351		


**AUTHOR LIST**

Abakumova E.S. ....	292	Bogdanova E.V. ....	86, 92	Delemenchuk N.V. ....	244
Abdullaeva L.K. ....	430	Bogun L.I. ....	300	Demchenko P.I. ....	254
Abduvaliev A.A. ....	228	Bogushevich S.E. ....	20	Demchenko V.F. ....	308
Abramova L. S. ....	150	Boiko I.I. ....	170	Demina O.V. ....	108
Afonin V.Yu. ....	206, 408	Boiko O.V. ....	234	Dentovskaya S.V. ....	276
Ageev S.A. ....	276	Boiko Yu.A. ....	350	Denysenko O.V. ....	256
Agureev A.P. ....	6	Boldeskul I. ....	22, 404	Diadiun S.T. ....	402
Ahabalajeu A. A. ....	106	Bondarenko N. A. ....	70	Dikusar E.A. ....	34, 158
Aisenberg V.L. ....	8	Bondarenko N.S. ....	322	Ditchenko T. ....	340
Akaike Norio ....	474	Bondarenko O.B. ....	236, 266	Dmitrieva E.A. ....	68
Akhatova F.S. ....	28	Bondarenko S.P. ....	24	Dmytrukha N.M. ....	220, 258
Albulov A.I. ....	318	Boortseva S.A. ....	76, 426	Dokichev V.A. ....	118, 190, 382
Alekseeva O. M. ....	208	Borikov A. ....	288	Donchenko G. V. ....	36, 202, 244,
Alexandrova G.A. ....	170	Borisenko A.V. ....	8	.....	260, 374, 376, 384, 442
Alexeeva I.V. ....	372, 380	Borodina V. ....	116	Doni V. ....	156
Alfonsov V.A. ....	10, 136, 392	Boshkov L. Z. ....	82	Dontsov A.E. ....	262
Ameljanchik J. ....	388	Bredikhin A.A. ....	26, 28	Dore T. M. ....	464
Andreeva L. A. ....	444	Bredikhina Z.A. ....	26, 28	Dubey I. ....	232
Andrijanova U.M. ....	210	Brovarets V.S. ....	406	Dudok K.P. ....	264
Andronati S.A. ....	212, 214	Bryukhanov V.M. ....	222	Dvorshchenko C. ....	272
Andronic O. ....	56	Buko V.U. ....	238, 344	Dyubko T.S. ....	46, 266
Andrusishyna I.M. ....	220, 258	Bulantseva E.A. ....	240	Efremova N. ....	38
Anikina L.V. ....	216	Bura M. ....	242	Egorova A.U. ....	210
Anisimov A.P. ....	276	Buriak I.A. ....	266	Eichhoff Uwe ....	172
Anisovich M.V. ....	218, 360	Burlaka A.P. ....	244	Elenciu D. ....	38
Ankudinov I.V. ....	120	Burlakova E.B. ....	208, 458	Elinson M. N. ....	126, 128, 130
Antonenko S.V. ....	402	Buzyka T.V. ....	256	Epishkin I.V. ....	284
Apalko S.V. ....	12	Bykhovets A.I. ....	152	Ermakova E.A. ....	124, 270
Aparin P.G. ....	120	Bytchkova A.A. ....	18	Evseenko L.S. ....	458
Apuhovska L.I. ....	442	Cepoi L. ....	100, 156	Evstropov N.A. ....	194
Apukhovska L. I. ....	376	Chajka Ya. ....	310	Fadeev M.A. ....	274
Apykhtina O.L. ....	220	Chayka V.O. ....	246, 300	Falalyeyeva T. ....	272
Artamonova S.D. ....	14	Chehivskaya L.I. ....	374	Falko O.V. ....	114
Artemenko O. ....	446	Chekhun V.F. ....	368, 448	Fattakhov S.G. ....	208, 458
Artyukov A.A. ....	332	Chekman I. S. ....	30	Fauzullin D.A. ....	124
Avanesjan S.S. ....	188	Chelmenchiuc V. ....	156	Fedorchenko D.B. ....	372, 402
Avrorin V.V. ....	170	Cherdintseva T.A. ....	70	Fedorchuk O. G. ....	424
Azarova O.V. ....	222	Chernitsina S.M. ....	184	Fedoreyev S.A. ....	222
Badun G.A. ....	170	Cherno N.K. ....	316	Fedorov B.S. ....	274
Baevsky A.M. ....	284	Chernoded G.K. ....	222	Fedorova G.A. ....	42, 116, 184
Baevsky M. Yu. ....	284	Chernova T.A. ....	58	Fedoryak D.M. ....	464
Baibulatova N.Z. ....	304	Chervinets V.M. ....	318	Fedoryak O.D. ....	464
Balaeva-Tikhomirova O. ....	344	Chervinska T.M. ....	226	Fedotova O.V. ....	210
Barachevsky V.A. ....	108	Chesnich D.A. ....	352	Feodorova V.A. ....	276
Baranova G.V. ....	64	Chiriac T. ....	38	Filinska O.M. ....	302, 346, 446
Bardadym I.I. ....	362	Chirkin A. ....	344	Filipenko M.L. ....	12
Barysheva T.S. ....	438	Chirva V.Ya. ....	104	Filiptsova H. ....	388
Baschenko N. Zh. ....	304, 382	Chiselita N. ....	78	Fomina A.A. ....	268
Bashilov A.V. ....	224	Chiselita O. ....	78	Frasinyuk M.C. ....	24
Batir L. ....	38	Chizhevsky V.V. ....	114	Furzikova T.M. ....	452
Baykova I. P. ....	16	Chomenko A.V. ....	442	Gabdrahmanova S.F. ....	118
Belikov N.E. ....	108	Chupakhina T.A. ....	104, 396	Gafurov Yu.M. ....	386
Beltyukova S.V. ....	18	Churin S.I. ....	392	Galatenko N.A. ....	44, 290
Belykh I.A. ....	266	Chuvaeva I.V. ....	160	Galchenko S.E. ....	46, 282, 418
Beregova T.V. ...	226, 272, 326, 394	Chuvylkin N.D. ....	178	Galushko N.A. ....	364
Beresneva Yu.V. ....	228	Chuyan E.N. ....	248	Gamma T.V. ....	104, 284
Bey M.P. ....	158	Cincilei A.G. ....	434	Garmanchuk L.V. ....	252, 286,
Bezuglov V. V. ....	444	Cojocari A. ....	100, 156	.....	380, 452
Bezverha I.S. ....	24	Cotoaia A. ....	56	Gershunskaya V. V. ....	150
Bilimaga V. ....	38	Danilovich A.V. ....	440	Gildieva M.S. ....	228
Bîrcă M. ....	56	Danylovych G.V. ....	250	Gilmanova A.G. ....	80
Bivol C. ....	38	Danylovych Iu.V. ....	250	Giniyatullin R.Kh. ....	166
Blazhevsky M.Ye. ....	230	Darienko A.M. ....	212	Giniyatullina G. V. ....	16
Blokhin D.Yu. ....	278	Dasyukevitch O. J. ....	252	Gladkih A. ....	116
Blokhina S.V. ....	274	Davletkhanov I.N. ....	392	Glotova T.I. ....	194
Bobyk V. ....	232	Davydova N.K. ....	32	Glushkov A.N. ....	12
Boeva N.P. ....	148	Dekusha G. ....	428	Gogol S.V. ....	368, 454



Gololobov Y. G. ....	50	Kharlamov A.V. ....	70	Kristtal O. ....	296, 474
Goloshchapov A. N. ....	208	Khilko T. ....	448	Krivoshapko O.N. ....	332
Golovina M.E. ....	120	Khilya O.V. ....	72	Kshiminski K. ....	266
Golubeva E.A. ....	210	Khilya V.P. ....	24, 52, 62, 134	Kucharenko O. P. ....	406
Golubina O.A. ....	60	Khisamutdinova R. Yu. ....	304	Kuchmenko O.B. ....	244
Golubkov A.M. ....	262	Khodonov A.A. ....	108	Kuchmerovskaya T.M. ....	202
Goncharuk V.M. ....	152	Khrapov E.A. ....	12	Kuhn Hartmut ....	54
Gorbachevskiy A.N. ....	334	Kim Y. A. ....	208	Kulchikov A.E. ....	348
Gorbenko N. ....	288	Kiriach T. ....	74	Kulik N.V. ....	166
Gorbik G. V. ....	424	Kirteieva S.S. ....	306	Kurchenko I.N. ....	202
Gorbulenko N.V. ....	52	Kirsenko V. V. ....	308	Kurchenko V.P. ....	84
Gorbulnova N.I. ....	230	Kisel M.A. ....	76, 168	Kurman P.V. ....	58
Gorina O. L. ....	292	Kiselita N. N. ....	186	Kuryanov V.O. ....	104, 396
Goryachaya I.P. ....	266	Kiselita O. A. ....	186	Kuschevskaya N.F. ....	334
Govoruha M. O. ....	30	Kiselyov A.S. ....	162	Kuschevskiy A.E. ....	334
Grabelnykh V.A. ....	112	Klen E.E. ....	66, 80	Kuvaeva Z. I. ....	106
Grigorieva M. ....	290	Klenov O.O. ....	368	Kuznetsov O.E. ....	276
Groza N. V. ....	54	Kleveta G. ....	310	Kotyk A. ....	310
Gulea A. ....	38, 56	Knirel Y.A. ....	120, 276	Kozak M. ....	428
Gulevskij A.K. ....	292	Knyazev A. ....	312	L'vov V.L. ....	120
Gulyakevich O.V. ....	58	Knyazeva O. ....	312	Lampatov V.V. ....	222
Gusakova N.N. ....	210	Kobernik A.A. ....	212	Laptev A.V. ....	108
Guseva A.A. ....	322	Kokoshkina O.A. ....	314	Larkina E.A. ....	110
Haliullin F. A. ....	66	Kokozay V.N. ....	452	Larskaya I.A. ....	438
Hanusevich I.I. ....	244	Kolesnik D. L. ....	252	Lavrova K.V. ....	246
Henega A. ....	242	Kolomiychuk S. G. ....	82	Lebedev O.V. ....	336
Hovaka V.V. ....	132	Kolomiychuk T.V. ....	316	Ledov V.A. ....	120
Husainov D.R. ....	284	Komarov B.A. ....	318	Leonenko N.S. ....	308
Iatco I. ....	74	Komissarenko A.N. ....	98	Leonova E.S. ....	122
Ibragimov B.T. ....	432	Kompanets I.V. ....	326	Leshchenko Z. ....	116
Ibragimov F.A. ....	228	Kondakova A.N. ....	120, 276	Lesiv A. V. ....	164
Ievglevskiy O. ....	296	Kondratskaya E. ....	296, 474	Levanova E.P. ....	112
Ignatov V.V. ....	268	Konkina I. ....	312	Levkivska L.V. ....	338
Ilovaisky A.I. ....	126, 128, 130	Konnov N.P. ....	276	Lipina O.V. ....	114
Ilyina T.V. ....	98	Konnova S.A. ....	268	Lipson V. ....	116
Inisheva L.I. ....	60	Konovalov A. I. ....	208, 320	Logvina A. ....	340
Ioffe S. L. ....	164	Konovalova N.P. ....	274	Lokhmatov A.V. ....	110
Isac-Gutsul T. ....	56	Kopylova G.N. ....	222	Lozhkin S.S. ....	118
Ishchenko V.V. ....	62	Korableva N.P. ....	240	Lubenets V. ....	242
Ivanov A.A. ....	8	Korchevin N.A. ....	112	Lubyanova I.P. ....	342
Ivanov E.G. ....	292	Koreneva A. A. ....	132	Lukash T.A. ....	366
Ivanov I.V. ....	54	Korenman Ya. I. ....	86, 88, 90, 92	Lukin A.Yu. ....	108
Ivanova O. ....	288	Korenyuk I.I. ....	104, 284, 396	Lukivskaya O.Ya. ....	238, 244
Ivanska N.V. ....	402	Korkach Yu.P. ....	220	Lukyanchuk Ye.V. ....	244
Ivaschenko E.V. ....	334	Korolenko T.K. ....	323	Lukyanyenko I.V. ....	354
Ivshina T.N. ....	14	Korotkiy O. ....	394	Lunko O. ....	296
Jin-Rong Zhou ....	227, 228	Korotkiy O.G. ....	326	Lupasco A. ....	56
Joucotsky E.K. ....	368	Korotkiy O.G. ....	226, 246	Lynchak O. ....	346
Kabanova T.A. ....	214	Koshevoy O. N. ....	98	Lysak V.V. ....	138
Kachala V.V. ....	142, 154	Kossyak T. Yu. ....	264	Machneva T.V. ....	110
Kachanov A.V. ....	386	Kosterin S.O. ....	328	Madzievskaya T.A. ....	206
Kandybin N.V. ....	378	Kostina V.G. ....	372	Makarenko A.N. ....	348
Kanishchev O.S. ....	64	Kostyanko M.V. ....	12	Makarov M.V. ....	122
Kapichon A.P. ....	8	Kotelnikova I.M. ....	94	Makarova N.N. ....	80
Kargin A. V. ....	460	Kotsuruba A.B. ....	220	Makay S. ....	448
Karnozhitskaya T. ....	116	Kovalenko V.F. ....	308	Makhmudov R.R. ....	170
Karpov L.M. ....	256	Kovaleva V.A. ....	300	Makhonina M.M. ....	248
Kasyan O.V. ....	298	Kovaliova M.V. ....	206	Makota O. ....	48
Kataeva O.N. ....	136	Kovalkova M.V. ....	188	Makshakova O.N. ....	124
Kayumova R.R. ....	66	Kovalyova A.M. ....	96, 98	Maksimenko S.I. ....	350
Kazakov V. P. ....	66	Kozak V.V. ....	370	Malei L.P. ....	206
Kazakova O.B. ....	16, 176	Kozin Yu. I. ....	266	Malinovskaya L.A. ....	60
Khaliullin F.A. ....	80	Kozlov A. ....	232	Malitska I.V. ....	368, 454
Khama-Murad A. X. ....	294	Kozlov K.P. ....	330	Malyishev O.A. ....	216
Kharchenko V. ....	232	Kozlov N.G. ....	158	Mamaliga V.K. ....	434
Kharchenko O.I. ....	300	Krasnokutskaya L.M. ....	342	Mamedova V.L. ....	136
Kharchuk I.V. ....	302, 446	Krasova N. ....	116	Mamykin A. V. ....	66
Kharchyk I. ....	346	Kravchenko A.N. ....	212, 216, 336	Mandzynets S. ....	242
Kharenko E.N. ....	68	Kravchenko I.A. ....	350	Markina A.A. ....	120
Kharkevich E.S. ....	202	Kravchenko O.O. ....	326	Markov A.G. ....	352, 460



Martirosova V.G. ....	342	Ostapchenko L.I. ....	226, 286,	Rozhnova R.A. ....	44
Martynyuk V.S. ....	354		326, 398, 448	Rudakov D.A. ....	158
Maslova L.K. ....	160	Ostrovskaya G.V. ....	302, 346, 446	Rudi L. ....	100, 156
Matveeva V.A. ....	12	Ostrovskaya L.A. ....	200	Rudic V. ....	38, 74, 100
Matveichuk S.V. ....	20	Ostrovsky M.A. ....	262	Rudnichenko E.S. ....	86, 92
Matveienko Y.V. ....	138, 146	Otroshchenko V.A. ....	144	Russavskaya N.V. ....	112
Mayo K. ....	269, 270	Pahomova O. A. ....	90	Ryabenko D. ....	232
Mel'nikova E.I. ....	86, 92	Palchykovska L.G. ....	380	Ryabushko V.I. ....	192
Merkulova V. M. ....	126, 128, 130	Palchykovska L.I. ....	372	Rybalchenko V.K. ....	302, 346, 394, 446
Meshcherakova S. A. ....	66	Palygin O. ....	296	Rybalkina E.Yu. ....	122
Mikhailov A.S. ....	166	Pan'kina L.N. ....	276	Rybalko S.L. ....	372, 390, 402
Mikhal'chuk A.L. ....	58	Panov D.A. ....	192	Ryzhkina I. S. ....	320
Milokhov D. S. ....	72	Panova E.P. ....	192	Ryzhov A.N. ....	160, 178
Miroshnichenko M.S. ....	338	Papunidi K.C. ....	392	Sadovnic D. ....	74
Miscu V. ....	100	Parfenova V.V. ....	42, 184	Sakina N.L. ....	262
Mishchenko L. T. ....	132	Parhach M.E. ....	146	Salienko I.A. ....	46
Mishchenko N.P. ....	222	Parhomenko N.A. ....	192	Samchenko Yu. ....	22, 404
Misyura A.G. ....	412	Parhomenko Yu.M. ....	202, 374	Samet A.V. ....	162
Moiseeva N.N. ....	292	Pashagin A. V. ....	28	Samoilenko V.A. ....	402
Mokrushin A. A. ....	294	Pasichna E. P. ....	376	Samonina G.E. ....	272, 322
Mokshina N.Ya. ....	88, 90	Pasmurceva N. ....	404	Samoylenko O.A. ....	368, 454
Molchan O.V. ....	84, 400	Patyka T.I. ....	378	Sanagurski D. ....	242
Moldoveanu T. G. ....	186	Patyka V.F. ....	378	Sashenkova T.E. ....	274
Molodoi E. V. ....	78, 186	Pavlinova L. I. ....	294	Satyo A.N. ....	84
Molozhavaya O.S. ....	348	Pavlovsky V.I. ....	212, 214	Savosko S.I. ....	348
Morozova E.V. ....	218, 360, 376	Perepelitsyna E.M. ....	286, 380, 452	Savostina E.P. ....	276
Morozova K.S. ....	356	Perepelov A.V. ....	120	Sayapina L.V. ....	276
Morozova L. ....	232	Perskyi Ye.E. ....	356	Schulze B. ....	48
Morozova R. P. ....	376	Petkevich S.K. ....	34, 152	Scopenko O.V. ....	380
Moskovkina T.V. ....	386	Petrov D.V. ....	118, 190, 382	Semakin A. N. ....	164
Moskvina V.S. ....	134	Petrova G.V. ....	384	Semenishina E.A. ....	212
Motin V.L. ....	276	Petrova M.S. ....	148	Semenov V.E. ....	162, 166
Murtazina L. I. ....	320	Petrovicheva S.E. ....	386	Semenov V.V. ....	162
Musatova I.B. ....	114	Petruhanova A.V. ....	150	Semenova M.N. ....	162
Muzychka L.V. ....	180	Petukhov D.M. ....	244	Semernya L.G. ....	110
Myagkova G. I. ....	54	Petushok V.G. ....	138	Semik L.I. ....	256
Naruta E. ....	344	Petuchenkov A.A. ....	278, 280, 390	Senchylo N.V. ....	452
Naumov A.A. ....	358	Placinta N. ....	100	Serebriakova M.V. ....	402
Nebesna T. Yu. ....	30	Pochernyaev A. ....	116	Shablykin O.V. ....	406
Nebolsin V.E. ....	196	Pogorel'skaya L.V. ....	318	Shablykina O.V. ....	62
Nefedov O. M. ....	118, 382	Pogrebnoy P. ....	232	Shafranovskaya E.V. ....	206, 408
Negrutskii B.S. ....	366	Pogribniy P.V. ....	456	Shaikhutdinova R.Z. ....	276
Nekhoroshev M.V. ....	280	Poiarkov O.S. ....	402	Shamtsyan M.M. ....	298
Nepyyvoda K.D. ....	286	Poltorak V. ....	116	Shapovalova A.A. ....	104
Nesmelova I. ....	270	Popov A.M. ....	332, 386	Sharabura L.B. ....	24
Nesterova N.V. ....	64	Popova N.I. ....	76	Sharko O.L. ....	76, 168
Nesterova O.V. ....	452	Popovschi L. ....	38	Sharkova N. ....	368, 428
Niftaliev S.I. ....	86	Postolaky O.M. ....	76	Sharina F.F. ....	14
Nikishin G.I. ....	126, 128, 130	Potkin V.I. ....	34, 152, 158	Shatalin Yu.V. ....	358, 410
Nikitina K.A. ....	136	Potopalskiy A.I. ....	390	Shchepina N.E. ....	170
Nikolaev A.E. ....	166	Potselueva M.M. ....	358	Shekht M.A. ....	120
Nikolaevich L.N. ....	218, 360	Pozur V.K. ....	348, 452	Shenjavskij I.I. ....	292
Nikolchenko A.J. ....	292	Preobrazhenska T. ....	448	Shermolovich Yu.G. ....	64
Novikov V. ....	242	Prokopyuk O.S. ....	114	Shestakova T.S. ....	456
Novikova N.S. ....	350	Protasova Z.S. ....	374	Shevchenko E. A. ....	380
Novikova V.G. ....	28	Protsenko M.A. ....	240	Shevchenko I.N. ....	412
Nozdrenko D.M. ....	338, 362	Pshenichnaya E.N. ....	188	Shevchenko K. V. ....	444
Odinets I.L. ....	122	Punegova L.N. ....	392	Shevchenko A. A. ....	444
Ogurtsova S.A. ....	206	Pyaskovskaya O.N. ....	252	Shilay A.G. ....	152
Okorochenkov S.A. ....	196	Pyatchanina T. V. ....	422	Shinder A.V. ....	46
Oksenenko S. ....	288	Pylypchuk S.Iu. ....	374	Shirobokova M. ....	116
Olan O. ....	38	Radchuk O.M. ....	226, 394	Shirokiy V.L. ....	34
Olefirenko A.A. ....	418	Raetska Ya.B. ....	398	Shishkin D.V. ....	304
Olkhovik V.K. ....	138, 146	Rastimesina I.O. ....	434	Shitova T.S. ....	392
Omelchuk E.A. ....	8	Ravaeva M.Yu. ....	104, 396	Shkavolyak A.V. ....	264
Orlova I.G. ....	364	Rechtytskiy O.N. ....	264	Shkrabak O.A. ....	440
Orlovsky A.A. ....	366, 368, 370, 454	Reznik V.S. ....	166, 462	Shkryl' Yu.N. ....	222
Osipov A.N. ....	110	Rodionov A.N. ....	142, 154, 198	Shmarev A.N. ....	410
Osipova E.Yu. ....	142	Romashko S.N. ....	84, 400	Shved A.D. ....	372
Ostakhov S. S. ....	66	Roshal A.D. ....	266	Shvets V.I. ....	108



Shylau V.V. ....	206	Tseyslyer Yu.V. ....	354	Zolotar' R.M. ....	152
Sidorik L. ....	232	Tsyryuk O.I. ....	226, 394	Zosim L. ....	38
Silnikov V.N. ....	194	Tverdokhlib I.A. ....	8	Zubenko Yu.S. ....	152
Silonov S.B. ....	36	Tyshkivskyy R.B. ....	62	Zuev Yu. ....	270
Simenel A.A. ....	142, 154, 174, 198, 200	Tyzhnenko T. ....	116	Zverev Ya.F. ....	222
Sinyashin O.G. ....	392	Umarova B.A. ....	322	Zvereva T.D. ....	158
Sklyarov A.Ya. ....	414, 416	Usatyi A.S. ....	78, 186	Zvezdin K.V. ....	108
Skrynnyk M.M. ....	402	V'unova T.V. ....	44	Zvyagina T. ....	288
Skybitska M. ....	310	Varfolomeev S.D. ....	108	Zykov A.V. ....	88, 90
Slastya Eu. A. ....	422, 424	Vasilevskii D.A. ....	138	Zykova S.I. ....	174, 200
Sleta I.V. ....	418	Vasilyeva N.V. ....	144		
Smirnov L.D. ....	262	Veklich T.O. ....	440		
Smirnova I.E. ....	176	Veliky M.M. ....	442		
Smolenskii E.A. ....	160, 178	Vendilo A.G. ....	70		
Smolii O.B. ....	180	Verkhusha V.V. ....	356		
Snegur L.V. ....	200, 420	Verves E.V. ....	180		
Sobko V.M. ....	354	Vikharev Yu.B. ....	216		
Sobolevskaya M.P. ....	184	Vinogradova E.P. ....	352, 460		
Sokolik O.A. ....	266	Vislovukh A.A. ....	366		
Soldatkina M.O. ....	456	Voloshina A.D. ....	166		
Solyanik G. I. ....	252, 422, 424	Volovenko Yu. M. ....	72		
Sorokina L. V. ....	422	Volykhina V.E. ....	408		
Spirikhin L. V. ....	16, 176	Vorobjova T.V. ....	334		
Spraul Manfred ....	172	Vorobyova O.V. ....	188		
Stanev A.I. ....	314	Voronina O.K. ....	226		
Starykovich L.S. ....	264	Wolf J. ....	48		
Stepanenko S.P. ....	374	Yablonska S.V. ....	302, 346, 446		
Stepanova A. ....	288	Yakovenko I.N. ....	406		
Stepina I.E. ....	144	Yakovlev K.V. ....	190		
Stoiko V.I. ....	8	Yakshibaeva I. R. ....	424		
Streapan N.V. ....	434	Yakubtsova I. ....	448		
Sukhodub L.F. ....	22, 182, 404	Yanish Yu.V. ....	370		
Sukhorukov A. Yu. ....	164	Yantsev A.V. ....	450		
Suprun S.M. ....	202	Yaremenko F. ....	288		
Svitlichna N. ....	116	Yaremkevych O. ....	242		
Svjatezkaja V.N. ....	348	Yarmoluk S. M. ....	406		
Sybira N.O. ....	264, 310	Yastrub T.A. ....	308		
Sydorenko M. V. ....	286, 380	Yavorska N.V. ....	452		
Sydoryk Ye.P. ....	244	Yegorenkova I.V. ....	268		
Syrbu T. F. ....	426	Yeresko V.A. ....	264		
Sytova M.V. ....	68	Yuldashev A.M. ....	432		
Tagil I.I. ....	206	Yurin V.M. ....	400		
Talipov S.A. ....	432	Yurkova I.I. ....	192		
Talover M.V. ....	414	Yuvchenko A.P. ....	34, 158		
Taran K. ....	288	Zabotin A.I. ....	438		
Taran O. P. ....	132	Zagorodnya S.D. ....	64		
Temuryants N.A. ....	354	Zakashun T. ....	290		
Terkina I.A. ....	42, 184	Zakovryashin V.S. ....	194		
Terletska Ya. T. ....	368, 428	Zaletok S.P. ....	366, 368, 454		
Tichonov V.L. ....	194	Zaporozhchenko A.V. ....	314		
Tilyabaev K.Z. ....	430, 432	Zarudii F. S. ....	382		
Timofeeva T.V. ....	122	Zavelevych M.P. ....	278, 280		
Tkachevskaya E.P. ....	110, 144		372, 390, 402		
Tolocichina S.A. ....	434	Zavodovsky D.O. ....	362		
Tolstanova G.M. ....	226	Zeleniy S.B. ....	456		
Tolstikov G. A. ....	16, 176	Zemirova I.A. ....	112		
Tomilov Yu. V. ....	118, 382	Zemtsov R.V. ....	108		
Topala L. ....	78	Zharkova L.D. ....	372, 390		
Torgalo E.A. ....	398	Zheldakova R.A. ....	34, 138, 146, 158		
Torop V.V. ....	132	Zheltukhina G.A. ....	196		
Toropkina A.C. ....	240	Zherebker K.Ya. ....	174, 198		
Trach Yu. ....	48	Zhigacheva I.V. ....	458		
Trachtenberg I.M. ....	436	Zhokhova N.I. ....	178		
Tregubova K.V. ....	268	Zhukotskiy E. ....	428		
Treskunov K.A. ....	318	Zhukov D. A. ....	460		
Tret'yakova E. V. ....	176	Zhukovskaya N.A. ....	34		
Tretyakov V.V. ....	194	Zhuravel O.V. ....	456		
Trifonova A. V. ....	292	Zhuromskiy V.S. ....	416		
Trofimova O.I. ....	438	Zinchenko V.D. ....	266		
Tsapkov V. ....	56	Zobov V.V. ....	166, 462		

Научное издание

Тезисы докладов  
Научно-практической конференции  
**«БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:  
фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения»**  
Новый Свет, Крым, Украина  
25–30 мая 2009

*Редактор:* В.С. Мартынюк,

*Дизайн:* В.С. Мартынюк  
*Дизайн обложки:* В.С. Мартынюк, Н.Н. Зуев.  
*Верстка:* В.С. Мартынюк

Подписано в печать 25.04.2009 г.  
43 усл. печ. л. Формат: 86 x122М/16  
Бумага офсетная  
Гарнитура Arial,  
Печать: ризограф.  
Тираж 200 экз.

**Издатель В.С. Мартынюк**  
Свидетельство субъекта издательского дела  
серия ДК № 2935 от 14.08.2007  
Украина, г. Киев, 030022, ул. Ломоносова, 81.  
**[www.publisher.science-center.net](http://www.publisher.science-center.net)**  
**e-mail: [mavis@science-center.net](mailto:mavis@science-center.net)**  
тел.: 8 050 6535592

Отпечатано в типографии ФЛП Бровко А.А.  
96500, г. Саки, ул. Тимирязева, 30.





## Принстонские Лаборатории Биомолекулярных Исследований

Сила природы в гармонии мира

Princeton Biomolecular Research Inc. – компания с многолетней историей. Мы объединяем ученых многих стран для научных исследований в области биорганической химии и фармакологии, а также разработки новых технологий и методов биохимических исследований. Компания вошла в число лидирующих в этой области фирм и продолжает стремительно развиваться. Наряду с Исследовательским центром в США, было учреждено Научно-исследовательское предприятие в Киеве «Принстонские лаборатории биомолекулярных исследований» («PBMR Labs Ukraine»). В совместных исследовательских проектах принимают участие лаборатории из Украины, России и Армении. Компания также тесно сотрудничает с научными коллективами и отдельными химиками ВУЗов, академических и отраслевых НИИ.

Предприятие «PBMR Labs Ukraine» приглашает к сотрудничеству по программам:

- "Заказной синтез биологически активных соединений "
- "Заказной синтез билдинг-блоков "
- "Консигнация билдинг-блоков "
- "Консигнация соединений "

Более подробно о нашей компании, вакансиях и предложениях о сотрудничестве вы можете узнать на нашем сайте [www.pbmr.com.ua](http://www.pbmr.com.ua), по телефонам 559-88-77, 559-90-81, а также в нашем офисе по адресу: Киев, ул. Мурманская, 1, офис 430, 436 (м. Лесная, институт Биорганической химии).

**Мы предоставляем разнообразные варианты совместной работы для достижения совместной цели.**